

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

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

**Diversidad genética y estructura poblacional de  
*Megalobulimus huascari* (Gastropoda:  
megalobulimidae), especie promisorio del biocomercio  
nacional**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista  
Biotecnólogo

**AUTOR**

Jenny Martha CHIRINOS SAIRE

**ASESOR**

Rina Lastenia RAMÍREZ MESÍAS

Lima - Perú

2012

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	viii
DEDICATORIA.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	4
3. OBJETIVOS.....	4
4. MARCO TEÓRICO .....	5
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
5.1. Marcador mitocondrial 16S rRNA.....	7
5.2. Área de estudio.....	7
5.3. Especie en estudio: <i>Megalobulimus huascari</i> .....	16
5.4. Grupo hermano: <i>Megalobulimus separabilis</i> .....	20
5.5. Grupo externo: <i>Megalobulimus capillaceus</i> .....	21
5.6. Materiales.....	22
5.6.1. Material Biológico .....	22
5.6.2. Material de Campo.....	22
5.6.3. Material de Laboratorio .....	22
5.7. Métodos.....	23
5.7.1. Extracción de DNA total .....	23
5.7.2. Amplificación de DNA.....	24
5.7.3. Visualización de DNA.....	24
5.7.4. Secuenciamiento de DNA.....	25
5.7.5. Edición y alineamiento múltiple de secuencias.....	25
5.7.6. Caracterización de las secuencias .....	25
5.7.7. Diversidad genética .....	26
5.7.8. Distancia genética .....	26
5.7.9. Análisis filogenético.....	26
5.7.10. <i>Network</i> .....	28
5.7.11. Análisis genético poblacional .....	28
a. Prueba <i>Fst</i> .....	28
b. AMOVA.....	28
c. Test de Mantel.....	29

5.7.12. Análisis demográfico .....	29
a. Pruebas de modelo neutro.....	29
Test de Tajima.....	29
Test <i>F<sub>s</sub></i> de <i>F<sub>u</sub></i> .....	30
b. <i>Mismatch distribution</i> .....	30
5.7.13. Perfil 16S rRNA de <i>Megalobulimus huascari</i> .....	31
6. RESULTADOS.....	32
6.1. Distribución geográfica de la especie .....	32
6.2. Estandarización de protocolos de extracción y amplificación de DNA.....	36
6.3. Caracterización de las secuencias del marcador mitocondrial 16S rRNA.....	37
6.4. Diversidad genética del marcador mitocondrial 16S rRNA .....	46
6.5. Distancia genética para el marcador mitocondrial 16S rRNA.....	48
6.5.1. Distancia Genética intra e interespecífica.....	48
6.5.2. Distancia Genética intra e interpoblacional.....	49
6.6. Análisis filogenético de <i>M. huascari</i> con el marcador mitocondrial 16S rRNA .....	52
6.7. <i>Networks</i> .....	59
6.8. Análisis genético poblacional.....	60
6.8.1. Diferenciación poblacional.....	60
6.8.2. Variación molecular inter e intrapoblacional.....	61
6.9. Estructuración geográfica de la arquitectura genética.....	63
6.10. Patrones demográficos .....	64
6.11. Tiempos de Divergencia.....	67
6.12. Código de barras de DNA para <i>M. huascari</i> .....	69
7. DISCUSIÓN.....	70
7.1. ¿16S rRNA: el mejor marcador para <i>M. huascari</i> ? .....	70
7.2. Caracterización de secuencias.....	71
7.3. Variación genética en <i>Megalobulimus huascari</i> .....	71
7.4. <i>Megalobulimus huascari</i> : un clado monofilético .....	73
7.5. Linajes genéticamente diferenciados y estructurados.....	75
7.6. Influencia de la Cordillera de los Andes y la incursión humana .....	76
7.7. Expansión demográfica de las poblaciones de <i>Megalobulimus huascari</i> .....	78
7.8. Código de barras de DNA usando el marcador 16S rRNA .....	78
7.9. <i>M. huascari</i> : una especie promisorio del biocomercio.....	79
7.10. Implicancias en conservación .....	81
8. CONCLUSIONES.....	83
9. REFERENCIAS.....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b>	Área de estudio. Muestra la distribución de las zonas de muestreo en la Selva Central del Perú, en los departamentos de Junín y Pasco. Obtenido de Google Maps.	9
<b>Figura 2</b>	Localidades de Sanchirio Palomar, Chincarmás y La Florida en Chanchamayo-Junín, y Ñagazú, Tzachopén y Kantarizú en la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco. Obtenido de Google Maps.	10
<b>Figura 3</b>	Centro Poblado La Florida, al norte de Chanchamayo, Junín-Perú. La imagen fue tomada en el fundo Santa Rosa, propiedad del señor Modesto Zuñiga.	11
<b>Figura 4</b>	Crianza de <i>M. huascari</i> en el poblado de Sanchirio Palomar, Chanchamayo-Junín. Los caracoles son puestos en tierra y cubiertos por pastos para conservar la humedad.	12
<b>Figura 5</b>	Localidades de Amable María, Guayaquil y Don Bosco en el distrito de San Ramón, además, La Esperanza y Utcuyacu, ubicadas en el distrito de Vitoc, provincia de Chanchamayo, departamento de Junín. Obtenido de Google Maps.	13
<b>Figura 6</b>	Poblado de Don Bosco, distrito de San Ramón, provincia de Chanchamayo, Junín-Perú.	14
<b>Figura 7</b>	Poblado de La Esperanza, al sur de Chanchamayo, Junín-Perú. La imagen fue tomada en un fundo propiedad del señor Julio Espinoza.	16
<b>Figura 8</b>	Conchas de <i>M. huascari</i> provenientes de diversas localidades de la Selva central del Perú. a) Chincarmás. b) Sanchirio Palomar. c) La Esperanza. d) Ñagazú. e) Utcuyacu. Foto: V. Borda.	17-19
<b>Figura 9</b>	Departamento de Huánuco, hábitat natural de la especie <i>M. separabilis</i> . Foto: V. Borda.	20
<b>Figura 10</b>	Departamento de San Martín, hábitat natural de la especie <i>M. capillaceus</i> . Foto: R. Ramírez & C. Calderón.	21
<b>Figura 11</b>	A. Individuos de la especie <i>M. huascari</i> encontrados en la localidad de Utcuyacu, Distrito de Vitoc, provincia de Chanchamayo, Junín. B. Individuo del género <i>Thaumastus</i> hallado junto a <i>M. huascari</i> en la localidad de La Esperanza, distrito de Vitoc, provincia de Chanchamayo, Junín.	33

<b>Figura 12</b>	Distribucion geográfica de los especímenes de <i>M. huascari</i> en los departamentos de Junín y Pasco.	35
<b>Figura 13</b>	Electroforesis en gel de agarosa de amplificadores del marcador 16S rRNA de la especie <i>Megalobulimus huascari</i> . En la parte superior se indica el código de las muestras empleadas en la presente tesis.	36
<b>Figura 14</b>	Extremo 5' del alineamiento múltiple de las secuencias del marcador mitocondrial 16S rRNA, observada mediante el programa Clustal2X. Las 22 primeras bases nitrogenadas corresponden al primer 16S-F104.	38
<b>Figura 15</b>	Porción central del alineamiento múltiple de secuencias del marcador mitocondrial 16S rRNA. Nótese la formación de los primeros <i>gaps</i> entre las secuencias de <i>M. capillaceus</i> .	39
<b>Figura 16</b>	Extremo 3' del alineamiento múltiple de secuencias. Las últimas 22 bases nitrogenadas corresponden al primer 16S-R472.	40
<b>Figura 17</b>	Transiciones (“s”) y transversiones (“v”) comparadas con la distancia genética de a pares en base al modelo de sustitución nucleotídica F84 de las secuencias del marcador 16S rRNA de <i>Megalobulimus huascari</i> , <i>M. separabilis</i> y <i>M. capillaceus</i> .	45
<b>Figura 18</b>	Transiciones (“s”) y transversiones (“v”) comparadas con la distancia genética de a pares en base al modelo de sustitución nucleotídica K80 de las secuencias del marcador 16S rRNA de <i>Megalobulimus huascari</i> , <i>M. separabilis</i> y <i>M. capillaceus</i> .	45
<b>Figura 19</b>	Dendrograma de similitud del marcador 16S rRNA con el método UPGMA para la especie <i>Megalobulimus huascari</i> . En la parte inferior se muestra la escala de distancia genética que representa a las sustituciones por sitio calculadas de acuerdo al modelo de sustitución nucleotídica de Kimura 2 parámetros.	51
<b>Figura 20</b>	Relaciones filogenéticas entre <i>M. huascari</i> , <i>M. separabilis</i> y <i>M. capillaceus</i> . Árbol obtenido en MEGA empleando el método de <i>Neighbour Joining</i> . Se muestran los valores de <i>bootstrap</i> mayores a 50%. La escala representa distancias genéticas en sustituciones de nucleótidos por sitio, calculadas de acuerdo al modelo de Kimura 2-parámetros.	53
<b>Figura 21</b>	Relaciones filogenéticas entre los haplotipos de <i>M. huascari</i> , <i>M. separabilis</i> y <i>M. capillaceus</i> . Árbol obtenido en MEGA empleando las distancias calculadas con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2-parámetros y el método de <i>Neighbour Joining</i> . Se muestran los valores de <i>bootstrap</i> mayores a 50%. La escala representa distancias genéticas	54

en sustituciones de nucleótidos por sitio.

- Figura 22** Árbol filogenético obtenido en PAUP utilizando el método de Máxima Parsimonia. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 50%. 56
- Figura 23** Relaciones filogenéticas obtenidas en PAUP utilizando el método de Máxima Verosimilitud. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 50%. 57
- Figura 24** Relaciones filogenéticas obtenidas en el programa Mr.Bayes empleando el método de Inferencia Bayesiana. Se muestran los valores de probabilidad posterior mayor a 0.50. 58
- Figura 25** Red de haplotipos de *M. huascari*. Los colores representan a las localidades en estudio. El número de cambios mutacionales se halla representado mediante barras. El punto rojo indica la presencia de haplotipos no muestreados o extintos. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo correspondiente (ver escala). Obsérvese la presencia de dos grupos diferentes de haplotipos (Linaje A y Linaje B). 59
- Figura 26** Gráfica de correlación entre la distancia genética y distancia geográfica entre las poblaciones de *M. huascari*. 63
- Figura 27** Distribución de diferencias a pares (*mismatch distribution*) para todas las secuencias de *M. huascari*. Gráfico de población con variación demográfica. En la horizontal se muestran las diferencias a pares y en la vertical la frecuencia de aparición de estas diferencias. 65
- Figura 28** Distribución de diferencias a pares (*mismatch distribution*) para el linaje A de *M. huascari*. Gráfico de población con variación demográfica. En la horizontal se muestran las diferencias a pares y en la vertical la frecuencia de aparición de estas diferencias. 66
- Figura 29** Distribución de diferencias a pares (*mismatch distribution*) para el linaje B de *M. huascari*. Gráfico de población con variación demográfica. En la horizontal se muestran las diferencias a pares y en la vertical la frecuencia de aparición de estas diferencias. 66
- Figura 30** Tiempos de divergencia en la especie *Megalobulimus huascari*. (A) Tiempo de divergencia de *M. huascari* con respecto a *M. separabilis* (1 millón 250 mil años). (B) Tiempo de divergencia del clado A con respecto al clado B (150 mil años). La escala representa la distancia genética y la superior el tiempo en millones de años. 68
- Figura 31** *Matches* realizados para *M. huascari* en la base e datos del GenBank. 69

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1</b>	Georeferencia de las localidades de muestreo para <i>M. huascari</i> .	8
<b>Tabla 2</b>	Descripción de las zonas de muestreo de <i>M. separabilis</i> .	22
<b>Tabla 3</b>	Localidades de registro para <i>M. huascari</i> . Se presenta todas las localidades muestreadas en el presente estudio.	34
<b>Tabla 4</b>	Distancia lineal (en kilómetros) entre las localidades de muestreo.	36
<b>Tabla 5</b>	Lista de las secuencias obtenidas en este estudio, según la localidad de procedencia. N, número de secuencias.	37
<b>Tabla 6</b>	Sitios polimórfico informativos al analizar el conjunto total de secuencias del gen mitocondrial 16S rRNA obtenidas para <i>M. huascari</i> , <i>M. separabilis</i> y <i>M. capillaceus</i> . Los números de la primera columna indican la posición de los nucleótidos en el alineamiento.	41-43
<b>Tabla 7</b>	Promedio de las frecuencias (en porcentajes) de bases nitrogenadas para las secuencias de <i>M. huascari</i> , <i>M. separabilis</i> y <i>M. capillaceus</i> .	44
<b>Tabla 8</b>	Promedio de las frecuencias (en porcentajes) de bases nitrogenadas para las secuencias de <i>M. huascari</i> según cada población.	44
<b>Tabla 9</b>	Sitios parsimoniosamente informativos obtenidos del alineamiento de los haplotipos de las secuencias de <i>M. huascari</i> . Los números en la parte superior indican la posición de los 9 sitios parsimoniosamente informativos. En la parte derecha de la Tabla se indican las poblaciones en las que los haplotipos fueron encontrados. N = Número de secuencias por haplotipo. Poblaciones (JLE: La Esperanza, Tza: Tzachopén, Kan: Kantarizú, Utc: Utcuyacu, Ñag: Ñagazú, Chi: Chincarmás, JSP: Sanchirio Palomar).	46
<b>Tabla 10</b>	Distribución de los haplotipos de <i>M. huascari</i> en relación a las localidades de colecta. N, indica el número de especímenes por localidad.	47
<b>Tabla 11</b>	Índices de diversidad genética para el marcador 16S rRNA de <i>M. huascari</i> . Para estos análisis se excluyó a las poblaciones de Utcuyacu, Tzachopén, Kantarizú y Chincarmás debido al reducido tamaño muestral (1 ó 2 individuos), así como a la presencia de un único haplotipo.	48
<b>Tabla 12</b>	Distancia genética empleando el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura 2-parámetros, entre las especies <i>M. huascari</i> , <i>M. separabilis</i> y <i>M. capillaceus</i> (bajo la diagonal), y dentro de cada una de las especies en mención (diagonal).	49

<b>Tabla 13</b>	Distancia genética (Kimura 2-parámetros) dentro de cada población (diagonal) y entre cada una de las poblaciones (bajo la diagonal). Nótese en general la mayor diferencia al comparar entre las localidades que dentro de ellas. Los guiones indican insuficiencia de número muestral para calcular las distancias dentro de las localidades.	50
<b>Tabla 14</b>	Valores de <i>Fst</i> entre las poblaciones de <i>M. huascari</i> (bajo la diagonal). Los valores cercanos a 1 indican diferenciación genética entre las poblaciones. Los signos por encima de la diagonal indican significancia (+, $p < 0.05$ ) o no significancia (-, $p > 0.05$ ).	61
<b>Tabla 15</b>	Análisis de Varianza Molecular entre las poblacionales de <i>Megalobulimus huascari</i> . Los estadísticos resultaron significativos ( $P < 0.001$ ), salvo en (*).	62
<b>Tabla 16</b>	Análisis de Varianza Molecular entre los grupos establecidos de <i>Megalobulimus huascari</i> (Linaje A y Linaje B). Linaje A: Ñagazú, Sanchirio Palomar y Chincarmás, Linaje B: Utcuyacu, La Esperanza, Kantarizú y Tzachopén. Los estadísticos resultaron significativos ( $P < 0.001$ ), salvo en (*).	62
<b>Tabla 17</b>	Valores de los estadísticos de Tajima y de Fu para el total de las poblaciones y los linajes establecidos. Ningún estadístico alcanzó significancia.	64

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi eterno agradecimiento a mis padres, por su confianza y apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida, pero sobre todo por su amor infinito.

A Luis Armando Zuñiga, mi compañero en esta vida y guía en la realización de las colectas.

A Camila Adriana Zuñiga Chirinos, la niña de mis ojos, por muchas mañanas en las que tuve que ausentarme de su lado para cumplir con mi labor como investigadora.

A mi asesora, Dra. Rina Ramírez, por su apoyo y comprensión, y por constituir el principal ejemplo a lo largo de mi formación profesional.

A los miembros del Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía y del Departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Carlos Congrains, Ana Luz Chumbe, Víctor Borda, Víctor Jiménez, Pedro Romero y Jacqueline Zarria, por compartir conmigo sus conocimientos y sobre todo su amistad.

Este trabajo no hubiera podido realizarse sin el apoyo económico de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por un lado a través del Vicerrectorado de Investigación y el Instituto de Ciencias Biológicas Antonio Raimondi, con el proyecto (Cód. N° 101001091) “Caracterización morfológica y molecular de caracoles terrestres de la selva central usados en alimentación y cosmética”, a cargo de la Dra. Rina Ramírez. Por otro lado, el Vicerrectorado Académico con el Proyecto PIC “Caracterización del gen Citocromo Oxidasa I (COI) en *Megalobulimus separabilis* (Mollusca, Gastrópoda), especie promisorio del comercio nacional”. Asimismo, quiero agradecer el apoyo obtenido por el fondo de promoción de trabajos de tesis de pre grado 2010 de la Facultad de Ciencias Biológicas (RR N° 02097-R-11, Cód. N° 111001027), que financió parcialmente el desarrollo de la presente tesis.

A todas las personas que colaboraron conmigo durante las colectas en Chanchamayo, Junín; así como en el trabajo de laboratorio y redacción de la presente tesis.

*A mis padres Rosa y Eusebio,  
Luis y Camila, mi familia.*

## RESUMEN

El Perú es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo. Dentro de esta vasta diversidad de especies, se encuentran los caracoles terrestres del género *Megalobulimus*, el cual agrupa especies de significativa importancia económica y nutricional, como es el caso de *Megalobulimus huascari*, cuyas características morfológicas le confieren alto potencial de exportación. El objetivo principal de esta investigación fue obtener el perfil genético de *M. huascari* en base al marcador mitocondrial 16S rRNA, a fin de permitir su certificación molecular en el biocomercio y generar pautas para su conservación. Un segmento del genoma mitocondrial correspondiente al gen ribosomal 16S fue empleado como marcador molecular para realizar análisis filogeográficos y filogenéticos en la especie *M. huascari*. Se colectó muestras de 29 individuos distribuidos en siete poblaciones de los departamentos de Junín y Pasco en la Selva Central del Perú. Un total de diez haplotipos fueron hallados. Asimismo se pudo detectar niveles relativamente altos de diversidad haplotípica y niveles bajos de diversidad nucleotídica. Dos linajes distintos, A y B, fueron revelados mediante los análisis filogenéticos. La red de haplotipos (*network*) y el estadístico poblacional *Fst* indicaron ausencia de estructuración geográfica. Sin embargo, la repartición de la varianza molecular estuvo mejor explicada al hacer la agrupación *a priori* para los dos linajes observados en la filogenia de *M. huascari*. Los análisis de *mismatch distribution* y tests de neutralidad (*Fu'Fs* y Tajima) indicaron eventos de expansión poblacional para ambos linajes. La estructuración genética y distribución geográfica encontrada en las poblaciones de *M. huascari* puede ser atribuída a eventos tales como la orogenia de los Andes. Finalmente, el perfil 16S rRNA obtenido para *M. huascari* resultó ser una herramienta eficaz para la identificación de la especie a nivel molecular, lo cual permitirá optimizar las medidas relacionadas a su conservación y certificar a la especie dentro del comercio nacional.

**Palabras clave:** *M. huascari*, marcador 16S rRNA, estructura genético poblacional, biocomercio, conservación.

## **ABSTRACT**

Peru is one of the most biodiverse countries in the world. Within this vast diversity of species, are land snails of the *Megalobulimus* genus, which comprises species of significant economic and nutritional importance, such as *Megalobulimus huascari*, which morphological characteristics give high export potential. The main objective of this research was to obtain the genetic profile of *M. huascari* based on mitochondrial 16S rRNA marker, to enable molecular certification in the biotrade and generate patterns for preservation. A segment of the mitochondrial genome corresponding to the 16S ribosomal gene was used as a molecular marker for phylogenetic and phylogeographic analyzes in the species *M. huascari*. Samples were collected from 29 individuals in seven populations of the departments of Junin and Pasco in central jungle of Peru. A total of ten haplotypes were found. It was also possible to detect relatively high levels of haplotype diversity and low levels of nucleotide diversity. Two distinct lineages, A and B, were revealed by phylogenetic analyzes. Haplotype network and *Fst* statistic indicated lack of geographical structuring. However, the distribution of molecular variance was best explained by making the group a priori by the two lineages observed in the phylogeny of *M. huascari*. The mismatch distribution analysis and neutrality tests (*Fu'Fs* and Tajima) reported events of population expansion for both lineages. Genetic structure and geographical distribution found in populations of *M. huascari* could be attributed to events such as orogeny of the Andes. Finally, 16S rRNA profile obtained for *M. huascari* proved an effective tool for species identification at the molecular level, which will optimize the measures, related to conservation and certify the species within the trade.

**Keywords:** *M. huascari*, 16S rRNA marker, population genetic structure, biotrade, conservation.

## 1. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad es la fuente principal de la preservación de la vida en todas sus formas. El Perú forma parte del grupo de los diez países con mayor diversidad en la Tierra, conocidos como "países megadiversos", debido a que alberga una gran diversidad de ecosistemas, especies, recursos genéticos y culturas aborígenes (CBD, 1992).

La diversidad de genes, de especies y de ecosistemas forman los componentes de la biodiversidad, la cual debe ser estudiada y conservada en forma íntegra. La diversidad genética es la base fundamental para la evolución y adaptación de los organismos vivos a nuevos escenarios. Constituye además, una herramienta muy útil en la identificación de las especies y permite evidenciar la variabilidad de los individuos dentro y entre las poblaciones (Primack & Rodrigues, 2001). De este modo, la estimación de la diversidad genética es un aporte importante para la evaluación de carácter científico del estado de la fauna endémica y la definición de acciones dirigidas a su uso sustentable y su conservación.

Dentro del plan estratégico del Convenio sobre diversidad biológica (CDB, 1992) llevado a cabo en la ciudad de Río de Janeiro (Brasil), se enmarcaron varios objetivos, siendo uno de los principales promover la conservación de la diversidad genética de la fauna silvestre con potencial valor comercial.

El género *Megalobulimus* Müller 1878, está formado por algunos de los caracoles terrestres vivientes más grandes y de importancia económica significativa. Los individuos más consumidos son aquellos de mayor tamaño, entre los que destacan *M. popelairianus* (Nyst 1845), ampliamente distribuido en la Amazonía, *M. maximus* (Sowerby, 1825), en el departamento de Madre de Dios hacia la frontera con Bolivia, y *M. huascari* (Tschudi, 1852), en los departamentos de Junín y Pasco. Entre las especies de menor tamaño se encuentran *M. capillaceus* (Pfeiffer, 1855), común en el

Huallaga Central, *M. separabilis* (Fulton, 1903), en Huánuco, *M. leucostoma* (Sowerby, 1835), en el Oriente del Cuzco, *M. lichtenteini lichtensteini* (Albers, 1854) y *M. l. semimaleatus* (Fulton, 1905), en el norte de Cajamarca y Amazonas (Ramírez & Cáceres, 1991).

La caracterización genética es vital para especies de importancia ecológica y comercial, pues ésta permite su identificación y diferenciación de otras. La especie *Megalobulimus huascari* (Tschudi, 1852), un taxón endémico de la Selva Central del Perú, es considerada en la actualidad una especie promisorio del biocomercio debido a que constituye una importante fuente de alimento con alto valor proteico, la cual viene siendo aprovechada por los pobladores de las comunidades selváticas para consumo propio y comercialización hacia diversas zonas de la Costa. Caracterizar la diversidad genética de *M. huascari* permitirá su identificación y diferenciación de otras especies, proporcionando las bases que permitan su certificación a nivel comercial. Asimismo, considerando que hasta la fecha la especie sólo ha sido estudiada a nivel morfológico (Bequaert, 1948; Ramírez *et al.*, 2010a), surge la necesidad de su estudio a nivel molecular.

El uso del gran número de caracteres provenientes de las secuencias del DNA, se ha propuesto en la taxonomía como una estrategia viable para contribuir a establecer el inventario total de las especies vivas actualmente sobre el planeta (Hebert & Gregory, 2005).

Las propiedades del DNA mitocondrial, tales como su alta tasa de mutación, ausencia de recombinación y herencia matrilineal (Awise, 2000), lo hacen el marcador más apropiado para caracterizar y relacionar especies (Brown *et al.*, 1979). En este contexto, surge una metodología altamente útil en la identificación y descubrimiento de especies biológicas en los grandes grupos taxonómicos de organismos (Hebert *et al.* 2003; Hebert & Gregory 2005; Ratnasingham & Hebert 2007), conocida como código de barras genético, una herramienta rápida y de bajo costo que plantea el

empleo de una secuencia estándar de DNA que permita identificar especies de flora y fauna, con lo cual se transformarán los esfuerzos para la protección y conservación de la biodiversidad mundial.

El molusco *Megalobulimus huascari* posee un gran potencial para el biocomercio nacional; sin embargo, en la actualidad viene atravesando una acelerada modificación y pérdida de su hábitat natural a causa del incremento de la actividad humana, generando el desplazamiento de la especie a zonas de mayor altitud. Asimismo, su consumo por los pobladores de las comunidades selváticas y el incremento de su comercialización a diversas zonas de la Costa, implican probablemente una pérdida en su diversidad genética. Es por ello que, se hace necesario un estudio que nos permita tener una visión del estado en el que se encuentran las poblaciones de esta especie y del panorama al cual se enfrentan.

La caracterización molecular de esta especie sobre las bases genómicas haciendo uso de la biotecnología, conferirá elementos importantísimos para su eventual certificación, y además contribuirá a resolver el problema taxonómico mundial en el que se encuentran las especies, en especial del género *Megalobulimus*. Toda esta valiosa información proporcionará los primeros pasos para certificar a la especie *Megalobulimus huascari* en el biocomercio. Asimismo, la evaluación de su diversidad genética proporcionará información importante para la conservación de esta especie y del ecosistema al cual pertenece.

## 2. HIPÓTESIS

### HIPÓTESIS DE TRABAJO

- *M. huascari* posee un perfil 16S rRNA característico que lo diferencia de otras especies y que puede ser utilizado para su identificación.

### HIPÓTESIS NULA

- La secuencia del marcador 16S rRNA de *M. huascari* no es característica de esta especie y no puede ser útil para diferenciarlo de otras especies.

## 3. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Obtener el perfil 16S rRNA de *Megalobulimus huascari* a fin de permitir su caracterización molecular y generar pautas para su conservación.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la técnica de PCR para la amplificación del gen 16S rRNA de *M. huascari* empleando *primers* específicos.
- Determinar la diversidad y divergencia genética en los niveles intra e interpoblacional de *M. huascari* mediante un segmento del gen 16S rRNA.
- Obtener la filogenia molecular a nivel poblacional de *M. huascari* mediante los haplotipos del marcador 16S rRNA.
- Evaluar la estructuración geográfica de la arquitectura genética de las poblaciones de *M. huascari*.
- Evaluar el perfil 16S rRNA de *M. huascari* como un código de barras de DNA para la caracterización molecular de esta especie.

#### 4. MARCO TEÓRICO

Las primeras descripciones realizadas en los caracoles terrestres del género *Megalobulimus* han sido realizadas en base a su concha, como se puede apreciar en la obra de Bequaert (1948). En Perú, se han venido desarrollando trabajos en algunas especies de la Familia Megalobulimidae, respecto a su biodiversidad (Ramírez *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2010b), valor etnozoológico en la Amazonia peruana (Ramírez y Cáceres, 1991), caracteres morfológicos (Ramírez *et al.*, 2008, 2009a, 2009b) y moleculares (Ramírez *et al.*, 2008, 2009a; Ramírez *et al.*, 2012), y aspectos filogenéticos (Congrains, 2010). En el Departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural de la UNMSM se vienen realizando estudios morfológicos en la especie *Megalobulimus huascari* (Ramírez *et al.*, 2010a), así como un estudio piloto a nivel molecular en dicha especie en el Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, cuyos resultados permiten sustentar la base de este proyecto.

El análisis de las secuencias de DNA es muy utilizado en estudios evolutivos, lo cual ha permitido establecer la diversidad de la vida y las relaciones evolutivas dentro de los distintos grupos (Stoeckle, 2003).

El DNA mitocondrial posee una serie de características que lo hacen muy apropiado para estudios microevolutivos. Posee una alta frecuencia de mutaciones, no sufre recombinación génica y tiene una transmisión unidireccional por vía materna a lo largo de las generaciones. Estas características nos permiten evaluar y comparar las estructuras genéticas dentro de una misma especie y entre especies cercanamente relacionadas (Brown *et al.*, 1979; Avise, 2004).

El código de barras de DNA es una técnica que permite la caracterización de especies de organismos usando una secuencia estándar de DNA. Estos códigos de barras de la vida podrían ser utilizados en diversos aspectos, como en la identificación de especies empleando pequeños fragmentos de tejido, incluso en diversos estadios de

la vida del animal. Además, pueden ser aplicados en casos en los que los métodos tradicionales son irrelevantes, permitiendo el reconocimiento de nuevas especies, dando valor a las colecciones de los museos y creando una enciclopedia *on-line* de *barcodes* de acceso público (Stoeckle, 2003).

El marcador molecular del gen mitocondrial citocromo oxidasa 1 (COI), que consiste en un segmento del mismo gen, ha sido ampliamente usado en muchos grupos de animales como código de barras genético (Hebert *et al.*, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2007) debido a su fácil secuenciamiento y contenido altamente informativo (Hebert & Gregory, 2005). Sin embargo, en algunos grupos este marcador demuestra no tener suficiente resolución en la detección de variación intraespecífica, tal es el caso de los caracoles terrestres *Megalobulimus capillaceus* (Congrains *et al.*, 2009) y *M. lichtensteini* (Ramírez *et al.*, 2009b). Frente a ello, el marcador del gen 16S rRNA surge como otra posible alternativa de *barcoding*, tal y como ha sido demostrado en anfibios (Vences *et al.*, 2005).

El marcador del gen 16S rRNA se ha probado como el más útil en el establecimiento de las relaciones filogenéticas debido a su alto contenido de información, conservación y distribución natural (Lane *et al.*, 1985), siendo empleado en muchos análisis filogenéticos, en los cuales ha permitido evaluar las estructuras genéticas dentro de una misma especie, así como generar relaciones evolutivas intra e interespecíficas. Existen muchos trabajos científicos realizados en moluscos empleando este marcador. Destaca el estudio filogeográfico del molusco *Discus macclintocki* realizado por Ross (1999). Del mismo modo, el trabajo realizado por Chiba (1999) en moluscos de islas del océano Pacífico en el que muestra su rápida evolución. Asimismo, Ramírez (2004) observó las relaciones filogenéticas de poblaciones de especies de *Bostryx* y su relación con El Niño. Romero (2008) analizó la diversidad y estructura genética de *Bostryx scalariformis*. Ramírez (2009) estableció las relaciones filogenéticas de *B. aguilari* con otros Orthalicidos del Perú. Congrains

(2010) analizó las relaciones filogenéticas en algunas especies del género *Megalobulimus*.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Marcador mitocondrial 16S rRNA**

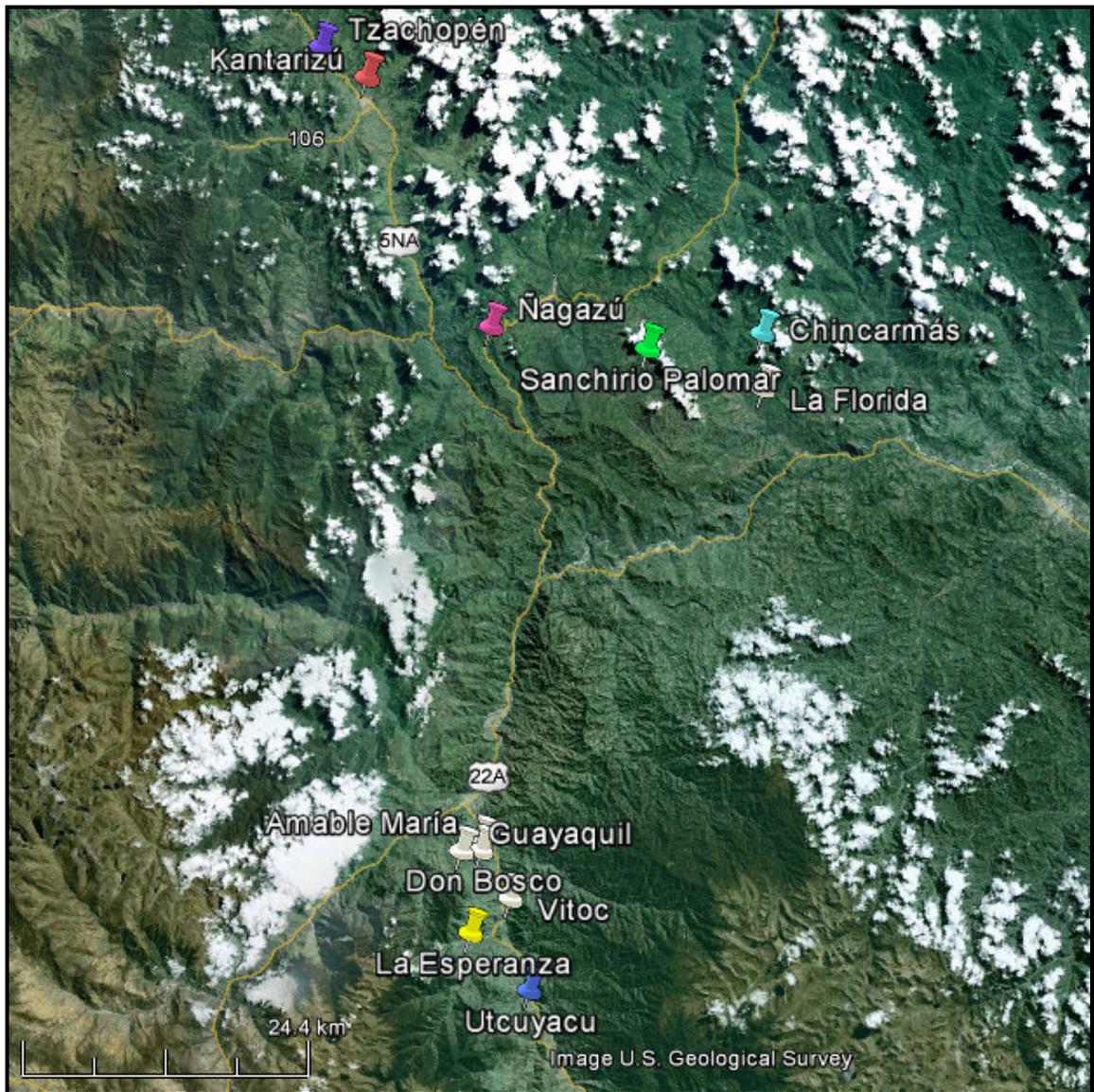
En este trabajo se empleó como marcador molecular un segmento variable de la subunidad 16S del gen RNA ribosomal (16S rRNA) que forma parte del genoma mitocondrial. Este marcador es comúnmente utilizado gracias a que tiene una función y distribución universal, una variación estimada de 1-2% de la secuencia cada 50 millones de años, es fácil de aislar y caracterizar, posee regiones tanto conservadas como variables y es comparable con otros organismos (Palumbi, 1996). Por otro lado, este marcador ya ha sido empleado con mucho éxito por el laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la FCB-UNMSM en otros miembros de la Familia Megalobulimidae.

### **5.2. Área de estudio**

Como parte del Proyecto CON-CON “Caracterización morfológica y molecular de caracoles terrestres de la Selva Central usados en alimentación y cosmética” (Cód. N°101001091) a cargo de la Dra. Rina Ramírez, se realizaron dos salidas de campo entre los meses de Febrero y Marzo de 2010, las cuales abarcaron diversos distritos de la provincia de Chanchamayo en el departamento de Junín, así como la provincia de Oxapampa en Pasco (Tabla 1, Figs. 1, 2 y 5).

**Tabla 1.** Georeferencia de las localidades de muestreo para *M. huascari*.

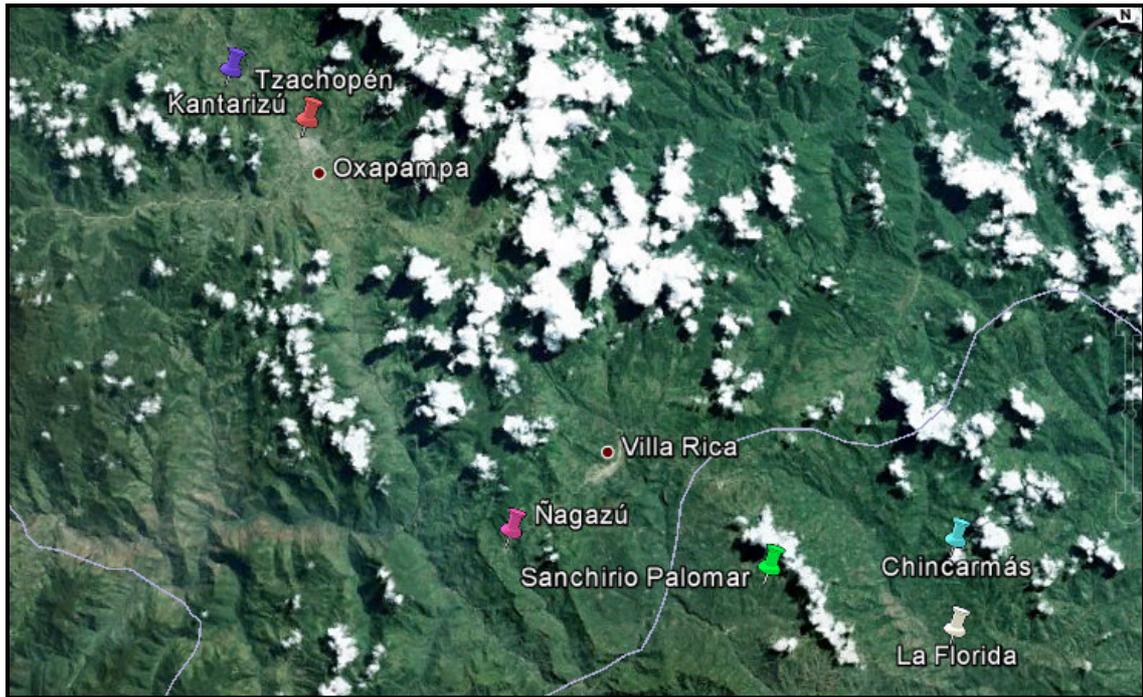
Provincia	Distrito	Localidad	Altitud (msnm)	Coordenadas	Colector	Fecha col.
Departamento de Junín - Perú						
Chanchamayo	Perené	La Florida	774	S: 10° 49' 54.9" W: 75° 06' 40.9"	Chirinos, Zuñiga y Ramírez	27/02/2010
		Alto Chincarmás	1412	S: 10° 47' 21.1" W: 75° 06' 35.0"	Chirinos, Zuñiga y Ramírez	10/04/2010
	San Ramón	Don Bosco	1293	S: 11° 10' 38.7" W: 75° 21' 18.3"	Chirinos, Zuñiga y Ramírez	02/03/2010
		Guayaquil	1672	S: 11° 10' 35.7" W: 75° 22' 12.4"	Chirinos, Zuñiga y Ramírez	02/03/2010
		Amable María	1147	S: 11° 10' 11.8" W: 75° 21' 20.4"	Chirinos, Zuñiga y Ramírez	04/03/2010
	Vitoc	Vitoc	1048	S: 11° 13' 00.5" W: 75° 20' 05.4"	Chirinos, Zuñiga y Ramírez	04/03/2010
		Utcuyacu	1674	S: 11° 17' 19.5" W: 75° 19' 29.4"	Zuñiga, Chirinos y Ramírez	04/03/2010
		La Esperanza	1671	S: 11° 14' 27.5" W: 75° 22' 02.6"	Zuñiga, Chirinos y Ramírez	05/03/2010
		San Luis de Shuaro	Sanchirio Palomar	1754	S: 10° 47' 47.2" W: 75° 12' 00.7"	Chirinos, Zuñiga y Ramírez
	Departamento de Pasco - Perú					
Oxapampa	Chontabamba	Tzachopén	1861	S: 10° 32' 50.2" W: 75° 26' 25.7"	Zuñiga	08/04/2010
		Kantarizú	1826	S: 10° 34' 22.5" W: 75° 24' 21"	Zuñiga	10/04/2010
	Villa Rica	Ñagazú	1496	S: 10° 46' 18.1" W: 75° 19' 19.0"	Zuñiga	10/04/2010



**Figura 1.** Área de estudio. Muestra la distribución de las zonas de muestreo en la Selva Central del Perú, en los departamentos de Junín y Pasco. Obtenido de Google Maps.

### ***Descripción de las localidades de muestreo***

Todas las localidades de muestreo presentaron la misma zona de vida: Bosque muy húmedo Premontano Tropical. Sin embargo, debido a la acción del hombre, estas localidades están variando su geografía. El método de muestreo empleado en las localidades fue búsqueda directa en bosques y en poblados aledaños a éstos.



**Figura 2.** Localidades de Sanchirio Palomar, Chincarmás y La Florida en Chanchamayo-Junín, y Ñagazú, Tzachopén y Kantarizú en la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco. Obtenido de Google Maps.

### ***La Florida***

El centro poblado La Florida se ubica al norte de Junín, en el distrito de Perené, provincia de Chanchamayo (Figs. 2 y 3). Esta localidad presenta la menor altitud en relación a todas las demás zonas de muestreo (774 msnm). Su principal actividad económica se basa en el cultivo de café. Las plantaciones de cafetales se encontraron cubriendo grandes extensiones de terreno en lo que años anteriores formó parte del bosque tropical. En esta localidad se halló gran diversidad de especies de caracoles terrestres: *M. thammianus*, *Solaropsis* sp., *Drepanostomella* sp., entre otros. Sin embargo, no se hallaron especímenes de *M. huascari*.

### ***Chincarmás***

La localidad de Chincarmás corresponde a un anexo del centro poblado La Florida, que como ya fue mencionado, se ubica en el distrito de Perené, provincia de

Chanchamayo (Fig. 2). Sin embargo, a diferencia de la localidad de La Florida, Chincarmás se halla a una altitud de 1412 msnm. En esta localidad se pudo hallar algunas conchas vacías, así como dos individuos vivos de la especie *M. huascari*, los cuales compartían su hábitat con la actividad ganadera de la población.



**Figura 3.** Centro Poblado La Florida, al norte de Chanchamayo, Junín-Perú. La imagen fue tomada en el fundo Santa Rosa, propiedad del señor Modesto Zuñiga.

### ***Sanchirio Palomar***

Ubicado al Norte de La Merced, en el distrito de San Luis de Shuaro, provincia de Chanchamayo, departamento de Junín (Fig. 2). Seis de los caracoles de esta localidad fueron adquiridos a través de una pobladora, la cual los criaba y reproducía en cautiverio para luego comercializarlos en la ciudad de Lima (Fig. 4). Junto a estos especímenes vivos, se obtuvo algunas conchas vacías que estaban siendo empleadas como maceteros ornamentales, así como productos de descarte luego de

consumir el cuerpo del animal. Los otros dos caracoles vivos fueron colectados en su hábitat natural cerca de un fundo aledaño.

Además, en esta localidad se colectó conchas vacías, las cuales provenían de dos diferentes zonas: Anexo General Morla en el distrito de Perené y Santa Rosa de Yapaz El Palomar en el mismo distrito de San Luis de Shuaro. Esta información sirve de evidencia para establecer un mayor número de zonas donde habita la especie *M. huascari*, lo cual servirá de punto de referencia en posteriores muestreos.



**Figura 4.** Crianza de *M. huascari* en el poblado de Sanchirio Palomar, Chanchamayo-Junín. Los caracoles son puestos en tierra y cubiertos por pastos para conservar la humedad.

### **Ñagazú**

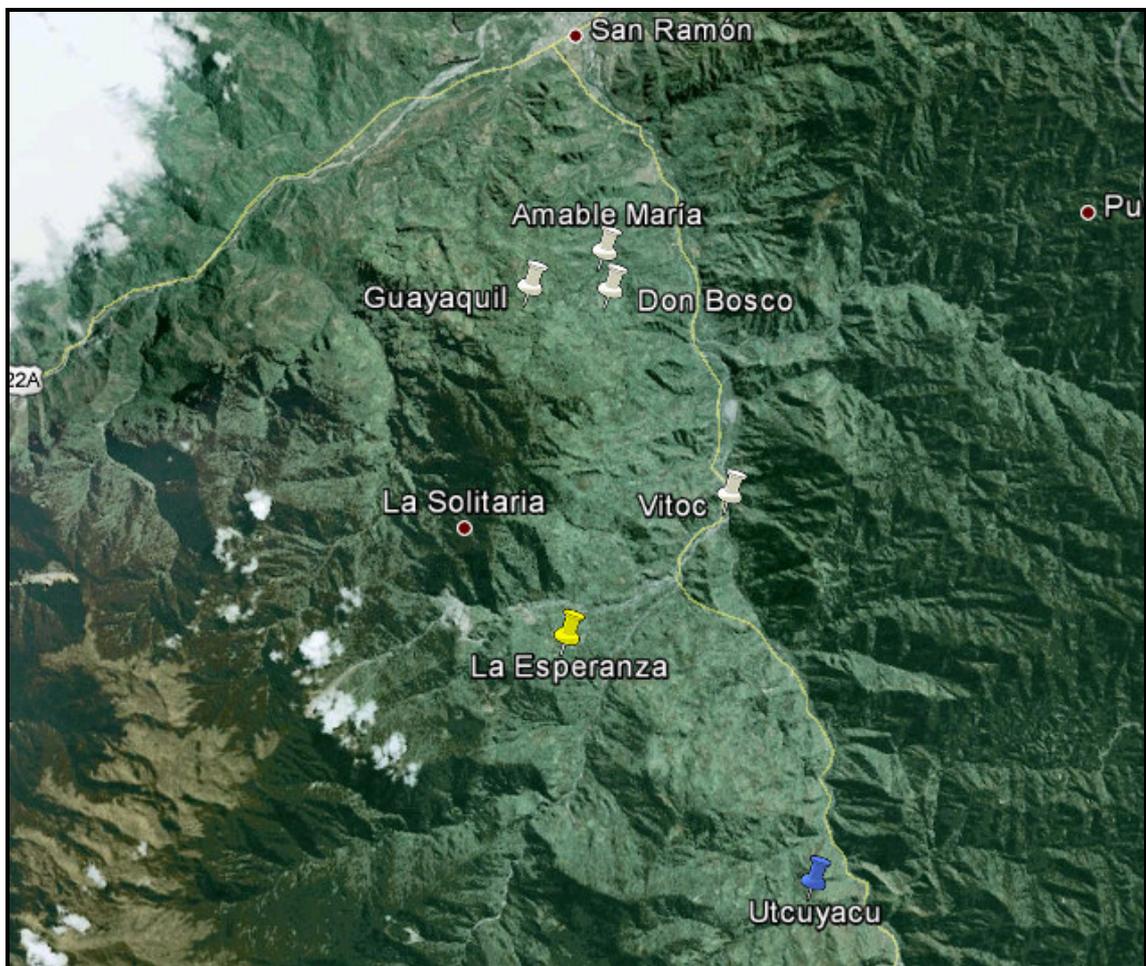
Se encuentra ubicado en el distrito de Villa Rica, provincia de Oxapampa, departamento de Pasco, y limita por el este con Sanchirio Palomar (Fig. 2). En esta localidad fueron colectados 12 especímenes a una altitud de 1496 msnm.

### ***Tzachopén***

Esta localidad se ubica en el distrito de Chontabamba, provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (Fig. 2). Dos caracoles fueron colectados en esta zona, a una altitud de 1861 msnm, la mayor en comparación con las otras seis localidades.

### ***Kantarizú***

Ubicado a 4.63km de Tzachopén en el distrito de Chontabamba, provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (Fig. 2). En esta zona sólo pudo ser colectado un caracol, el cual fue hallado desplazándose en la carretera.



**Figura 5.** Localidades de Amable María, Guayaquil y Don Bosco en el distrito de San Ramón, además, La Esperanza y Utcuyacu, ubicadas en el distrito de Vitoc, provincia de Chanchamayo, departamento de Junín. Obtenido de Google Maps.

### ***Amable María***

Esta localidad se halla ubicada muy cerca de la localidad de Don Bosco, en el distrito de San Ramón (Fig. 5). El área de muestreo correspondió a uno de los fundos de la zona en el cual la actividad agrícola había cesado hace algunos años y el bosque empezaba a tomar parte.

### ***Don Bosco***

Localidad ubicada en el distrito de San Ramón, provincia de Chanchamayo (Figs. 5 y 6). Don Bosco, es un poblado que se dedica a la actividad agrícola de especies frutales y café. En esta localidad se capturaron caracoles de las especies *M. thaminanus*, *Solaropsis* sp. y *Thaumastus* sp.



**Figura 6.** Poblado de Don Bosco, distrito de San Ramón, provincia de Chanchamayo, Junín-Perú.

### **Guayaquil**

Es un pequeño poblado ubicado cuesta arriba de la localidad de Don Bosco, aproximadamente a cuarenta minutos de camino desde este último (Fig. 5). La zona basa su economía principalmente en el cultivo de cafetales. Los especímenes colectados correspondieron a los géneros *Solaropsis*, *Systrophia* y *Thaumastus*.

### **Vitoc**

La ciudad de Vitoc se halla continuando los poblados de Amable María y Don Bosco, a través de la carretera (Fig. 5). Esta zona fue la más afectada por la mano del hombre, pues gran parte del bosque había sido depredado abriendo paso a la actividad minera. El suelo se mostraba un tanto árido y removido, por lo que no se hallaron individuos de *M. huascari*, en cambio sí algunos caracoles del género *Thaumastus*, los cuales habían sido colectados por un poblador en una zona cercana.

### **Utcuyacu**

Utcuyacu está ubicado en el distrito de Vitoc, provincia de Chanchamayo, departamento de Junín (Fig. 5). La zona se halla sobre los 1600m de altitud y es esencialmente cafetalera. Solo pudo obtenerse un espécimen de *M. huascari*, el cual semanas atrás había sido colectado por un poblador de la zona y era mantenido en cautiverio. En esta localidad se halló una gran cantidad de conchas, las cuales habían sido descartadas luego de emplear el cuerpo del animal ya sea para uso medicinal o en algún potaje. La colecta de más especímenes vivos no pudo llevarse a cabo debido a la “falta de temporada”, la cual según los habitantes de la zona es entre los meses de agosto y octubre, ya que fuera de este tiempo los animales se encuentran a mayor altura ocultos bajo tierra.

### **La Esperanza**

Al igual que la localidad de Utcuyacu, La Esperanza se ubica en el distrito de Vitoc (Figs. 5 y 7), siendo una zona dedicada en su mayoría al cultivo de especies frutales.

En esta localidad se halló 3 especímenes vivos de *M. huascari*, así como algunas conchas. La obtención del material biológico se vio dificultada debido a que se tuvo que trabajar en una zona de Selva Virgen.



**Figura 7.** Poblado de La Esperanza, al sur de Chanchamayo, Junín-Perú. La imagen fue tomada en un fundo propiedad del señor Julio Espinoza.

### **5.3. Especie en estudio: *Megalobulimus huascari***

Subclase PULMONATA

Orden STYLOMMATOPHORA

Suborden MESURETHRA

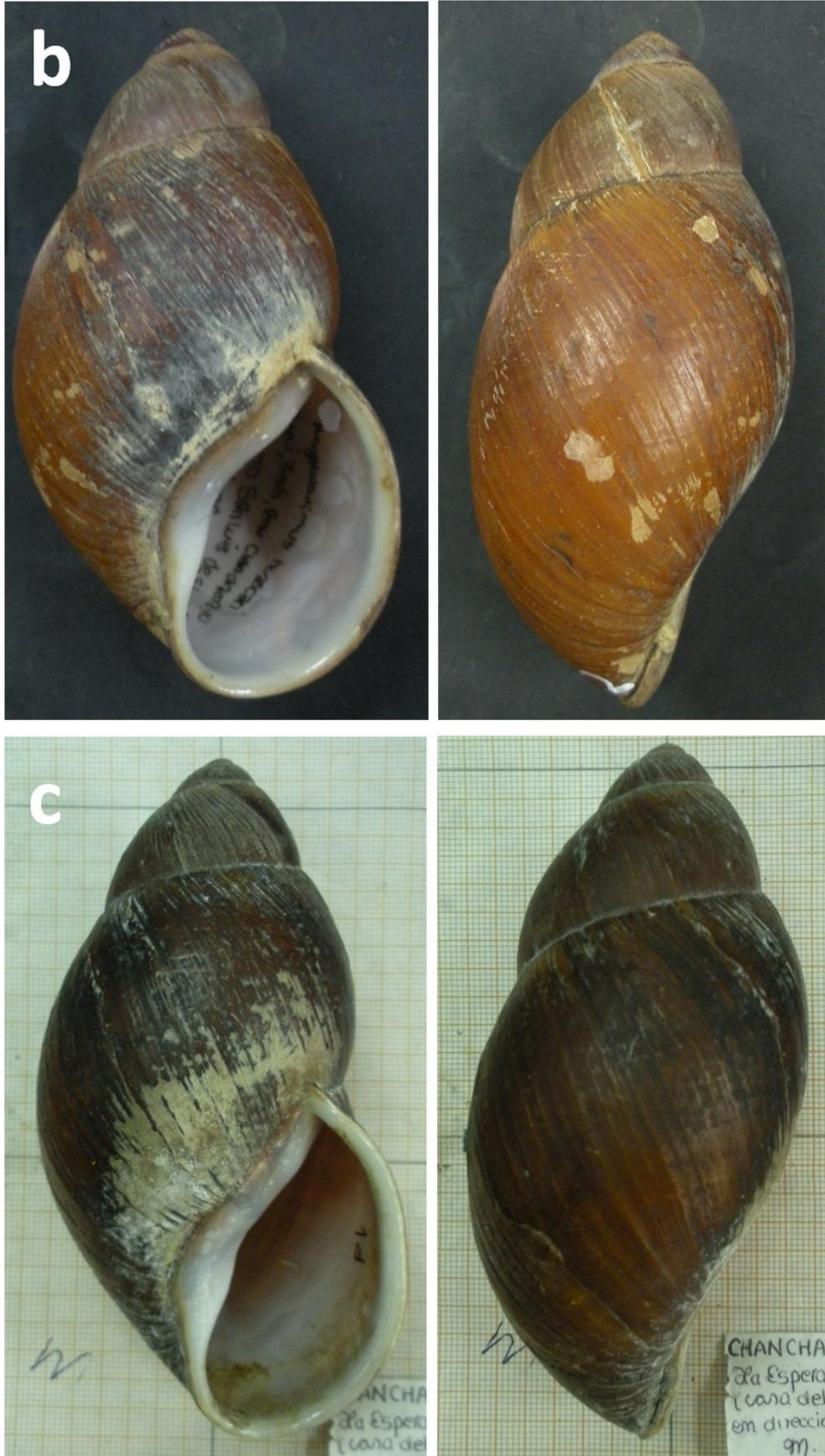
Familia MEGALOBULIMIDAE

Género *Megalobulimus*

La especie *Megalobulimus huascari* (Fig. 8) fue originalmente descrita por Tschudi (1852) como *Bulimus huascari* (apud Bequaert, 1948). Estudios posteriores realizados por Bequaert (1948) en base a las características de su concha, la clasificaron como la subespecie *Strophocheilus maximus huascari*. En la actualidad, debido a estudios realizados a nivel molecular y de parte blanda (Ramírez *et al.*, 2012), *M. huascari* es considerada como una especie independiente.



**Figura 8.** Conchas de *M. huascari* provenientes de diversas localidades de la Selva central del Perú. a) Chincarmás. b) Sanchirio Palomar. c) La Esperanza. d) Ñagazú. e) Utcuyacu. Foto: V. Borda.



**Figura 8.** Continuación.



**Figura 8.** Continuación.

#### 5.4. Grupo hermano: *Megalobulimus separabilis*

Ramírez *et al.* (2012) demostraron que la especie *M. separabilis* está cercanamente relacionada a *M. huascari*, razón por la cual fue empleada como grupo hermano en la reconstrucción de las filogenias. Se trabajó con 6 individuos de esta especie; sin embargo, solo se logró amplificar con éxito el segmento del gen 16S rRNA de dos de ellos, los cuales fueron colectados en las localidades de Ambo y Tomayquichua, Provincia de Ambo, departamento de Huánuco (Tabla 2, Fig. 9), tales individuos formaron parte de un trabajo de tesis realizado en el Laboratorio de Filogeografía y Sistemática Molecular (UNMSM), que buscó establecer las diferencias entre las especies con peristoma rojo del género *Megalobulimus* en base a los caracteres de su concha y parte blanda (Borda, 2011).



**Figura 9.** Departamento de Huánuco, hábitat natural de la especie *M. separabilis*.

Foto: V. Borda.

### 5.5. Grupo externo: *Megalobulimus capillaceus*

Además, se incluyó tres secuencias de la especie *Megalobulimus capillaceus*, las cuales fueron trabajadas por Congrains (2010) en su tesis de Biólogo Genetista Biotecnólogo (Fig. 10). Esta especie fue empleada como grupo externo en la elaboración de las filogenias. Los especímenes fueron colectados durante el 2008 en salidas de campo a diferentes distritos del departamento de San Martín, como parte del proyecto multidisciplinario “Caracterización genómica de caracoles terrestres nativos (*Megalobulimus spp.*), como un sello de garantía para especies promisorias, y caracterización química de su baba” a cargo de la Dra. Rina Ramírez.



**Figura 10.** Departamento de San Martín, hábitat natural de la especie *M. capillaceus*.

Foto: R. Ramírez & C. Calderón.

**Tabla 2.** Descripción de las zonas de muestreo de *M. separabilis*.

Departamento	Localidad	Altitud (msnm)	Coordenadas	Colector	Fecha col.
Huánuco	Ambo	2091	S: 10°07'43,0" W: 76°12'48,1"	Borda, V.	11/10/09
	Tomayquichua	2085	S: 10°06'20,2" W: 76°12'36.3"	Borda, V.	10/10/09

## 5.6. Materiales

### 5.6.1. Material biológico

Los individuos colectados fueron fijados en alcohol al 96% para su preservación y posteriormente depositados en la colección científica del Departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural de la UNMSM.

### 5.6.2. Material de Campo

Los materiales de campo fueron: carta Nacional 1:100 000, libreta de campo, pinzas, bolsas Ziploc, frascos, alcohol etílico, papel Canson, estilógrafo, GPS y cámara fotográfica.

### 5.6.3. Material de Laboratorio

Durante el proceso de extracción de DNA, fue necesario emplear: estereoscopio, refrigeradora, congeladora, microcentrífuga, pinzas de punta fina, bisturí, cuchillas, placas de Petri, mascarillas, mecheros de alcohol, tubos de 2 ml, tubos de 1.5 ml, baño María, micropipetas graduables de 50 y 1000 ul, CTAB (Bromuro de cetil-trimetil amonio), Tris/HCl 1M, NaCl 1.4M, EDTA (Ácido etilen diamino tetraacético), PVP (Polivinilpirrolidona),  $\beta$ -mercaptoetanol, proteinasa K, cloroformo, alcohol Isoamílico, etanol absoluto, acetato de Amonio 3M y agua bidestilada. Para la amplificación del DNA, se empleó: tubos de 200 y 500  $\mu$ l, micropipetas graduables de 10  $\mu$ l y 50  $\mu$ l, *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen),  $MgCl_2$  2.5 mM, dNTP 0.5 mM, *Primer Forward* 16SF-

104, *Primer Reverse* 16SR-472, congeladora y termociclador. Para poder visualizar las bandas de amplificación se requirió: agarosa, marcador de tamaño molecular GeneRuler 100bp (Fermentas), azul de Bromofenol, micropipetas graduables de 10 y 50  $\mu$ l, cámara de electroforesis submarina, fuente de poder, SYBR Green, transiluminador Safe Imager 2.0 Blue Light (Invitrogen) y cámara fotográfica. Para el proceso de secuenciamiento del DNA, que se realizó con el empleo de los productos de PCR en la compañía Macrogen (Korea), se emplearon tubos de 1500  $\mu$ l, tubos de plástico con tapa rosca para centrifuga de 50ml y plástico para embalaje. Finalmente para el análisis de datos se contó con una computadora personal con los siguientes programas bioinformáticos: Chromas, ClustalX2, DAMBE, DNAsp, PAUP, ModelTest, MEGA, Mr.Bayes, Arlequin.

## **5.7. Métodos**

### **5.7.1. Extracción de DNA total**

El proceso empleado para la extracción de DNA es una modificación del método de CTAB (Ramírez, 2004), el cual permite remover excesos de mucopolisacáridos, los que son abundantes en los caracoles y causan inhibiciones durante la amplificación (Doyle & Doyle, 1987). Para el procedimiento se requirió 2 mm<sup>3</sup> de tejido muscular de pie de caracol terrestre conservado en alcohol de 96°, la muestra de tejido era digerida con 300  $\mu$ l de 100m M Tris/HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 2% PVP 0.2%  $\beta$ -mercaptoetanol con 0.05 mg Proteinasa K, incubada a 60°C por 2 horas. Para la remoción de las proteínas se utilizó 310  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamílico (96:4), centrifugando a 13000 rpm por 15 minutos, luego de lo cual la fase acuosa era desechada. Este paso se repitió una vez más, luego de lo cual el DNA era precipitado usando 600  $\mu$ l de etanol absoluto frío y 25  $\mu$ l de Acetato de Amonio 3M, incubado a -20°C por al menos 30 min, después centrifugado a 13000 rpm por 15 min. El *pellet* obtenido, era lavado dos veces en 1 ml de alcohol absoluto y luego centrifugado a

13000 rpm por 15 min. Finalmente, el *pellet* era secado a temperatura ambiente por 24 horas para luego ser resuspendido en 50  $\mu$ l de agua bidestilada, siendo finalmente conservado a -20 °C (Ramírez, 2004).

### **5.7.2. Amplificación de DNA**

Para la amplificación del marcador 16S rRNA mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) se utilizó los *primers* desarrollados por Ramírez (2004): 16S-F104 (5'-GACTGTGCTAAGGTAGCATAAT-3') y 16S-R472 (5'-TCGTAGTCCAACATCGAGGTCA-3'). Cada reacción fue trabajada en un volumen total de 25  $\mu$ l el cual contenía 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM dNTP y 400 nM del primer a utilizar y 3  $\mu$ l de DNA extraído. Los ciclos de amplificación fueron: Denaturación a 94°C por 30 segundos, hibridación de los *primers* a 48°C por 30 segundos, y extensión a 72°C durante 60 segundos, por 40 ciclos. Como control de la amplificación se empleó 3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada en vez del DNA, manteniendo tal cual los demás componentes.

### **5.7.3. Visualización de DNA**

Se realizó una electroforesis submarina en Gel de Agarosa al 1% diluida en tampón de corrida (TBE), utilizando 4.5  $\mu$ l de la muestra amplificada y 1  $\mu$ l de Azul de Bromofenol. Las muestras amplificadas, la muestra control y un marcador de tamaño molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) son cargadas en el gel y se procede a la corrida. Eventualmente en lugar del marcador de tamaño molecular se cargaron muestras positivas de amplificaciones anteriores. Luego de la corrida se procedió a la tinción con SYBR Green, observándose las bandas en el transiluminador Safe Imager 2.0 Blue Light de la empresa Invitrogen. El gel fue fotografiado con una cámara digital para comprobar la amplificación por PCR. En el caso de aparición de más de una banda por muestra, la temperatura de hibridación fue reevaluada.

#### **5.7.4. Secuenciamiento de DNA**

El secuenciamiento del marcador 16S rRNA de las poblaciones de la especie *M. huascari* fue realizado a partir de los mejores productos de las amplificaciones obtenidas por la reacción en cadena de la polimerasa. Para ello se utilizaron los servicios de la compañía coreana Macrogen Inc.; se enviaron 20 µl de cada amplificado y se solicitó purificación seguida de dos reacciones de secuenciamiento por amplicón, para obtener secuencias de ambas hebras del DNA.

#### **5.7.5. Edición y alineamiento múltiple de secuencias**

Las secuencias obtenidas en formato ABI fueron primero evaluadas y editadas para corregir errores de lectura con la ayuda de los electroferogramas en el programa Chromas (McCarthy, 1996). Luego se procedió a obtener la secuencia consenso con ayuda del programa CAP3WIN (Huang & Madan, 1999). La secuencia consenso obtenida fue guardada en un archivo de texto simple en formato FASTA. Para verificar que las secuencias obtenidas eran las esperadas, se utilizó la herramienta Blast (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) de la Base de Datos del GenBank, NCBI (Benson *et al.*, 2011). Luego de su verificación, las secuencias fueron sometidas a un alineamiento global con el programa ClustalX2 (Larkin *et al.*, 2007).

#### **5.7.6. Caracterización de las secuencias**

La estimativa de frecuencia de bases fue realizada por medio del programa DAMBE (Xia & Xie, 2001), aquí también se realizó la gráfica del número de transiciones y transversiones que ocurren entre cada combinación de secuencias a pares para evaluar el grado de saturación mutacional. Se utilizó en conjunto los programas PAUP\* 4.10b (Swofford, 1998) y Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) para hallar el mejor modelo de sustitución nucleotídica que se ajuste a los datos empleando el método de información de Akaike, según lo recomendado por Posada & Buckley (2004). El polimorfismo de secuencias nucleotídicas, incluyendo el número de sitios

polimórficos (sitios variables), diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica se realizó en el programa DNAsp (Rozas *et al.*, 2003).

#### **5.7.7. Diversidad genética**

El número de haplotipos, así como los valores de diversidad haplotípica ( $H_d$ ) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) (Nei, 1987) fueron determinados usando el programa DNAsp (Rozas *et al.*, 2003). Los sitios de información parsimoniosa y sitios conservados de las secuencias fueron obtenidos a través del programa MEGA (Tamura *et al.*, 2007).

#### **5.7.8. Distancia genética**

La distancia genética calculada entre las especies, así como la determinada dentro y entre cada población se realizó con el programa MEGA (Tamura *et al.*, 2007). Los análisis para obtener las distancias fueron realizados usando el promedio de sustituciones por sitio entre las secuencias o a partir del promedio de todas las secuencias de cada grupo. El análisis tomó en cuenta todas las posiciones y empleó el *Maximum Composite Likelihood method*. A partir de estas distancias se construyó un dendrograma de similitud en MEGA usando el algoritmo *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA).

#### **5.7.9. Análisis filogenético**

Los análisis filogenéticos se realizaron en base a tres metodologías diferentes, para los cuales se empleó un grupo hermano (*M. separabilis*) y un grupo externo (*M. capillaceus*).

Se reconstruyó las relaciones filogenéticas de *M. huascari* con diferentes métodos filogenéticos. El programa MEGA permitió obtener una filogenia en base a distancias empleando el método *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) y el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980). Para determinar

estadísticamente la consistencia de los nodos se realizó una prueba no paramétrica de *bootstrap* con 1000 réplicas.

El análisis de Máxima Parsimonia (MP) se realizó en el programa PAUP\* (Swofford, 1998). La evaluación de la topología encontrada se realizó con un *bootstrap* de 1000 réplicas.

El análisis de Máxima Verosimilitud (ML) fue también realizado en PAUP\* según los datos propuestos por el programa Modeltest (Posada y Crandall, 1998) seleccionando el modelo adecuado según el criterio de información de Akaike (AIC) (Posada y Buckley, 2004). El modelo elegido por Modeltest para las secuencias del marcador 16S rRNA fue GTR + I (Lanave *et al.*, 1984), GTR son las siglas de “*general time reversible*”, modelo que asume frecuencias diferentes para las bases nucleotídicas, y diferencias en las tasas de sustitución para cada par de bases, la letra I indica que el programa asumirá la presencia de sitios invariantes dentro del alineamiento. La evaluación del soporte de los clados se realizó con 100 réplicas de *bootstrap* debido al esfuerzo computacional necesario para la obtención del árbol.

La observación de los árboles generados por el programa PAUP\* (MP, ML) se realizó empleando el programa TreeView (Page, 1996).

El análisis de inferencia bayesiana (BI) se realizó con la ayuda del programa Mr.Bayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) utilizando los parámetros propuestos por el Modeltest y evaluando las topologías mediante el algoritmo *Metropolis Coupled Monte Carlo Markov Chain* (MCMCMC), utilizando 4 cadenas de Markov con 3'000.000 generaciones cada una. Luego de observar la distribución de probabilidades de los árboles se realizó un *burning* (eliminando algunas hipótesis) de 9001 árboles, el consenso de los árboles restantes (cuya probabilidad es la más alta) se observó de igual forma empleando TreeView.

Para todos los análisis filogenéticos realizados con los programas PAUP\* y Mr.Bayes se especificó como grupo externo las secuencias de la especie *M. capillaceus*.

#### **5.7.10. Network**

La red de haplotipos o *network* para las secuencias del marcador 16S rRNA obtenidas de *M. huascari* fue realizada con el programa NETWORK (Bandelt *et al.*, 1999) empleando el algoritmo *median joining*.

El método de redes de haplotipos es otra forma de encontrar relaciones filogenéticas entre las secuencias, en el cual se generan árboles no enraizados para observar las relaciones entre los haplotipos y sus frecuencias. Este análisis permite observar visualmente patrones demográficos y de flujo génico. Al no necesitar árboles enraizados en este análisis, se prescindió de los individuos usados como grupo hermano y grupo externo.

#### **5.7.11. Análisis genético poblacional**

##### **a. Prueba *Fst***

La evaluación de la diferenciación poblacional y flujo génico fue realizada en el programa Arlequín (Schneider *et al.*, 2000) mediante el cálculo del estadístico *Fst*. La diferenciación indica restricción de flujo génico entre las poblaciones. Valores cercanos a 1 indican una mayor diferenciación entre las poblaciones mientras que valores cercanos a 0 indican poblaciones más homogéneas.

##### **b. AMOVA**

Asimismo, el programa Arlequín (Excoffier *et al.*, 2005) fue empleado para evaluar la variación genética dentro y entre los grupos a través del test de AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992). En el primer análisis, las secuencias fueron agrupadas de acuerdo a las localidades de colecta mientras que en el segundo análisis, las secuencias fueron agrupadas en linajes.

### **c. Test de Mantel**

Para el análisis de estructura geográfica de la arquitectura genética se elaboró una matriz de distancias geográficas de a pares entre las localidades a partir de las coordenadas geográficas. Se empleó la prueba Test de Mantel del programa Arlequín, la cual permitió analizar el grado de correlación entre la matriz de distancias genéticas y la de distancias geográficas para las poblaciones de *M. huascari*, a partir de 100000 permutaciones. El resultado de este test puede ser usado para rechazar la hipótesis de que el proceso que generó el primer set de distancias es independiente del proceso que generó el segundo set.

### **5.7.12. Análisis demográfico**

#### **a. Pruebas de modelo neutro**

La teoría de mutación neutral propuesta por Moto Kimura (1968) señala que la mayoría de los cambios son fijados por deriva genética y son adaptativamente neutros, es decir, que no van a ser afectados por la selección natural. Los métodos estadísticos más conocidos para probar la hipótesis de la mutación neutral son los test de Tajima (Tajima, 1989) y  $F_s$  de Fu (Fu, 1997).

#### ***Test de Tajima***

Descrito por Tajima en 1989, compara los estimadores de número de sitios segregantes, el cual se ve afectado por el tamaño de la muestra como por los alelos de menor frecuencia, y el de promedio del número de diferencias a pares, que es afectado en mayor medida por los alelos más frecuentes y es independiente por el tamaño muestral. Un valor de  $D^*Tajima > 0$  sugiere un reciente cuello de botella poblacional o alguna forma de selección balanceada, mientras que un valor de  $D^*Tajima < 0$  sugiere expansión poblacional o selección purificante.

## **Test $F_s$ de Fu**

Yun-xin Fu (1997) propone un estadístico basado en el modelo de sitios infinitos de mutación. El cual sugiere estimar la probabilidad de observar una muestra al azar con un número de alelos igual o más pequeño que el valor observado y la asunción de que todos los alelos son selectivamente neutros. Un valor negativo de  $F_s$  es evidencia de un exceso del número de alelos, lo cual se esperaría de una reciente expansión o de un *hitchhiking* genético<sup>1</sup>. Un valor positivo es evidenciado por una deficiencia de alelos, lo cual se esperaría de un reciente cuello de botella poblacional o de una selección sobredominante. La importancia de este test radica en su eficacia especial para determinar casos de expansión poblacional, incluso es considerado un indicador más sensitivo que  $D'$ Tajima. El programa Arlequin fue empleado para calcular las pruebas de modelo neutro, así como sus correspondientes *p-values*, a fin de detectar existencia de expansión poblacional o cuello de botella.

### **b. Mismatch distribution**

El *mismatch distribution* es un histograma del número de diferencias de las secuencias de DNA de una población entre todos los posibles pares de secuencias en la muestra. Estas diferencias son graficadas contra sus frecuencias (Harpending *et al.*, 1998). La gráfica producida por los datos se compara con el modelo de una población con expansión repentina.

El programa DNAsp permitió realizar la gráfica de *mismatch distribution*, para lo cual primero se deben obtener los parámetros de expansión demográfica. El programa Arlequin fue empleado para estimar los parámetros Theta inicial ( $\theta_0$ , antes del crecimiento o declive de la población), Theta final ( $\theta_1$ , después del crecimiento o declive) y Tau ( $\tau$ , dato del crecimiento o declive) (Rogers & Harpending, 1992; Rogers, 1995) calculados en unidades de tiempo mutacional, como sigue:  $\theta_0$  y  $\theta_1=2N_eu$  y  $\tau=2ut$ ,

---

<sup>1</sup> *Hitchhiking* genético ocurre cuando surge una mutación favorable e incrementa hasta fijarse, esto otorga una ventaja fortuita a todos los genes con los que estaba asociado originalmente (Maynard Smith and Haigh, 1974).

donde  $N_e$  es el tamaño efectivo de la población,  $u$  es la tasa de mutación por secuencia por año y  $t$  es el tiempo en años.

Por lo general las poblaciones que presentan una distribución multimodal están en equilibrio demográfico (tamaño más o menos constante de una población a través de las generaciones) y, por el contrario, cuando es unimodal podría indicar que ha pasado por una reciente expansión demográfica (gran crecimiento poblacional en pocas generaciones) o con un amplio rango de expansión teniendo altos niveles de migración entre las poblaciones vecinas, inmediatamente después de un cuello de botella genético (Rogers & Harpending, 1992; Slatkin & Hudson, 1991; Ray *et al.*, 2003; Excoffier, 2004).

#### **5.7.13. Perfil 16S rRNA de *M. huascari***

Para realizar el análisis de código de barras de DNA utilizando el marcador 16S RNA ribosomal, se debe tener en cuenta que los perfiles 16S: 1) deben ser únicos para la especie *M. huascari* (no debe repetirse con especies diferentes), 2) los haplotipos de la especie deben resultar en una monofilia (deben pertenecer a un mismo clado/grupo) y 3) debe existir una distancia genética intraespecífica menor al 1% (Vences *et al.*, 2005).

Para verificar que el perfil 16S rRNA obtenido en este estudio sea específico para *Megalobulimus huascari*, las secuencias nucleotídicas fueron confrontadas con la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), para lo cual se empleó el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

El *Neighbor-Joining* (NJ) es un método que permite la identificación de especies en una gran escala, siendo empleado en este punto como un enfoque efectivo en la determinación del *DNA barcoding* (Lukhtanov *et al.*, 2009).

## 6. RESULTADOS

La información de las secuencias de DNA no sólo permite inferir relaciones filogenéticas y caracterizar molecularmente, sino también provee un eficiente método para la identificación a nivel de especies. Los análisis llevados a cabo en este estudio en base al marcador 16S rRNA permitirán determinar entre otros, si la metodología del código de barras de DNA (*DNA barcoding*) puede distinguir eficientemente a la especie *M. huascari*.

### 6.1. Distribución geográfica de la especie

Las referencias originales de distribución geográfica mencionadas en el presente trabajo para *M. huascari* (Tschudi, 1852) corresponden al trabajo realizado por Bequaert (1948), en el cual se señala como localidad tipo a “Perú: vertientes orientales de los Andes entre los Ríos Chanchamayo y Tulumayo”, así como otras localidades ahora ampliamente habitadas (Tabla. 3). Sin embargo, debido a la generalidad en la descripción de estas localidades, así como al fuerte impacto que éstas han sufrido a lo largo de los años a causa de la actividad humana, la colecta de los especímenes para este trabajo tuvo que realizarse en localidades específicas que mostraran al menos cierto grado de vegetación (Tabla 3). Las únicas localidades donde caracoles de la especie *Megalobulimus huascari* fueron encontradas en el desarrollo de la presente tesis corresponden a Sanchirio Palomar, Ñagazú, Chincarmás, La Esperanza, Utcuyacu, Tzachopén y Kantarizú.

Los especímenes de *M. huascari* (Fig. 11.A.) fueron encontrados a altitudes entre los 1412 y 1861 msnm (Tabla 3), viviendo, en la mayoría de los casos, en simpatría con individuos del género *Thaumastus* (Fig. 11.B.), los cuales presentaron una abundancia en relación de 10 a 1 con respecto a *M. huascari*.



**Figura 11.** A. Individuos de la especie *M. huascari* encontrados en la localidad de Utcuyacu, Distrito de Vitoc, provincia de Chanchamayo, Junín. B. Individuo del género *Thaumastus* hallado junto a *M. huascari* en la localidad de La Esperanza, distrito de Vitoc, provincia de Chanchamayo, Junín.

Todas las localidades de registro para *M. huascari* corresponden a la zona de vida denominada “Bosque muy Húmedo Premontano Tropical” (Fig. 12). Una de las localidades mencionadas por Bequaert (1948), “Montaña a 8 millas al sur de Eten”,

localizada en el departamento de Lambayeque, corresponde a zona desértica, por lo que esta localidad correspondería a un registro errado.

**Tabla 3.** Localidades de registro para *M. huascari* (X). Se presenta las localidades de Bequaert (1948) <sup>(1)</sup>, así como, todas las localidades muestreadas en el presente estudio <sup>(2)</sup>.

Provincia	Distrito	Localidad	Altitud	Registro
<b>DEPARTAMENTO DE JUNÍN - PERÚ</b>				
Chanchamayo	Chanchamayo (La Merced)	Río Toro (cerca a Chanchamayo) <sup>(1)</sup>	1300	X
	Perené	La Florida <sup>(2)</sup>	774	-
		Alto Chincarmás <sup>(2)</sup>	1412	X
	San Luis de Shuaro	Sanchirio Palomar <sup>(2)</sup>	1754	X
	San Ramón	Don Bosco <sup>(2)</sup>	1293	-
		Guayaquil <sup>(2)</sup>	1672	-
		Amable María <sup>(2)</sup>	1147	-
	Vitoc	Vitoc <sup>(2)</sup>	1048	-
		Utcuyacu <sup>(2)</sup>	1674	X
		La Esperanza <sup>(2)</sup>	1671	X
	?		Valle Chanchamayo <sup>(1)</sup>	1000-1400
<b>DEPARTAMENTO LAMBAYEQUE - PERÚ</b>				
?	?	Montaña a 8 millas al sur de Eten <sup>(1)</sup>	X (?)	X (?)
<b>DEPARTAMENTO DE PASCO - PERÚ</b>				
Oxapampa	Chontabamba	Tzachopén <sup>(2)</sup>	1861	X
		Kantarizú <sup>(2)</sup>	1826	X
	Huancabamba	Huancabamba <sup>(1)</sup>		X
	Villa Rica	Ñagazú <sup>(2)</sup>	1496	X
		Oxapampa <sup>(1)</sup>		X

?: Localidad en ambiente desértico, muy diferente a todas las otras localidades donde fue registrada *M. huascari*.



**Figura 12.** Distribución geográfica de la especie *M. huascari* (★) en los departamentos de Junín y Pasco. ●: Localidades muestreadas en el presente estudio. ■: Localidades registradas por Bequaert.

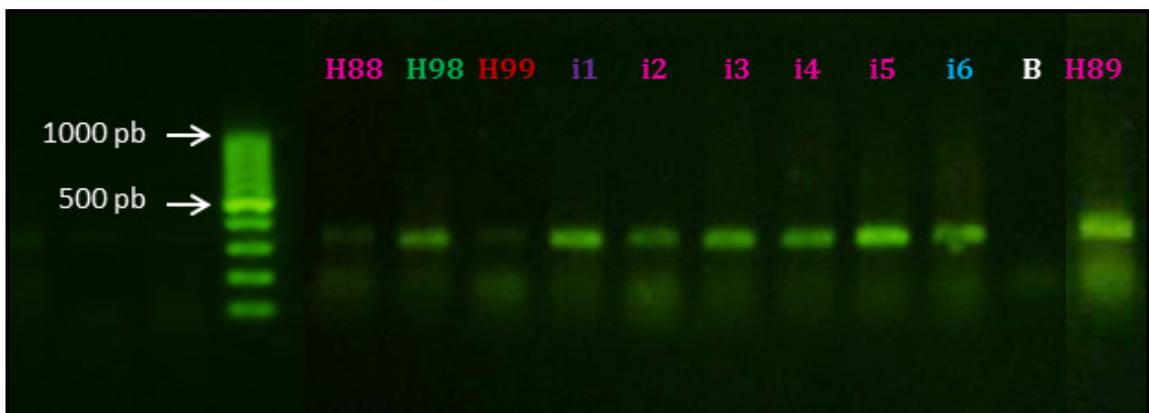
El área de colecta abarcó aproximadamente 100 kilómetros lineales. Tales distancias entre los puntos de colecta de la especie *M. huascari* se presentan a continuación en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Distancia lineal (en kilómetros) entre las localidades de muestreo.

	La Esperanza	Utcuyacu	Sanchirio P.	Chincarmás	Ñagazú	Tzachopén	Kantarizú
La Esperanza	0.00						
Utcuyacu	7.22	0.00					
Sanchirio P.	50.66	54.43	0.00				
Chincarmás	57.25	60.05	10.16	0.00			
Ñagazú	52.16	57.19	13.97	32.15	0.00		
Tzachopén	77.11	83.01	39.32	44.94	28.19	0.00	
Kantarizú	73.99	79.64	34.69	40.27	23.82	4.63	0.00

## 6.2. Estandarización de protocolos de extracción y amplificación de DNA

Los protocolos de extracción y amplificación empleados para el marcador mitocondrial 16S rRNA permitieron obtener secuencias inmejorables de 31 individuos, las cuales no presentaron problemas de identificación de bases. En un principio, se eligió trabajar con otro marcador mitocondrial (COI), sin embargo, no se logró obtener resultados satisfactorios en el proceso de amplificación. La visualización de las amplificaciones del gen 16S rRNA para las especies *M. huascari* y *M. separabilis* permitió evidenciar bandas de una longitud aproximada de 300 pares de bases, sin presencia de bandas inespecíficas en ninguna de las especies en evaluación (Fig.13).



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa de amplificados del marcador 16S rRNA de la especie *Megalobulimus huascari*. En la parte superior se indica el código de las muestras empleadas en la presente tesis.

### 6.3. Caracterización de las secuencias del marcador mitocondrial 16S rRNA

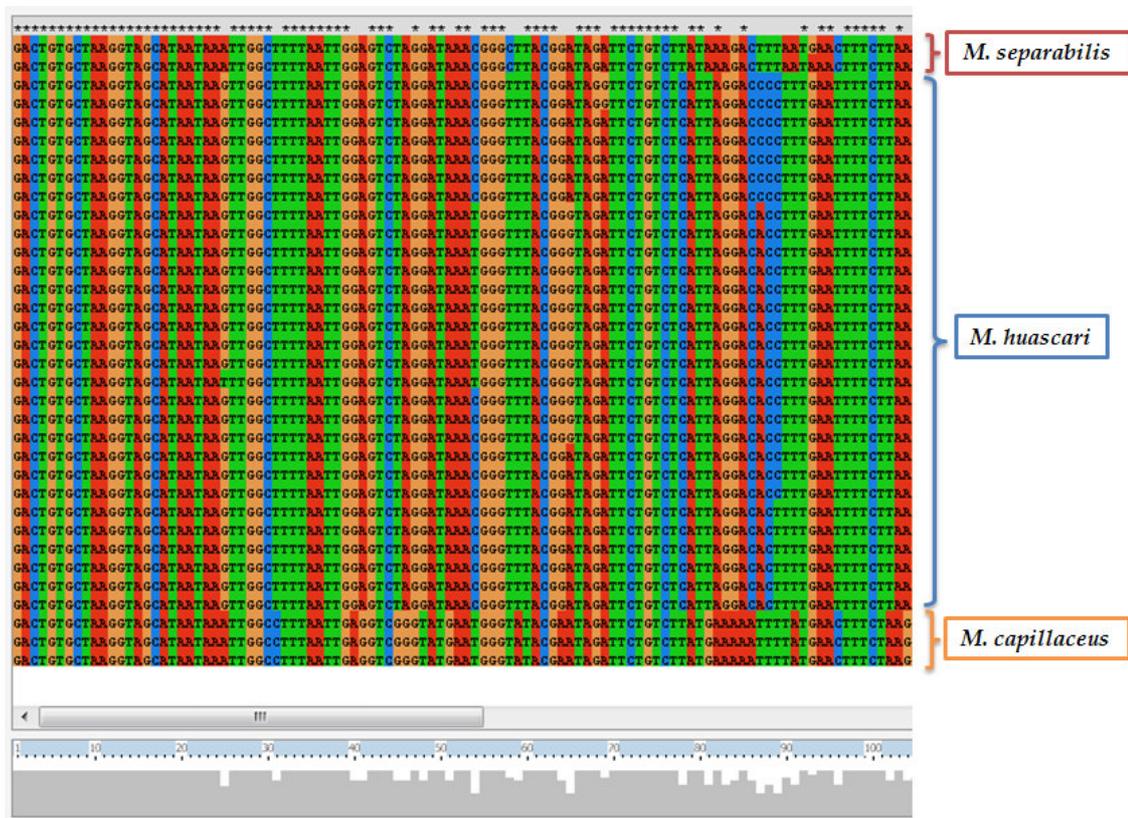
Se obtuvo un total de 29 secuencias para el marcador 16S rRNA de *M. huascari* y 2 para el grupo hermano *M. separabilis* (Tabla 5). Además se utilizaron 3 secuencias de *M. capillaceus* obtenidas por Congrains (2010).

**Tabla 5.** Lista de las secuencias obtenidas en este estudio, según la localidad de procedencia. N, número de secuencias.

<b>Especie</b>	<b>Departamento</b>	<b>Localidad (Abreviación)</b>	<b>N</b>
<b><i>M. huascari</i></b>	Junín	Utcuyacu (Utc)	1
		La Esperanza (JLE)	3
		Sanchirio Palomar (JSP)	8
		Chincarmás (Chi)	2
		Ñagazú (Ñag)	12
	Pasco	Tzachopén (Tza)	2
		Kantarizú (Kan)	1
<b>Subtotal</b>			<b>29</b>
<b><i>M. separabilis</i></b>	Huánuco	Ambo	1
		Tomayquichua	1
	<b>Subtotal</b>		
<b>Total</b>			<b>31</b>

El alineamiento de las 29 secuencias de *M. huascari*, junto a las 2 de *M. separabilis* y 3 de *M. capillaceus* (total: 34 secuencias), constó de 333 pb con 257 sitios conservados y 72 parsimoniosamente informativos (Figs. 14, 15 y 16, Tabla 6). Se observó la presencia de *gaps*, es decir, sitios con inserciones/deleciones (indels). El alineamiento presentó tres grupos bien estructurados, cuyas diferencias permitieron separar a las tres especies en estudio.

El extremo 5' del alineamiento presenta cierto grado de conservación sin presencia de indels (Fig. 14).

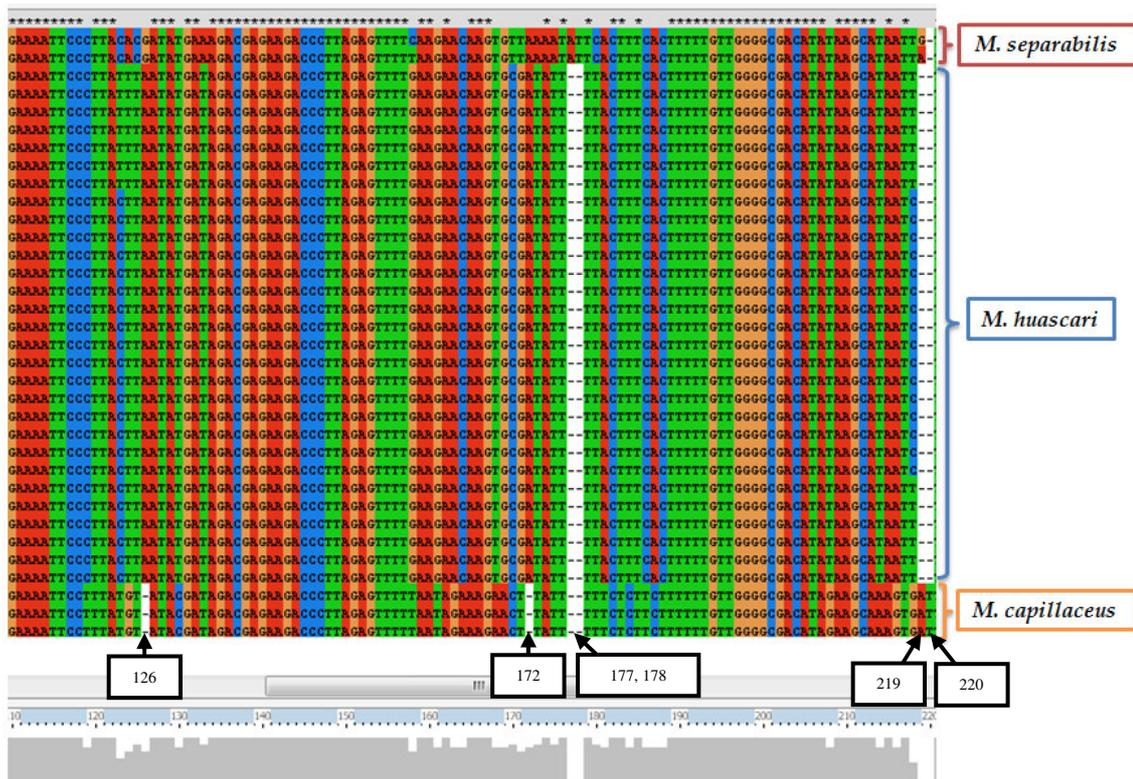


**Figura 14.** Extremo 5' del alineamiento múltiple de las secuencias del marcador mitocondrial 16S rRNA, observada mediante el programa Clustal2X. Las 22 primeras bases nitrogenadas corresponden al primer 16S-F104.

La segunda sección del alineamiento mostró dos deleciones de adenina (A) para las secuencias de *Megalobulimus capillaceus* en las posiciones 126, 172. Por otro lado,

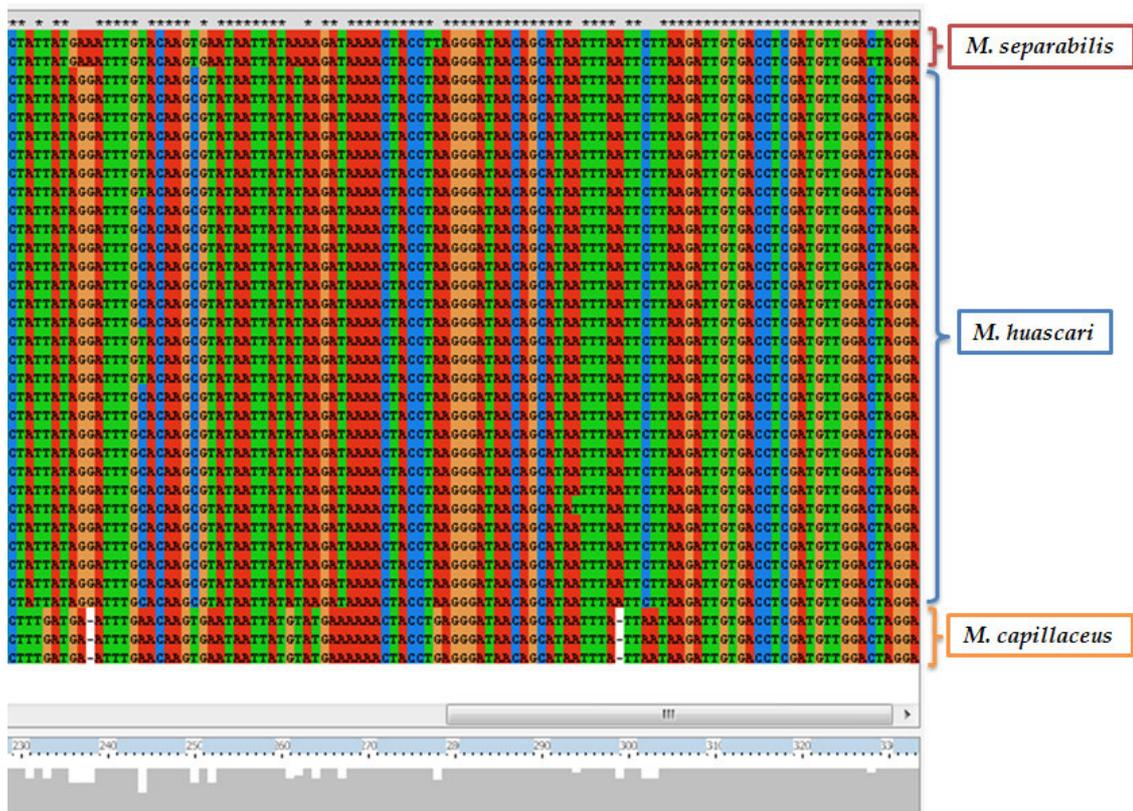
las secuencias de *M. separabilis* mostraron inserción de adenina (A) y timina (T) en las posiciones 177 y 178 respectivamente.

En la posición 219 se observa la inserción de purinas para *M. separabilis* y *M. capillaceus* (ver flecha, Fig. 15), así como la inserción de timina (T) para *M. capillaceus* en la siguiente posición (Fig. 15).



**Figura 15.** Porción central del alineamiento múltiple de secuencias del marcador mitocondrial 16S rRNA. Nótese la formación de los primeros *gaps* entre las secuencias de *M. capillaceus*.

El extremo 3' del alineamiento mostró la delección de adenina y guanina para las secuencias de *M. capillaceus* en las posiciones 238 y 299 (Fig. 16). Así como en esta porción, a lo largo del alineamiento se observó la mayor disimilitud de las secuencias de *M. capillaceus* con las de las otras dos especies. La razón de esta diferencia es el mayor número de delecciones en las secuencias de *M. capillaceus* con respecto a las de *M. huascari* y *M. separabilis*.



**Figura 16.** Extremo 3' del alineamiento múltiple de secuencias. Las últimas 22 bases nitrogenadas corresponden al primer 16S-R472.

En general, se observó un alto grado de conservación dentro del grupo de las secuencias formadas por los especímenes de *M. huascari*. Se encontró un total de 10 mutaciones, hallándose una mayor proporción de transiciones en relación a las transversiones. Las transiciones fueron C → T en las posiciones 54, 89, 123, 218, 222 y 244; y A → G en las posiciones 65 y 69. Sólo dos transversiones fueron halladas: A/G → T en la posición 25, y finalmente A → C en la posición 87 (Tabla 6).

**Tabla 6.** Sitios polimórfico informativos al analizar el conjunto total de secuencias del gen mitocondrial 16S rRNA obtenidas para *M. huascari*, *M. separabilis* y *M. capillaceus*. Los números de la primera columna indican la posición de los nucleótidos en el alineamiento.

Individuo	Haplotipo	2	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5	6	6	6	7	8	8	8	8	8	8	8	9	9	
		5	1	0	1	5	6	8	1	4	8	9	4	5	9	8	1	3	4	6	7	8	9	0	1	
1 Mhua-JLE-cN45	H1	G	T	G	A	T	A	G	A	C	T	T	G	A	G	C	T	G	G	C	C	C	C	T	T	
2 Mhua-JLE-ci12	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3 Mhua-Tza-cN61	H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4 Mhua-Tza-ci1	H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5 Mhua-Kan-cH99	H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6 Mhua-JLE-cN46	H3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7 Mhua-Utc-cN55	H3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8 Mhua-Nag-ci2	H4	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
9 Mhua-Nag-ci3	H4	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
10 Mhua-Nag-ci4	H4	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
11 Mhua-Nag-cH91	H4	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
12 Mhua-Nag-cH82	H4	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
13 Mhua-Nag-cH85	H4	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
14 Mhua-Nag-cH88	H4	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
15 Mhua-JSP-cN50	H5	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
16 Mhua-JSP-cH98	H5	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
17 Mhua-JSP-cN54	H6	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
18 Mhua-Nag-cH81	H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
19 Mhua-Nag-cH89	H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
20 Mhua-Nag-cH86	H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
21 Mhua-Chi-cH80	H8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
22 Mhua-Chi-ci6	H8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
23 Mhua-JSP-cN53	H8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
24 Mhua-JSP-cN48	H9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
25 Mhua-JSP-cN51	H10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.
26 Mhua-Nag-ci5	H10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.
27 Mhua-Nag-cH90	H10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.
28 Mhua-JSP-cN52	H10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.
29 Mhua-JSP-cN47	H10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.
30 Msep-HuA-cN36	Msep1	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	T	A	A	.	.	T	T	T	A	A	
31 Msep-Hua-cK90	Msep2	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	T	A	A	.	.	T	T	T	A	A	
32 M cap-Tar-cM19	Mcap	A	C	A	G	G	G	T	G	T	.	A	A	.	A	T	G	A	A	A	T	T	T	.	A	
33 Mcap-Sap-cM61	Mcap	A	C	A	G	G	G	T	G	T	.	A	A	.	A	T	G	A	A	A	T	T	T	.	A	
34 Mcap-Moy-cM16	Mcap	A	C	A	G	G	G	T	G	T	.	A	A	.	A	T	G	A	A	A	T	T	T	.	A	



**Tabla 6 (Continuación)**

Individuo	Haplotipo	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3		
		8	8	8	8	0	1	1	1	2	3	3	3	3	3	4	5	5	6	6	6	6	7	0	0
		4	6	7	8	8	4	6	8	2	1	3	6	7	8	4	0	2	1	2	4	7	8	2	3
1 Mhua-JLE-cN45	H1	T	C	A	C	T	T	A	T	T	A	T	A	G	G	T	C	T	A	T	A	T	A	C	T
2 Mhua-JLE-ci12	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	G	G	.	C	T	.	T	.	.	A	.	.
3 Mhua-Tza-cN61	H2	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	G	G	.	C	T	.	T	.	.	A	.	.
4 Mhua-Tza-ci1	H2	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	G	G	.	C	T	.	T	.	.	A	.	.
5 Mhua-Kan-cH99	H2	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	G	G	.	C	T	.	T	.	.	A	.	.
6 Mhua-JLE-cN46	H3	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	G	G	.	C	T	.	T	.	.	A	.	.
7 Mhua-Utc-cN55	H3	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	G	G	.	C	T	.	T	.	.	A	.	.
8 Mhua-Nag-ci2	H4	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
9 Mhua-Nag-ci3	H4	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
10 Mhua-Nag-ci4	H4	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
11 Mhua-Nag-cH91	H4	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
12 Mhua-Nag-cH82	H4	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
13 Mhua-Nag-cH85	H4	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
14 Mhua-Nag-cH88	H4	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
15 Mhua-JSP-cN50	H5	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	.	C	T	.	T	.	.	A	.	.
16 Mhua-JSP-cH98	H5	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	.	C	T	.	T	.	.	A	.	.
17 Mhua-JSP-cN54	H6	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	.	C	T	.	T	.	.	A	.	.
18 Mhua-Nag-cH81	H7	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
19 Mhua-Nag-cH89	H7	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
20 Mhua-Nag-cH86	H7	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
21 Mhua-Chi-cH80	H8	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
22 Mhua-Chi-ci6	H8	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
23 Mhua-JSP-cN53	H8	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
24 Mhua-JSP-cN48	H9	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
25 Mhua-JSP-cN51	H10	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
26 Mhua-Nag-ci5	H10	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
27 Mhua-Nag-cH90	H10	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
28 Mhua-JSP-cN52	H10	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
29 Mhua-JSP-cN47	H10	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	G	G	C	C	T	.	T	.	.	A	.	.
30 Msep-HuA-cN36	Msep1	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	A	A	.	T	A	.	A	.	.	T	.	.
31 Msep-Hua-cK90	Msep2	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	A	A	.	T	A	.	A	.	.	.	.	.
32 Mcap-Tar-cM19	Mcap	C	T	C	T	G	A	G	G	G	T	G	G	A	-	A	T	A	G	T	T	A	G	A	A
33 Mcap-Sap-cM61	Mcap	C	T	C	T	G	A	G	G	G	T	G	G	A	-	A	T	A	G	T	T	A	G	A	A
34 Mcap-Moy-cM16	Mcap	C	T	C	T	G	A	G	G	G	T	G	G	A	-	A	T	A	G	T	T	A	G	A	A

La Tabla 7 muestra el promedio de las frecuencias de bases nitrogenadas para las secuencias de *M. huascari*, *M. separabilis* y *M. capillaceus*, observándose para el primero un mayor porcentaje de purinas. La frecuencia nucleotídica promedio para las secuencias de *M. huascari* fue de A=0.3166; C=0.1391; G=0.2045; T=0.3397. El promedio de frecuencias nucleotídicas para cada población de *M. huascari* es mostrado en la Tabla 8. Mientras que la frecuencia relativa de islas CpG fue de 0.73.

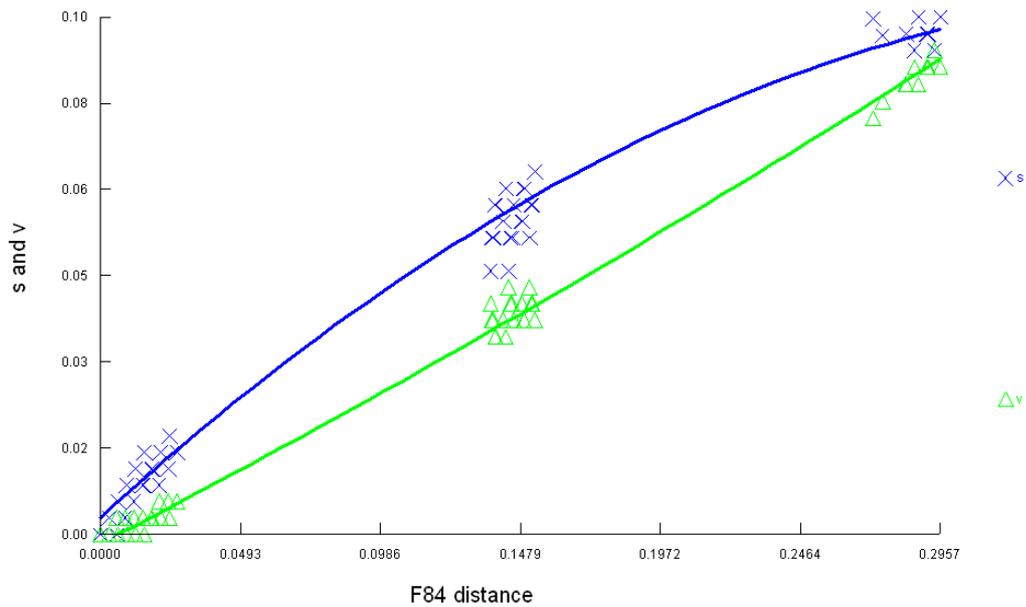
**Tabla 7.** Promedio de las frecuencias (en porcentajes) de bases nitrogenadas para las secuencias de *M. huascari*, *M. separabilis* y *M. capillaceus*.

<b>Especie</b>	<b>T (%)</b>	<b>C (%)</b>	<b>A (%)</b>	<b>G (%)</b>
<i>M. huascari</i>	33.97	13.91	31.66	20.45
<i>M. capillaceus</i>	33.64	11.62	33.33	21.41
<i>M. separabilis</i>	32.38	13.25	35.69	18.67

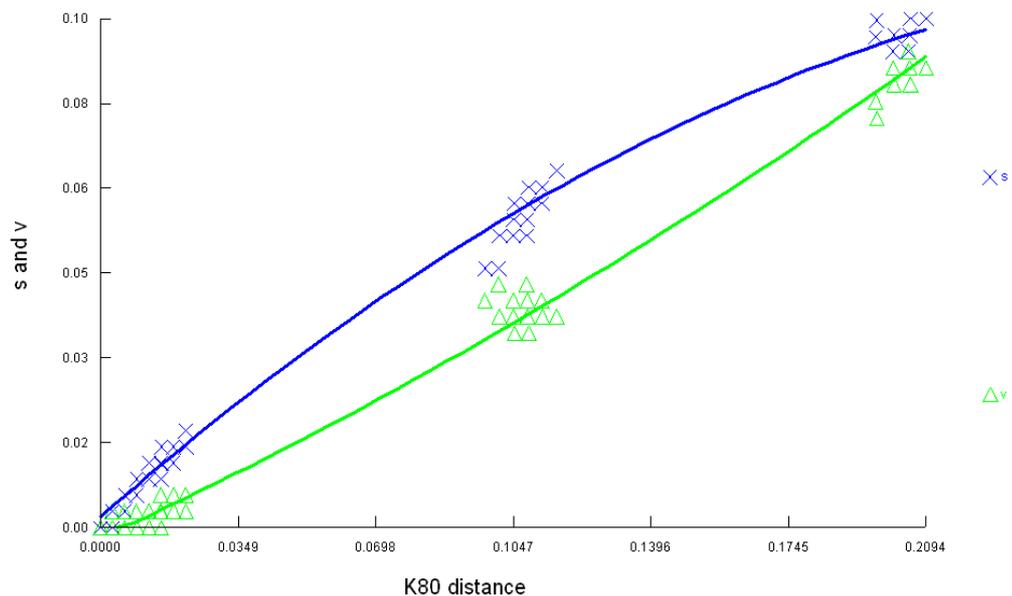
**Tabla 8.** Promedio de las frecuencias (en porcentajes) de bases nitrogenadas para las secuencias de *M. huascari* según cada población.

<b>Especie</b>	<b>T (%)</b>	<b>C (%)</b>	<b>A (%)</b>	<b>G (%)</b>
La Esperanza	34.25	13.78	31.41	20.57
Utcuyacu	34.04	13.98	31.61	20.36
Sanchirio Palomar	34.04	13.75	31.76	20.44
Chincarmás	33.43	14.29	31.91	20.36
Ñagazú	33.71	14.01	31.66	20.62
Tzachopén	34.35	13.68	31.61	20.36
Kantarizú	34.35	13.68	31.61	20.36
<i>Promedio</i>	33.97	13.91	31.66	20.45

La evaluación de transiciones y transversiones para las secuencias de *M. huascari*, *M. separabilis* y *M. capillaceus* no mostró presencia de saturación en ninguno de los tipos de mutación, independientemente del tipo de modelo empleado (Figs. 17 y 18).



**Figura 17.** Transiciones (“s”) y transversiones (“v”) comparadas con la distancia genética de a pares en base al modelo de sustitución nucleotídica F84 de las secuencias del marcador 16S rRNA de *Megalobulimus huascari*, *M. separabilis* y *M. capillaceus*.



**Figura 18.** Transiciones (“s”) y transversiones (“v”) comparadas con la distancia genética de a pares en base al modelo de sustitución nucleotídica K80 de las secuencias del marcador 16S rRNA de *Megalobulimus huascari*, *M. separabilis* y *M. capillaceus*.

#### 6.4. Diversidad genética del marcador mitocondrial 16S rRNA

Para el análisis poblacional de *M. huascari* se realizó otro alineamiento en el cual se excluyó a los individuos de *M. separabilis* y *M. capillaceus*. El nuevo alineamiento con las 29 secuencias de *M. huascari* resultó en 329 posiciones con 318 sitios conservados y 9 sitios parsimoniosamente informativos (Tabla 9).

**Tabla 9.** Sitios parsimoniosamente informativos obtenidos del alineamiento de los haplotipos de las secuencias de *M. huascari*. Los números en la parte superior indican la posición de los 9 sitios parsimoniosamente informativos. En la parte derecha de la Tabla se indican las poblaciones en las que los haplotipos fueron encontrados. N = Número de secuencias por haplotipo. Poblaciones (JLE: La Esperanza, Tza: Tzachopén, Kan: Kantarizú, Utc: Utcuyacu, Ñag: Ñagazú, Chi: Chincarmás, JSP: Sanchirio Palomar).

Haplotipo	1 2 2 2									N	Poblaciones
	5 6 6 8 8	2 1 2 4	4 5 9 7 9	3 8 2 4							
H1	C A G C C	T T T T			2	JLE					
H2	. . A . .	. . . .			3	Tza/Kan					
H3	. . A . .	. . . C .			2	JLE/Utc					
H4	A G A A .	C C . C			7	Ñag					
H5	T G A A .	C C . .			2	JSP					
H6	T G A A .	C C . .			1	JSP					
H7	. G A A .	C C . C			3	Ñag					
H8	. . A A .	C C . C			3	Chi/JSP					
H9	. . A A T	C . . C			1	JSP					
H10	. . A A T	C . . C			5	Ñag/JSP					

El programa DNAsp permitió determinar 10 haplotipos para *M. huascari* (Tabla 10). Los haplotipos H1 y H3 se distribuyeron en la población de La Esperanza, encontrándose este último haplotipo en el único espécimen colectado para la población de Utcuyacu. Sanchirio Palomar fue la población con más haplotipos hallados (haplotipos H5, H6, H8, H9 y H10), compartiendo con Chincarmás y Ñagazú los haplotipos H8 y H10 respectivamente. La población de Ñagazú también albergó a los haplotipos H4 y H7, únicos para esta localidad. Finalmente, el haplotipo H2 se halló distribuido en las poblaciones de Tzachopén y Kantarizú.

**Tabla 10.** Distribución de los haplotipos de *M. huascari* en relación a las localidades de colecta. N, indica el número de especímenes por localidad.

Localidad	Haplotipo										N
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	
La Esperanza	2		1								3
Utcuyacu			1								1
Sanchirio Palomar					2	1		1	1	3	8
Chincarmás								2			2
Ñagazú				7			3			2	12
Tzachopén		2									2
Kantarizú		1									1
Total	2	3	2	7	2	1	3	3	1	5	29

El tamaño muestral, número de haplotipos y valores de diversidad haplotípica y nucleotídica dentro de cada población es presentado en la Tabla 11. La media de la diversidad haplotípica ( $Hd$ ) entre las 29 muestras fue estimada en 0.894 y la media de la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) fue 0.01053 (Tabla 11). La diversidad nucleotídica en las poblaciones varió de 0.00405 (La Esperanza) a 0.00988 (Sanchirio Palomar); mientras que la diversidad haplotípica estuvo en un rango de 0.621 (Ñagazú) a 0.857 (Sanchirio Palomar).

**Tabla 11.** Índices de diversidad genética para el marcador 16S rRNA de *M. huascari*. Para estos análisis se excluyó a las poblaciones de Utcuyacu, Tzachopén, Kantarizú y Chincarmás debido al reducido tamaño muestral (1 ó 2 individuos), así como a la presencia de un único haplotipo.

<b>Población</b>	<b>N</b>	<b>h</b>	<b>Hd</b>	<b><math>\pi</math></b>
La Esperanza	3	2	0.667	0.00405
Sanchirio P.	8	5	0.857	0.00988
Ñagazú	12	3	0.621	0.00438
Total	29	10	0.894	0.01053

**N:** tamaño muestral, **h:** número de haplotipos, **Hd:** diversidad haplotípica y  **$\pi$ :** diversidad nucleotídica.

## 6.5. Distancia genética para el marcador mitocondrial 16S rRNA

Las distancias genéticas entre las tres diferentes especies (*M. huascari*, *M. separabilis* y *M. capillaceus*) se muestran en la Tabla 12, mientras que las distancias entre las poblaciones de *M. huascari* se observan en la Tabla 13.

### 6.5.1. Distancia Genética intra e interespecífica

La Tabla 12 muestra las distancias genéticas calculadas entre las tres especies en estudio, hallando una menor distancia para las especies *M. huascari* y *M. separabilis* (0.116) en comparación con la que se observa entre *M. capillaceus* y las especies antes mencionadas (0.278 con *M. huascari* y 0.302 con *M. separabilis*). Como se puede observar, las distancias genéticas intraspecíficas son mucho menores en relación a las interespecíficas. Asimismo, se halló una distancia genética de 0 entre las secuencias de *M. capillaceus*, debido a que todas ellas colapsaron en un solo haplotipo.

**Tabla 12.** Distancia genética empleando el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura 2-parámetros, entre las especies *M. huascari*, *M. separabilis* y *M. capillaceus* (bajo la diagonal), y dentro de cada una de las especies en mención (diagonal).

Especie	<i>M. huascari</i>	<i>M. separabilis</i>	<i>M. capillaceus</i>
<i>M. huascari</i>	0.015		
<i>M. separabilis</i>	0.116	0.011	
<i>M. capillaceus</i>	0.278	0.302	0

### 6.5.2. Distancia Genética intra e interpoblacional

Las distancias genéticas para las poblaciones de Utcuyacu y Kantarizú no pudieron ser calculadas debido a que presentaron tan solo un individuo. En la Tabla 13, este hecho se señala con la presencia de un guión (-). Por otro lado, las localidades de Chincarmás y Tzachopén presentaron una distancia intragrupo de 0 a causa de que sólo contaron con un haplotipo cada una.

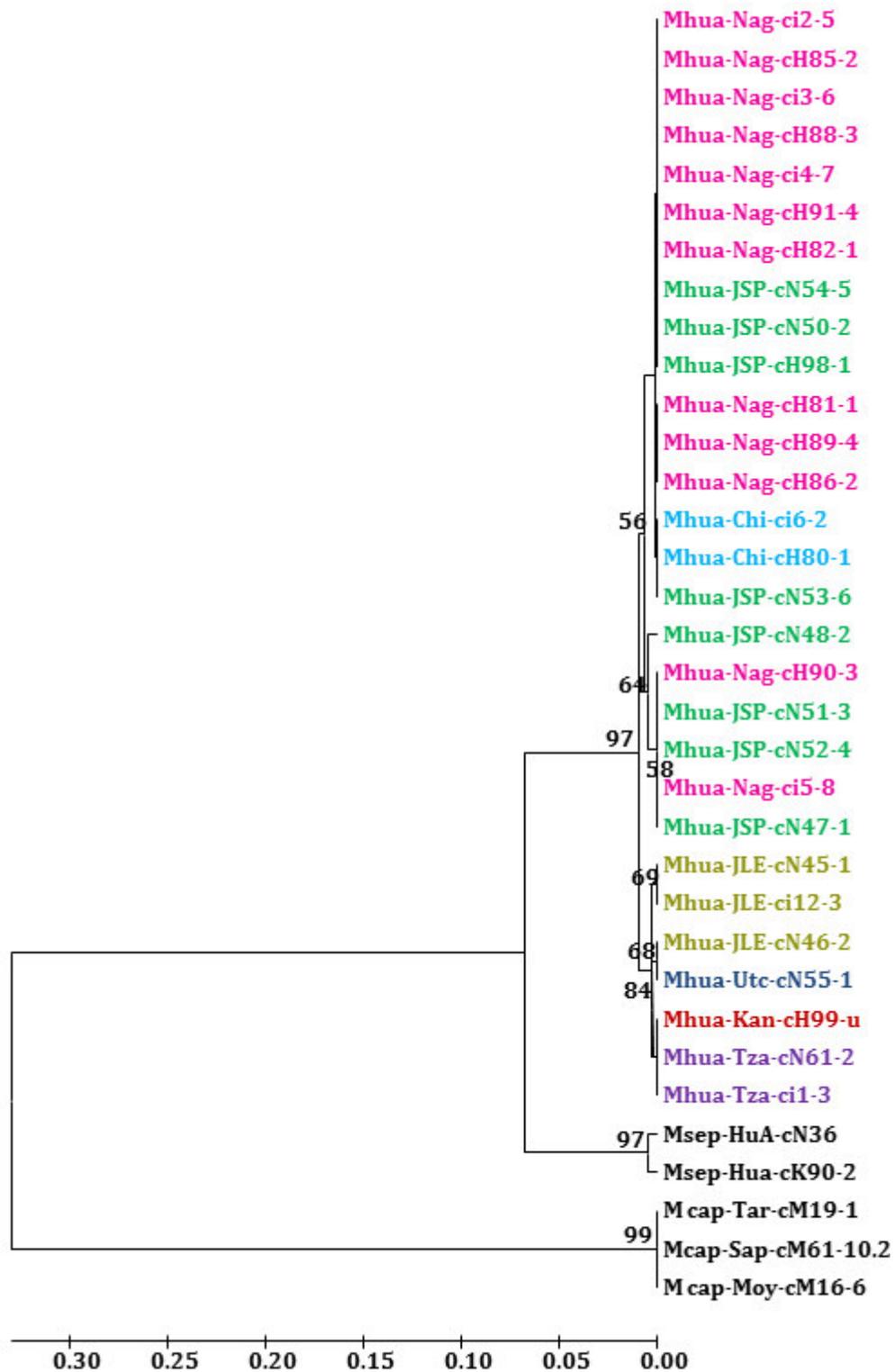
Como puede observarse en la Tabla 13, las distancias genéticas dentro de las localidades de La Esperanza, Sanchirio Palomar y Ñagazú poseen un valor muy bajo, lo cual no es más que el reflejo de las pequeñas diferencias entre sus haplotipos. Asimismo, se nota que estas distancias son menores en relación a las observadas para los valores de distancia entre las localidades, salvo para el caso de La Esperanza, la cual presenta un mismo valor de distancia intrapoblacional que interpoblacional con respecto a Utcuyacu, debido a que ambas localidades comparten el mismo haplotipo, único para cada una de ellas.

La mayor distancia genética entre las localidades corresponde a la calculada para Ñagazú con respecto a La Esperanza y Utcuyacu (0.020), mientras que los valores más bajos fueron hallados para el cálculo realizado entre las localidades de Tzachopén, Kantarizú, La Esperanza y Utcuyacu.

**Tabla 13.** Distancia genética (Kimura 2-parámetros) dentro de cada población (diagonal) y entre cada una de las poblaciones (bajo la diagonal). Nótese en general la mayor diferencia al comparar entre las localidades que dentro de ellas. Los guiones indican insuficiencia de número muestral para calcular las distancias dentro de las localidades.

Localidades	La Esperanza	Utcuyacu	Sanchirio P.	Chincarmás	Ñagazú	Tzachopén	Kantarizú
La Esperanza	0.004						
Utcuyacu	0.004	-					
Sanchirio P.	0.018	0.018	0.010				
Chincarmás	0.016	0.016	0.007	0.000			
Ñagazú	0.020	0.020	0.008	0.005	0.004		
Tzachopén	0.003	0.003	0.014	0.012	0.017	0.000	
Kantarizú	0.003	0.003	0.014	0.012	0.017	0.000	-

El UPGMA (Fig. 19) muestra gráficamente los valores de las tablas, entre ellos la poca distancia entre los especímenes de la especie *M. huascari* en relación a las distancias genéticas con las otras especies.



**Figura 19.** Dendrograma de similitud del marcador 16S rRNA con el método UPGMA para la especie *Megalobulimus huascari*. En la parte inferior se muestra la escala de distancia genética que representa a las sustituciones por sitio calculadas de acuerdo al modelo de sustitución nucleotídica de Kimura 2 parámetros.

## 6.6. Análisis filogenético de *M. huascari* con el marcador mitocondrial 16S

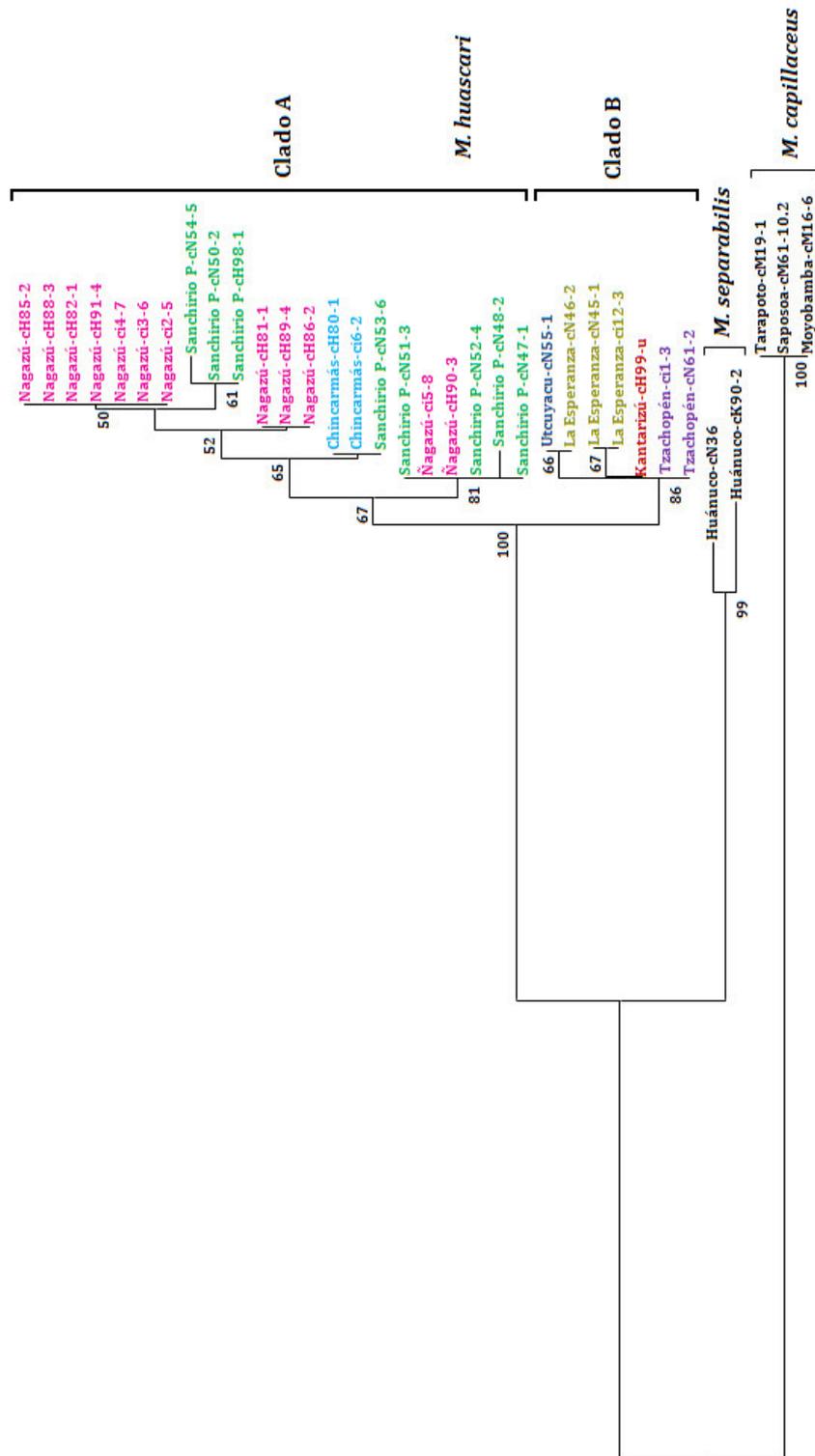
### RNA ribosomal

El análisis de *Neighbour-Joining* entre las secuencias de las especies *M. huascari*, *M. separabilis* y *M. capillaceus* mostró una clara separación de sus secuencias, generando tres grupos bien definidos (Fig. 20).

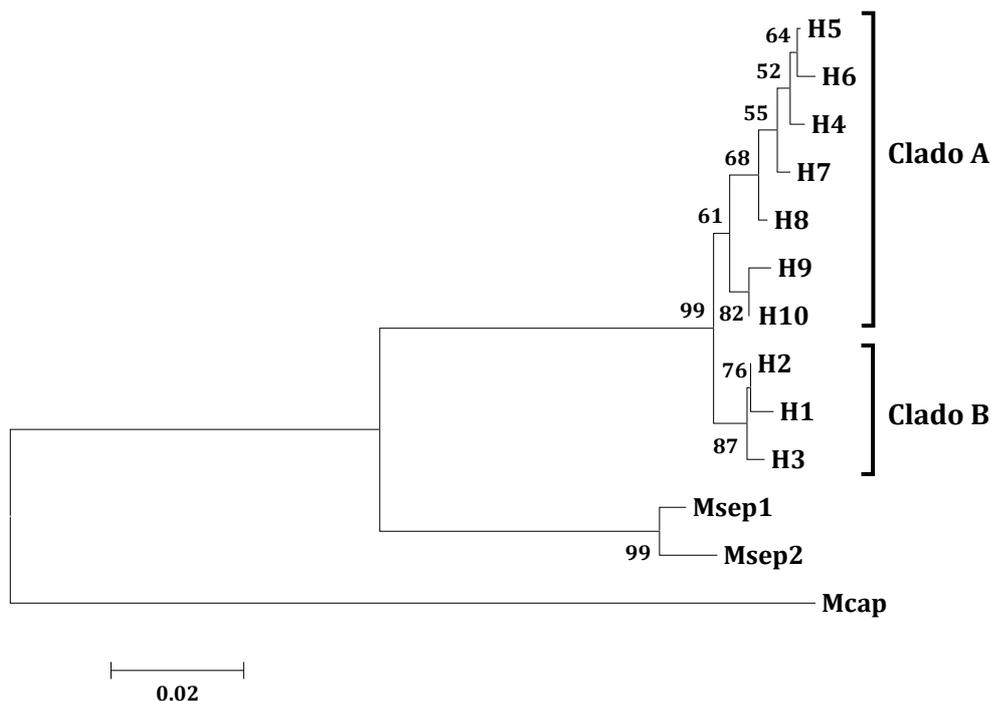
La especie *M. capillaceus* fue separada de *M. huascari* y *M. separabilis*, las cuales formaron un clado en el que la especie *M. huascari* constituyó un grupo monofilético sustentado por un altísimo valor de *bootstrap* (100). Asimismo, *M. huascari* muestra dos grupos monofiléticos, aquí denominados “linajes” (Fig. 20). El linaje A estuvo formado por los individuos colectados en las poblaciones de Ñagazú, Sanchirio Palomar y Chincarmás, mientras que el linaje B lo conformaron especímenes de Utcuyacu, La Esperanza, Kantarizú y Tzachopén.

El árbol filogenético mostrado en la Fig. 21 permitió analizar con más detalle las diferencias entre los haplotipos generados para *M. huascari*. Como en el árbol filogenético anterior (Fig. 20), éste muestra la división de *M. huascari* en dos linajes, los cuales están soportados con un alto valor de *bootstrap* (100). El linaje A incluye a los haplotipos H4, H5, H6, H7, H8, H9 y H10, los que se hallan distribuidos en las localidades de Sanchirio Palomar, Chincarmás y Ñagazú. El linaje B, a su vez, se subdividió en dos clados, uno de los cuales contiene a los haplotipo H1 y H2, ambos hallados en las poblaciones de La Esperanza y Utcuyacu, mientras que el otro, contiene únicamente al haplotipo H3, distribuido en Tzachopén y Kantarizú.

Al analizar la diversidad genética dentro de los linajes formados por NJ, el linaje A comprendió una mayor diversidad genético poblacional (linaje A:  $Hd = 0.835$ ,  $\pi = 0.00695$ ; linaje B:  $Hd = 0.762$ ,  $\pi = 0.00289$ ).



**Figura 20.** Relaciones filogenéticas entre *M. huascari*, *M. separabilis* y *M. capillaceus*. Árbol obtenido en MEGA empleando el método de *Neighbour Joining*. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 50%. La escala representa distancias genéticas en sustituciones de nucleótidos por sitio, calculadas de acuerdo al modelo de Kimura 2-parámetros.

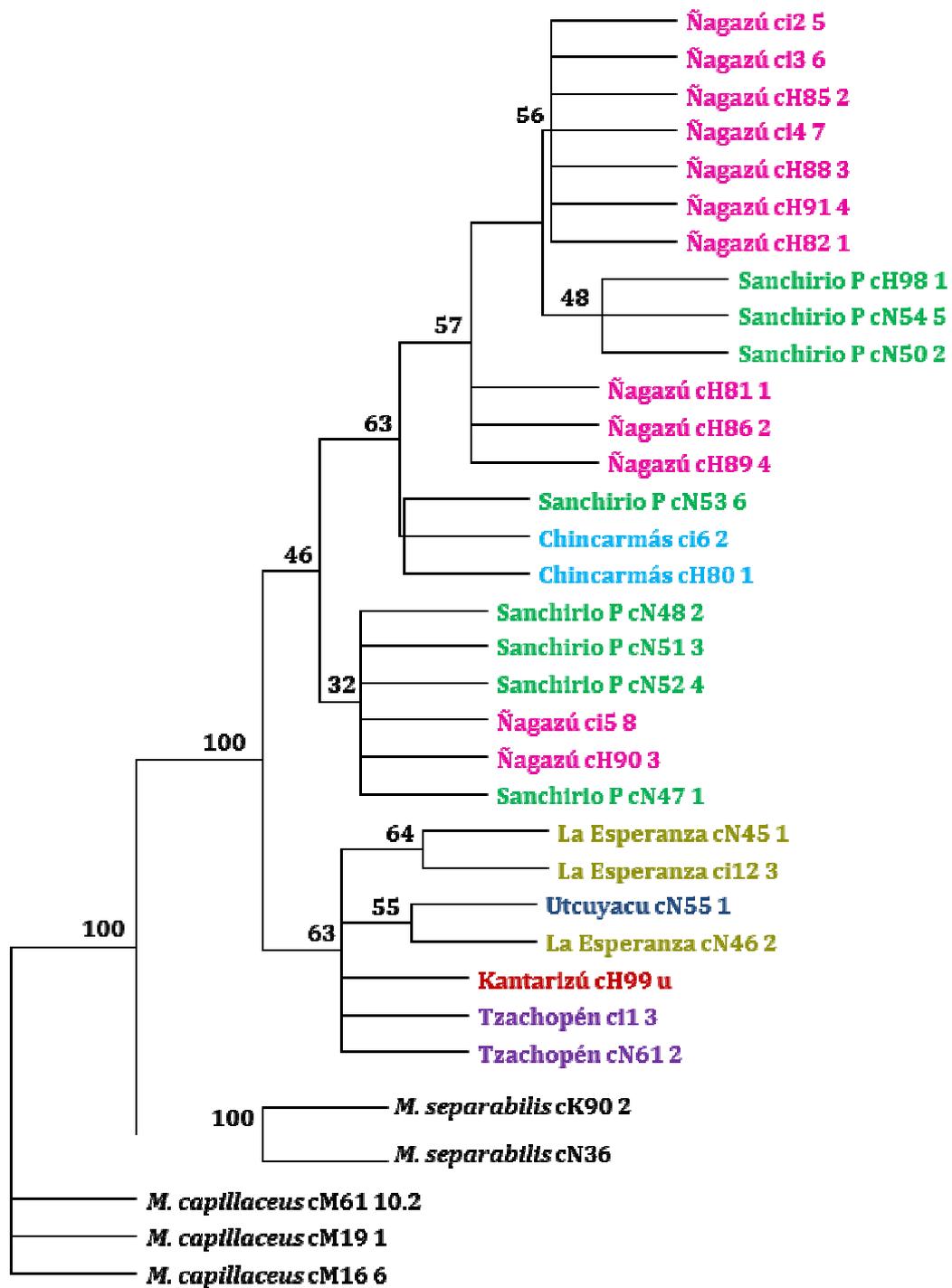


**Figura 21.** Relaciones filogenéticas entre los haplotipos de *M. huascari*, *M. separabilis* y *M. capillaceus*. Árbol obtenido en MEGA empleando las distancias calculadas con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2-parámetros y el método de *Neighbour Joining*. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 50%. La escala representa distancias genéticas en sustituciones de nucleótidos por sitio.

En el árbol resultante de emplear el método de máxima parsimonia (Fig. 22) encontramos una topología un tanto similar a la encontrada con el análisis de *Neighbour Joining*, el grupo de *M. huascari* se halla bien sustentado con un valor de *bootstrap* de 100. Se observa la presencia de dos linajes bien definidos dentro de la especie. Dentro del primer linaje se hallan dispersos los haplotipos de las poblaciones de Ñagazú, Chincarmás y Sanchirio Palomar. Dentro del segundo linaje quedan agrupados aquellos de las poblaciones de La Esperanza, Utcuyacu, Tzachopén y Kantarizú. Asimismo, se muestra a los haplotipos H9 y H10 sin grupo definido.

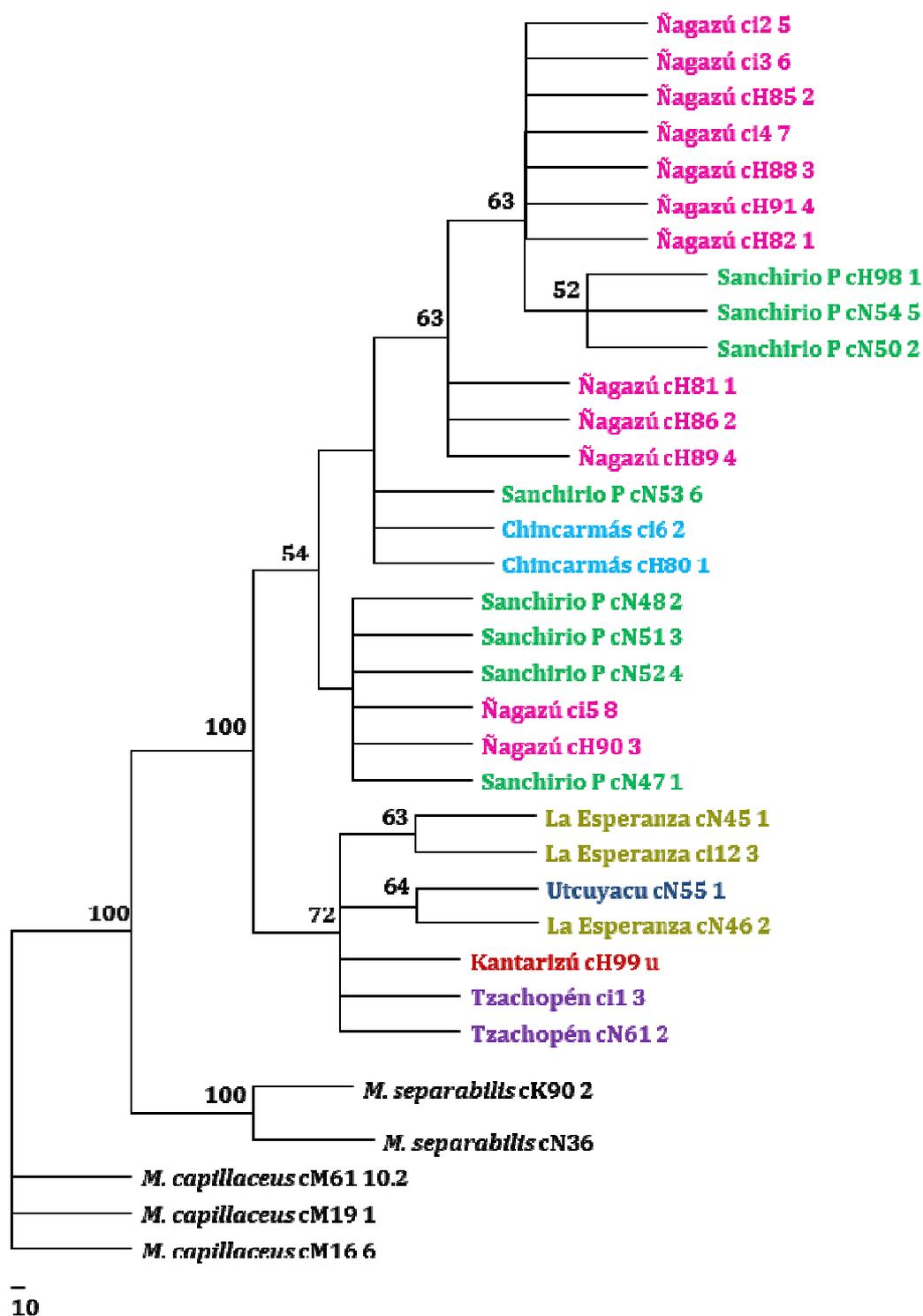
Los resultados del análisis de máxima verosimilitud (Fig. 23) e inferencia bayesiana (Fig. 24) para los cuales se aplicaron los parámetros del modelo de sustitución

nucleotídica propuesto por el Modeltest (GTR+I), nos muestran resultados similares al obtenido con el análisis generado por *Neighbour Joining*, siendo posible discriminar a la especie *M. huascari* de *M. capillaceus* (*bootstrap*=100), así como de su grupo hermano *M. separabilis* (*bootstrap*=100). Estos análisis permitieron diferenciar a *M. huascari* en dos linajes, y a diferencia del árbol obtenido con máxima parsimonia, pudieron incluir a los haplotipos H9 y H10 de Ñagazú y Sanchirio Palomar, dentro del grupo que contiene a los otros haplotipos también distribuidos en esas localidades, tal como es mostrado en el *Neighbour Joining*.

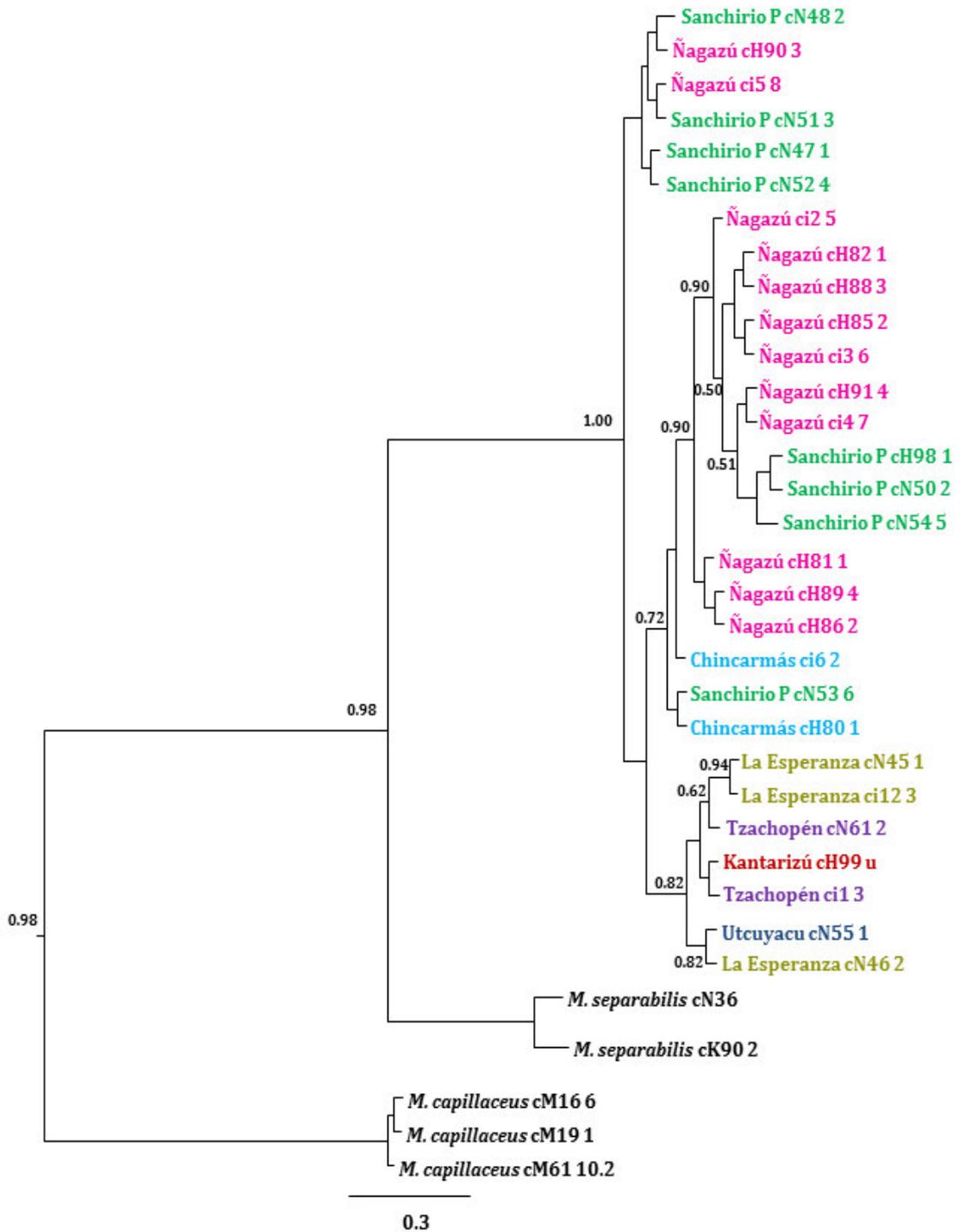


10

**Figura 22.** Árbol filogenético obtenido en PAUP utilizando el método de Máxima Parsimonia. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 50%.



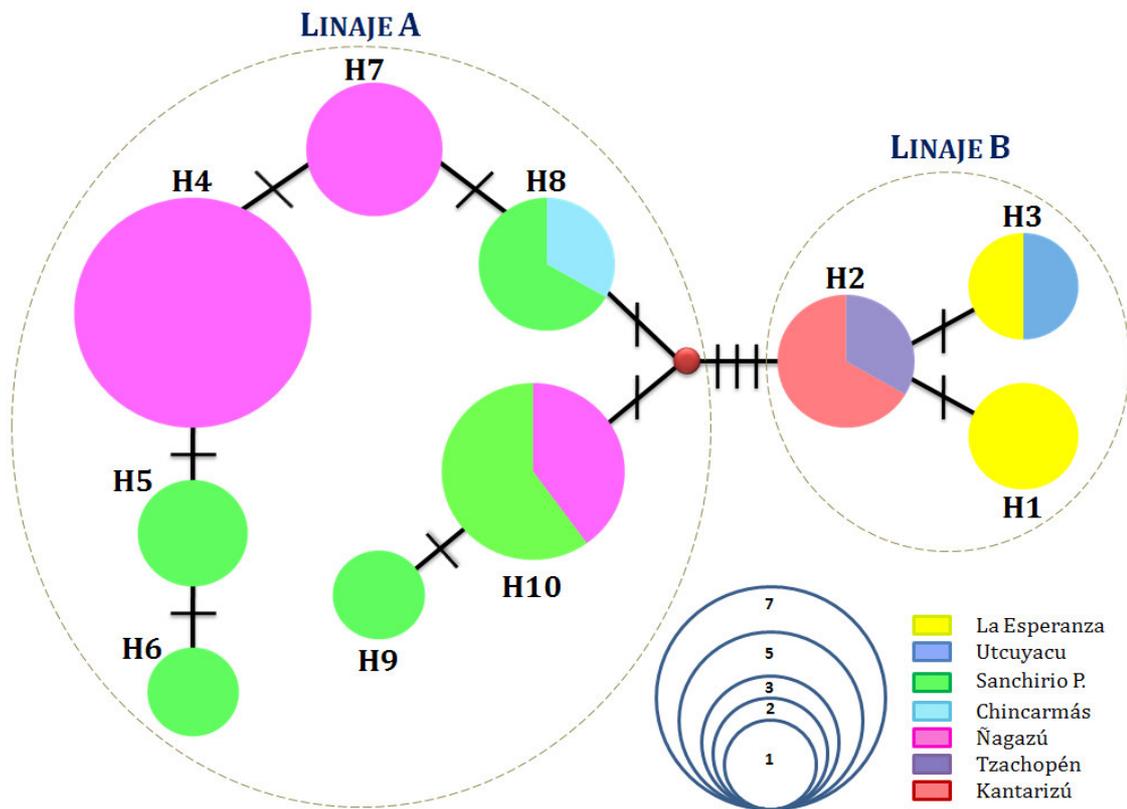
**Figura 23.** Relaciones filogenéticas obtenidas en PAUP utilizando el método de Máxima Verosimilitud. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 50%.



**Figura 24.** Relaciones filogenéticas obtenidas en el programa Mr.Bayes empleando el método de Inferencia Bayesiana. Se muestran los valores de probabilidad posterior mayor a 0.50.

## 6.7. Networks

El análisis de *networks* resulta más fino para el estudio poblacional y muestra en detalle las diferencias entre los individuos de *M. huascari*. El *network* de los haplotipos de *M. huascari* mostró la existencia de dos grupos (Fig. 25).



**Figura 25.** Red de haplotipos de *M. huascari*. Los colores representan a las localidades en estudio. El número de cambios mutacionales se halla representado mediante barras. El punto rojo indica la presencia de haplotipos no muestreados o extintos. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo correspondiente (ver escala). Obsérvese la presencia de dos grupos diferentes de haplotipos (Linaje A y Linaje B).

El primer grupo incluyó a los haplotipos H1, H2 y H3. Según la red generada se observa que los haplotipos H1 y H3, distribuidos en las localidades de La Esperanza y Utcuyacu, en Chanchamayo, surgieron diferencialmente a partir de una sola mutación

en el haplotipo H2, el cual se encuentra en las localidades de Tzachopén y Kantarizú, en Pasco. El segundo grupo muestra haplotipos pertenecientes a las poblaciones de Sanchirio Palomar, Chincarmás y Ñagazú, separados entre ellos por tan solo una mutación. Este grupo contiene a los haplotipos con mayor frecuencia (H4=7 y H10=5). Asimismo, está formado por más del 75% de los individuos colectados (Tabla 10). Como puede observarse, la presencia de un haplotipo extinto o no muestreado (punto rojo, Fig. 25) separa a los haplotipos H9 y H10 del resto del grupo.

## **6.8. Análisis genético poblacional**

### **6.8.1. Diferenciación poblacional**

Al realizar un análisis comparado entre las poblaciones de *M. huascari* (Tabla 14), las mayores diferencias fueron obtenidas entre Chincarmás y las localidades de Tzachopén y Kantarizú, igualmente, entre Utcuyacu y las localidades de Chincarmás, Tzachopén y Kantarizú. A pesar de que en todos estos casos el *Fst* alcanzó el valor de 1, en ninguno de ellos fue significativo ( $p > 0.05$ ).

Sin embargo, se pudo hallar valores cercanos a la unidad y significativos. Tales valores correspondieron al *Fst* calculado entre la localidad de La Esperanza y las localidades de Ñagazú y Sanchirio Palomar (0.779 y 0.524 respectivamente). Así también fue calculado entre la localidad de Tzachopén y las localidades de Ñagazú y Sanchirio Palomar (0.768 y 0.449 respectivamente).

**Tabla 14.** Valores de *Fst* entre las poblaciones de *M. huascari* (bajo la diagonal). Los valores cercanos a 1 indican diferenciación genética entre las poblaciones. Los signos por encima de la diagonal indican significancia (+,  $p < 0.05$ ) o no significancia (-,  $p > 0.05$ ).

Localidades	La Esperanza	Utcuyacu	Ñagazú	Sanchirio P.	Chincarmás	Tzachopén	Kantarizú
La Esperanza		-	+	+	-	-	-
Utcuyacu	0.0000		-	-	-	-	-
Ñagazú	<b>0.7790</b>	0.7757		-	-	+	-
Sanchirio P.	<b>0.5242</b>	0.4222	0.1652		-	+	-
Chincarmás	0.8248	1.0000	0.3484	0.0222		-	-
Tzachopén	0.1724	1.0000	<b>0.7682</b>	<b>0.4487</b>	1.0000		-
Kantarizú	-0.3333	1.0000	0.7343	0.2973	1.0000	0.0000	

Debido a que la mayoría de los valores de *Fst* entre las poblaciones no fue significativo, se agrupó a las poblaciones en dos linajes (Linaje A y Linaje B) según lo determinado en los resultados del análisis filogenético (Linaje A: Ñagazú, Sanchirio Palomar y Chincarmás; Linaje B: Utcuyacu, La Esperanza, Kantarizú y Tzachopén). El *Fst* calculado entre los dos linajes fue 0.670, el cual presentó un alto nivel de significancia ( $P \text{ value} = 0$ ).

### **6.8.2. Variación molecular inter e intrapoblacional**

El análisis AMOVA realizado para las siete poblaciones (JLE, Utc, JSP, Chi, Ñag, Tza y Kan), mostró que la varianza dentro ellas ( $Fst = 0.41884$ ,  $P < 0.001$ ) contribuyó principalmente al total de la variación (Tabla 15). Los resultados de este estudio sugieren que las siete poblaciones geográficas de *M. huascari* no han desarrollado una estructura genética significativa.

**Tabla 15.** Análisis de Varianza Molecular entre las poblacionales de *Megalobulimus huascari*. Los estadísticos resultaron significativos ( $P < 0.001$ ), salvo en (\*).

Fuente de variación	Porcentaje de variación	Índices de fijación
Entre grupos	13.21 %	$F_{ct} = 0.13213^*$
Entre poblaciones dentro de los grupos	28.67 %	$F_{sc} = 0.33036$
Dentro de las poblaciones	58.12 %	$F_{st} = 0.41884$

Para el análisis jerárquico, las poblaciones fueron agrupadas de acuerdo a sus linajes asignados (Linaje A y Linaje B;  $N = 2$ ). En el AMOVA realizado, la mayoría de la variación molecular (65.08%) fue atribuida a la variación entre los grupos, 31.87% atribuido a la variación dentro de las poblaciones, y 3.05% a la varianza entre las poblaciones dentro de los grupos (Tabla 16). Por lo tanto, el análisis AMOVA muestra una clara estructura genética entre los linajes.

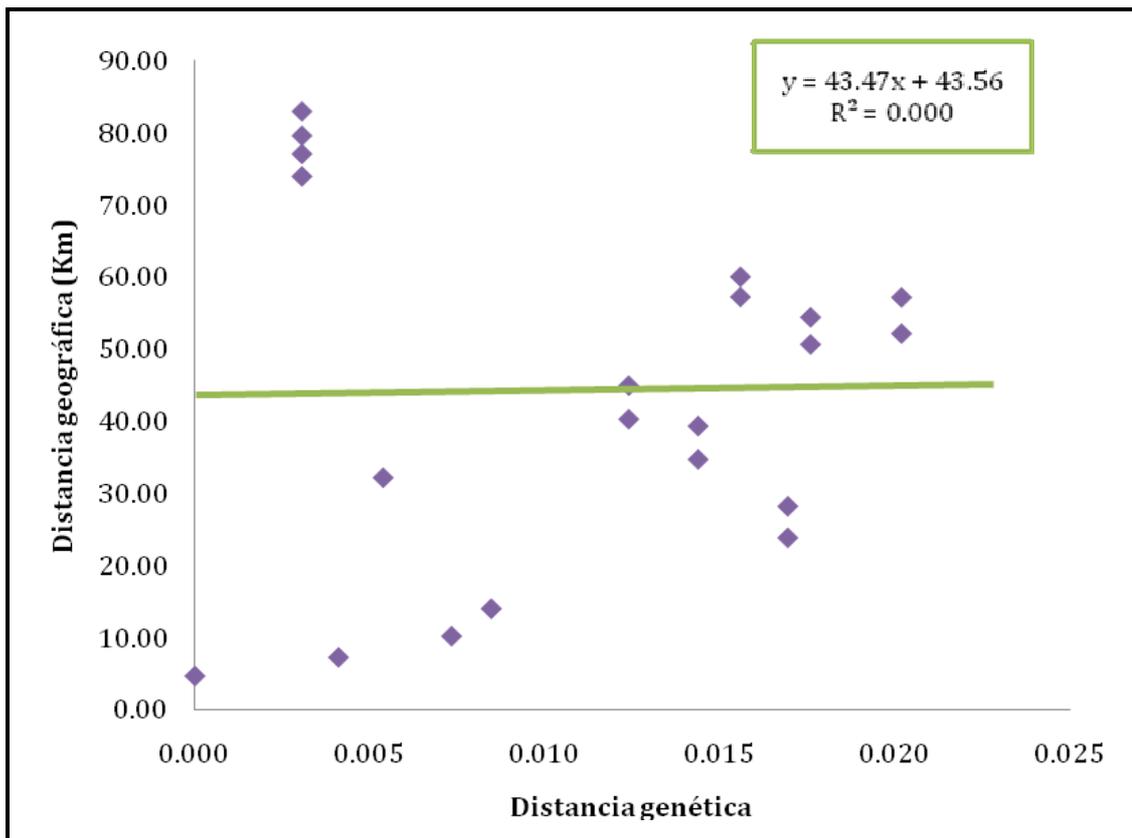
**Tabla 16.** Análisis de Varianza Molecular entre los grupos establecidos de *Megalobulimus huascari* (Linaje A y Linaje B). Linaje A: Ñagazú, Sanchirio Palomar y Chincarmás, Linaje B: Utcuyacu, La Esperanza, Kantarizú y Tzachopén. Los estadísticos resultaron significativos ( $P < 0.001$ ), salvo en (\*).

Fuente de variación	Porcentaje de variación	Índices de fijación
Entre grupos	65.08 %	$F_{ct} = 0.65082$
Entre poblaciones dentro de los grupos	3.05 %	$F_{sc} = 0.08732^*$
Dentro de las poblaciones	31.87 %	$F_{st} = 0.68131$

### 6.9. Estructuración geográfica de la arquitectura genética

El número de matrices generadas fue dos: una matriz de distancias genéticas a pares entre las poblaciones de *M. huascari* (Tabla 13) y una segunda matriz de distancias geográficas a pares determinada a partir de las coordenadas geográficas de las localidades en estudio (Tabla 1).

Los resultados del Test de Mantel muestran una ausencia de relación entre las matrices, debido a que se generaron valores de correlación grandes y pequeños de forma no igualitaria (76769 y 23154 respectivamente), así como un  $r=0.153011$ . Asimismo, la Fig. 26 muestra un aislamiento por distancia entre las poblaciones de *M. huascari*, debido a que el incremento en las distancias genéticas no corresponde, en la mayoría de los casos, a un incremento en las distancias geográficas.



**Figura 26.** Gráfica de correlación entre la distancia genética y distancia geográfica entre las poblaciones de *M. huascari*.

## 6.10. Patrones demográficos

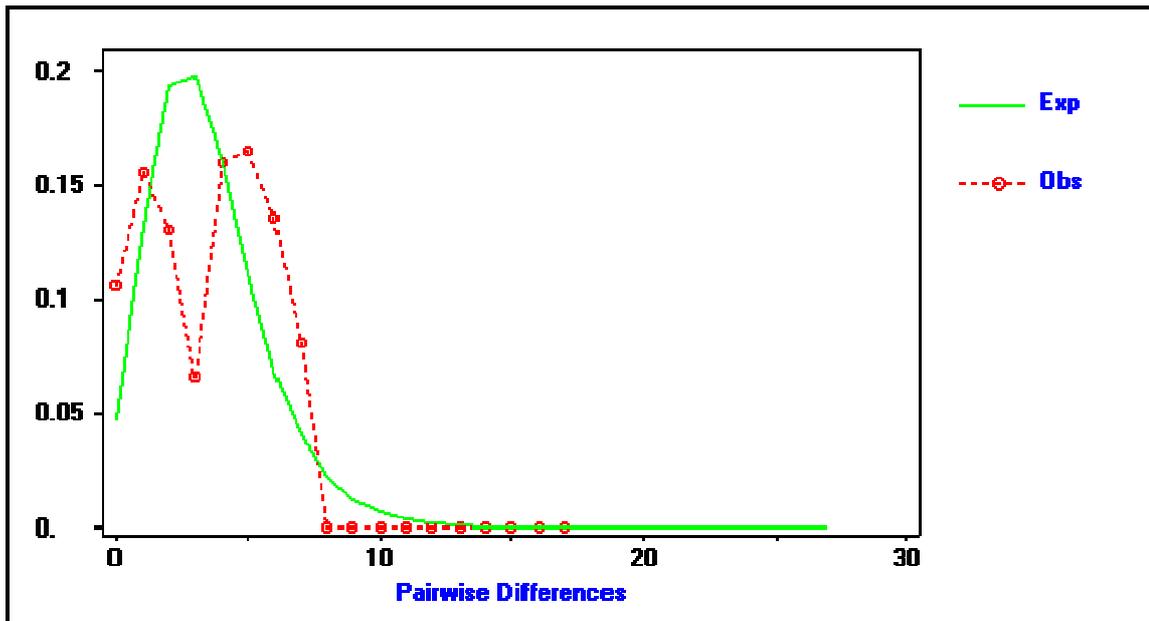
El test de Tajima mostró valores mayores a cero (Tabla 17), tanto al analizar las secuencias del total de las poblaciones como cuando éstas fueron agrupadas por linajes. Este resultado nos sugiere que las poblaciones han atravesado por un reciente cuello de botella.

Por otro lado, los valores de  $F_s$  de  $F_u$  resultaron negativos (Tabla 17), lo cual evidencia una reciente expansión poblacional, tanto al nivel de poblaciones como de linajes. Este resultado también fue soportado por el bajo índice de Raggedness ( $r=0.0263$ ).

**Tabla 17.** Valores de los estadísticos de Tajima y de  $F_u$  para el total de las poblaciones y los linajes establecidos. Ningún estadístico alcanzó significancia.

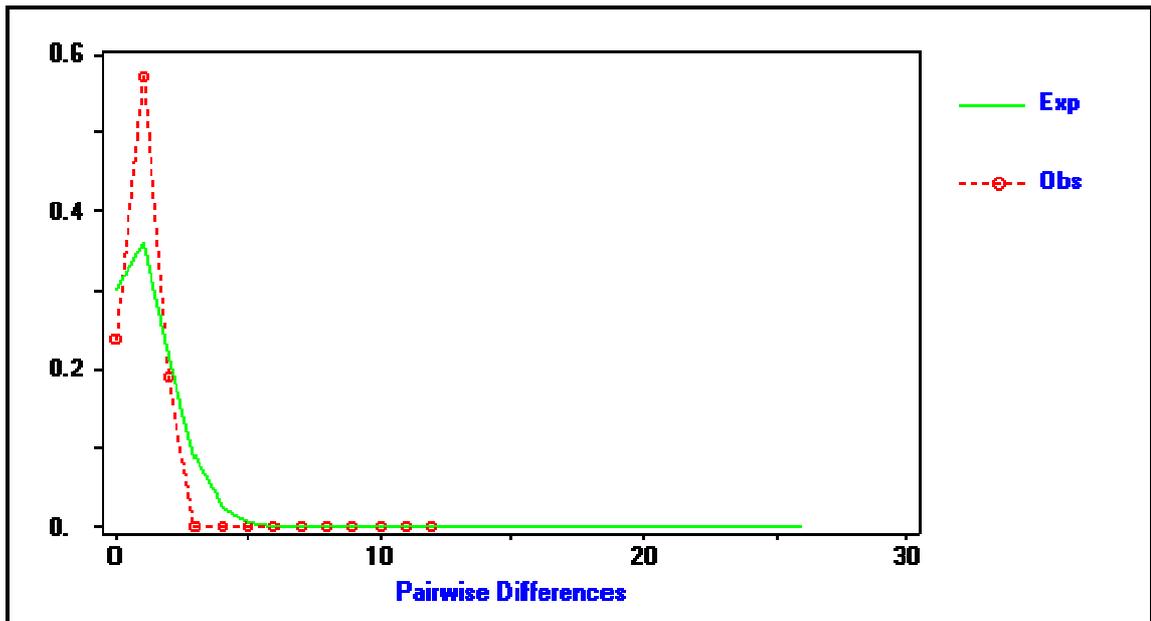
Estadísticos	Total de las poblaciones	Linaje A	Linaje B
Tajima's D	0.76637	0.60905	0.68731
Tajima's D <i>p-value</i>	0.92026	0.75620	0.96820
Fu's F	-1.006	-0.60387	-0.056
Fu's $F_s$ <i>p-value</i>	NA	0.39090	0.70550

La Figura 27 muestra la curva del número de diferencias a pares entre las secuencias de *M. huascari* comparado con sus frecuencias, empleando el modelo de expansión poblacional. La gráfica muestra una distribución bimodal, con una mayor incidencia de pocas diferencias entre las secuencias.

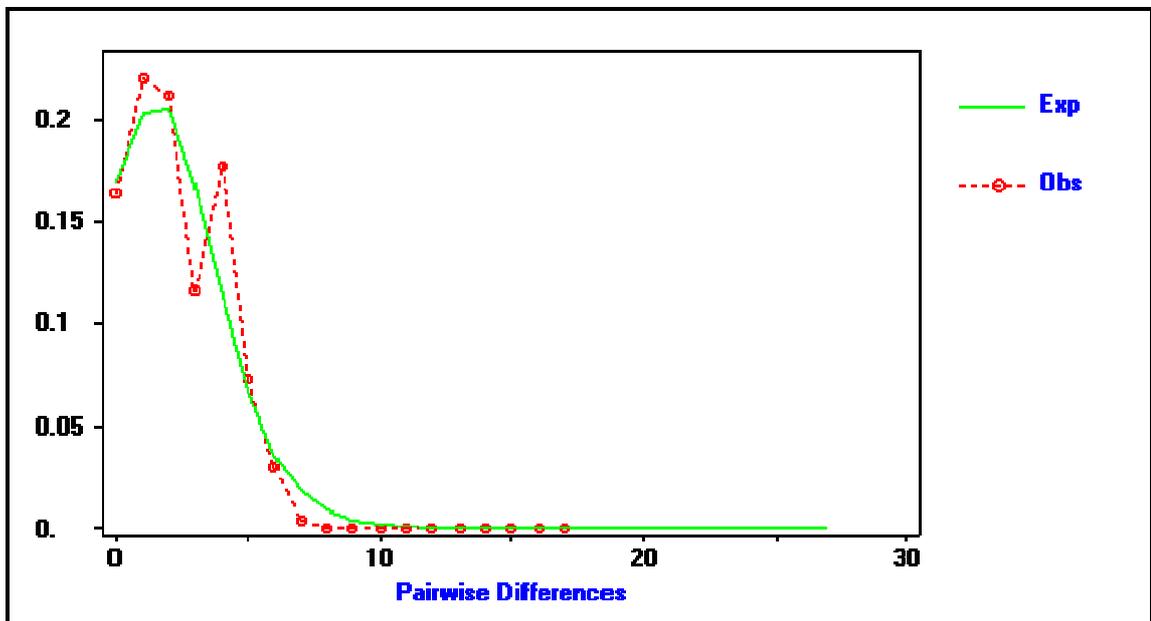


**Figura 27.** Distribución de diferencias a pares (*mismatch distribution*) para todas las secuencias de *M. huascari*. Gráfico de población con variación demográfica. En la horizontal se muestran las diferencias a pares y en la vertical la frecuencia de aparición de estas diferencias.

En los análisis realizados para cada linaje, las curvas también mostraron baja divergencia entre las secuencias (Figs. 28 y 29). Sólo para el caso del linaje A (Sanchirio Palomar, Chincarmás y Ñagazú) se presentó una curva unimodal, la cual se asemeja a la hipótesis de una expansión poblacional súbita luego de un cuello de botella genético (Fig. 28).



**Figura 28** Distribución de diferencias a pares (*mismatch distribution*) para el linaje A de *M. huascari*. Gráfico de población con variación demográfica. En la horizontal se muestran las diferencias a pares y en la vertical la frecuencia de aparición de estas diferencias.

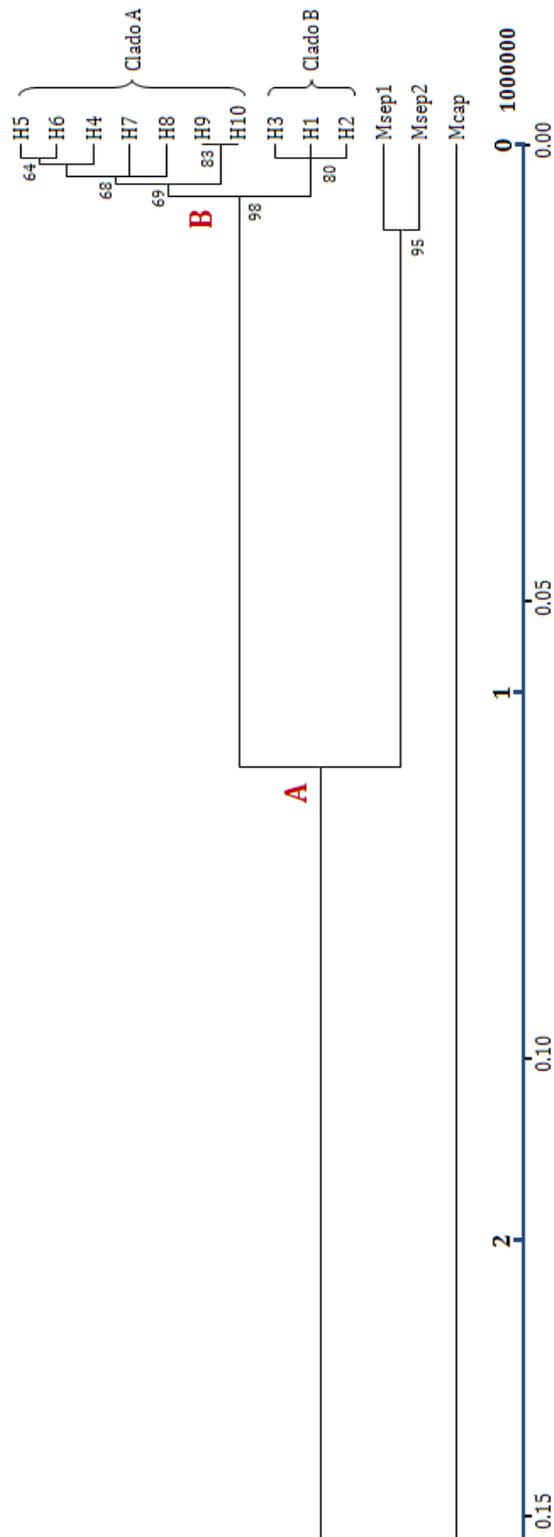


**Figura 29.** Distribución de diferencias a pares (*mismatch distribution*) para el linaje B de *M. huascari*. Gráfico de población con variación demográfica. En la horizontal se muestran las diferencias a pares y en la vertical la frecuencia de aparición de estas diferencias.

### 6.11. Tiempos de Divergencia

El árbol de distancias *Neighbour Joining* linearizado y comparado con la tasa de sustitución estándar del gen 16S rRNA (0.06/millón de años, Chiba, 1999; Pfenninger & Posada, 2002; Pfenninger *et al.*, 2003) permitió observar los tiempos de divergencia entre las especies *M. huascari*, *M. separabilis* y *M. capillaceus*, así como entre los linajes de *M. huascari* (Fig. 30 - Clado A).

La divergencia del clado de *M. huascari* con respecto a su grupo hermano *M. separabilis* ocurrió hace 1 millón 250 mil años. El tiempo de divergencia entre los linajes A y B es de unos 150 mil años (Fig. 30 – Clado B). Por otro lado, la divergencia entre los haplotipos de las poblaciones de Tzachopén-Kantarizú y La Esperanza-Utcuyacu es de aproximadamente 25 mil años.



**Figura 30.** Tiempos de divergencia en la especie *Megalobulimus huascari*. (A) Tiempo de divergencia de *M. huascari* con respecto a *M. separabilis* (1 millón 250 mil años). (B) Tiempo de divergencia del clado A con respecto al clado B (150 mil años). La escala representa la distancia genética y la superior el tiempo en millones de años.

## 6.12. Código de barras de DNA para *M. huascari*

El código de barras de DNA (DNA *barcoding*) es una técnica que permite caracterizar especies de organismos usando una corta secuencia de DNA estándar (<http://barcoding.si.edu/DNABarCoding.htm>). Tal distinción se obtiene a partir de la premisa de que la variación genética entre las especies debe exceder a la variación dentro de las mismas (Hebert *et al.*, 2003). En la presente tesis se utilizó un segmento del gen mitocondrial 16S rRNA como el estándar para la obtención de secuencias que generarían el perfil genético de las especies de *Megalobulimus* aquí utilizadas.

Como resultado se tiene que las secuencias del marcador 16S rRNA obtenidas en el presente estudio conformaron perfiles genéticos para cada una de ellas (*M. huascari*, *M. separabilis*, *M. capillaceus*).

Las secuencias de *M. huascari* fueron confrontadas con la base de datos del GenBank usando la herramienta bioinformática BLASTn, lo cual permitió confirmar la correcta amplificación y secuenciamiento del marcador 16S rRNA. Los *matches* coincidieron con caracoles de la familia Megalobulimidae con porcentajes de identidad entre el 90% y 82% (Fig. 31). Por otro lado, estas secuencias formaron un clado en árboles obtenidos con diversos métodos filogenéticos, lo que respalda al marcador 16S rRNA como código de barras de DNA de *M. huascari*.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">JN604733.1</a>	Megalobulimus lichtensteini isolate Nar-M88-1 16S ribosomal RNA qer	431	431	100%	2e-117	90%
<a href="#">JN604732.1</a>	Megalobulimus lichtensteini isolate Nar-N29-2 16S ribosomal RNA gen	431	431	100%	2e-117	90%
<a href="#">JN604731.1</a>	Megalobulimus lichtensteini isolate Shu-M73-17.2 16S ribosomal RNA	431	431	100%	2e-117	90%
<a href="#">JN604744.1</a>	Megalobulimus separabilis isolate Hua-N36-1 16S ribosomal RNA gene	422	422	100%	1e-114	90%
<a href="#">JN604749.1</a>	Megalobulimus popelairianus isolate Biot-N27-8a 16S ribosomal RNA c	381	381	100%	2e-102	88%
<a href="#">JN604741.1</a>	Megalobulimus popelairianus isolate Ink-M85-2 16S ribosomal RNA qe	375	375	100%	8e-101	88%
<a href="#">JN604748.1</a>	Megalobulimus popelairianus isolate Oco-H25-1 16S ribosomal RNA qe	370	370	100%	4e-99	87%
<a href="#">JN604747.1</a>	Megalobulimus popelairianus isolate Flo-N42-1 16S ribosomal RNA qer	364	364	100%	2e-97	87%
<a href="#">JN604746.1</a>	Megalobulimus popelairianus isolate Flo-N40-u 16S ribosomal RNA qer	364	364	100%	2e-97	87%
<a href="#">JN604745.1</a>	Megalobulimus popelairianus isolate DBo-N39-u 16S ribosomal RNA qe	364	364	100%	2e-97	87%
<a href="#">JN604743.1</a>	Megalobulimus popelairianus isolate SapCh-M95-10.4 16S ribosomal F	364	364	100%	2e-97	87%
<a href="#">JN604742.1</a>	Megalobulimus popelairianus isolate Rio-M67-9.1 16S ribosomal RNA c	364	364	100%	2e-97	87%
<a href="#">JN604740.1</a>	Megalobulimus popelairianus isolate IqM-H14-3 16S ribosomal RNA qe	348	348	100%	2e-92	86%
<a href="#">JN604739.1</a>	Megalobulimus popelairianus isolate SapJM-M78-10.5 16S ribosomal F	348	348	100%	2e-92	86%
<a href="#">JN604737.1</a>	Megalobulimus popelairianus isolate TarM-M90-13.1 16S ribosomal RN	348	348	100%	2e-92	86%
<a href="#">JN604738.1</a>	Megalobulimus popelairianus isolate TarM-N58-1 16S ribosomal RNA c	342	342	100%	8e-91	86%
<a href="#">JN604734.1</a>	Megalobulimus maximus isolate Ink-M86-1 16S ribosomal RNA gene, r	296	296	100%	6e-77	83%

**Figura 31.** *Matches* realizados para *M. huascari* en la base e datos del GenBank.

## 7. DISCUSIÓN

El presente estudio ha permitido caracterizar la diversidad genética de *M. huascari*, establecer sus relaciones filogenéticas con especies emparentadas, analizar su estructura y diferenciación genética. Pero principalmente ha permitido conocer el estado actual en el que se encuentran sus poblaciones, así como, de qué manera el hombre viene modificando su hábitat y diversidad.

### 7.1. ¿16S rRNA: el mejor marcador para *M. huascari*?

El gen COI recientemente ha recibido mucha atención en la identificación de especies debido a la robustez de sus *primers* universales. Por ello inicialmente se decidió emplear este gen como marcador para las poblaciones de *M. huascari*. Sin embargo, no se logró obtener amplificadas de la especie en estudio. Este hecho puede ser explicado por la universalidad de los *primers* de Folmer *et al.* (1994) empleados, siendo que las regiones de unión de los iniciadores presenten algunos cambios mutacionales que eviten su hibridación.

Esta diferencia de la eficacia en el diseño de los *primers* también fue notada por Congrains (2010) al estudiar los perfiles de DNA de algunas especies de la familia Megalobulimidae de la región San Martín. Resultados similares fueron observados en los trabajos realizados por Feng *et al.* (2011), quien al analizar la diversidad genética en bivalvos de la familia Pectinidae no logró amplificar el gen COI a partir de los *primers* universales de Folmer para todas las especies colectadas; mientras que al emplear los *primers* COI de Matsumoto & Hayami (2000), logró obtener un rendimiento de casi el 100%. Por otro lado, en todos los trabajos citados, así como en el presente estudio, los *primers* del 16S rRNA diseñados universal o específicamente para moluscos (Ramirez, 2004) fueron reproducidos exitosamente alcanzando incluso el 100% de amplificación.

## 7.2. Caracterización de secuencias

El análisis de las secuencias de DNA nos puede dar información acerca de las diferencias no observables a partir del fenotipo, así como también permite resolver las relaciones evolutivas dentro de un complejo de especies (Dyer *et al.*, 2008).

La mayoría de estudios en animales se enfocan principalmente en un tipo de genoma, el DNA mitocondrial (mtDNA), el cual tiene la ventaja de poseer tasas relativamente rápidas de evolución, proveyendo resolución para eventos de especiación recientes (Moore, 1995; Zink & Barrowclough, 2008).

Una característica del genoma mitocondrial es su deficiencia en guanina (Zhang & Hewitt, 1996; Silva *et al.*, 2011). Sin embargo, en este estudio, las secuencias del marcador 16S para las tres especies fueron globalmente deficientes en citocina (Tabla 7), composición que ha sido frecuentemente reportada en diferentes estudios basados para este gen en una variedad de gastrópodos (Congrains, 2010; Ramirez, 2009; Romero, 2008).

Al analizar el alineamiento múltiple de las secuencias del gen 16S rRNA, se observó que la presencia de los *gaps* se debía en su mayoría a deleciones producidas en las secuencias de *M. capillaceus*, especie lejanamente emparentada con *M. huascari*, tanto a nivel de su distribución geográfica como en base a sus características morfológicas. Los extremos 5' y 3' del alineamiento correspondieron a segmentos bien conservados, lo cual verifica la efectividad de los *primers* específicos diseñados por Ramírez (2004).

## 7.3. Variación genética en *Megalobulimus huascari*

Las diversidades haplotípica y nucleotídica pueden proveer importante información de la historia de las poblaciones de *Megalobulimus huascari*. Los resultados de la presente tesis revelaron alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica en las poblaciones (Tabla 11). Este patrón puede ser atribuido a una reciente expansión

poblacional luego de una reducción en el tamaño efectivo de la población, debido posiblemente a un cuello de botella genético (Grant & Bowen, 1998). Comparado con un estudio previo sobre caracoles terrestres de la Amazonía peruana, la diversidad genética de las secuencias del marcador 16S rRNA en *M. huascari* es similar a la de otras especies de la familia Megalobulimidae (Congrains, 2010).

Como puede observarse en la Tabla 10, hay un gran flujo de genes entre las poblaciones de Sanchirio Palomar y los poblados de Chincarmás y Ñagazú, evidenciado porque éstos comparten haplotipos. Lo mismo se evidencia para las poblaciones de La Esperanza y Utcuyacu, así como para Tzachopén y Kantarizú. En un principio este flujo génico puede ser explicado por la cercanía geográfica entre las poblaciones. Un claro ejemplo lo constituyen las localidades de Sanchirio Palomar, Chincarmás y Ñagazú, que a pesar de ubicarse en diferentes distritos (Tabla 3) - incluso diferentes departamentos, como es el caso de Ñagazú ubicado en Pasco en relación a las otras dos localidades presentes en Junín – comparten una misma zona de vida (bosque muy húmedo Premontano Tropical) y se encuentran separados por una distancia máxima de 32.15 kilómetros (entre Ñagazú y Chincarmás). La misma explicación se produce en el caso de las otras cuatro poblaciones, siendo que La Esperanza queda separada de Utcuyacu por tan solo 7kms, y Tzachopén de Kantarizú por menos de 5kms.

Las distancias genéticas interespecíficas alcanzaron valores altos (11.6% entre *M. huascari* y *M. separabilis*, y 27.8% entre *M. huascari* y *M. capillaceus*). Valores similares de distancia genética entre especies han sido hallados en diversos estudios realizados en otros moluscos. Feng *et al.* (2011) al analizar las secuencias de especies de bivalvos de la familia Pectinidae encontraron valores de distancia genética dentro de un rango de 5% a 31%. Así también, Aguilera-Muñoz *et al.* (2009) hallaron un porcentaje de divergencia entre 1.2% y 47.5% para diferentes especies de gastrópodos comercializados en Chile. Por otro lado, la menor distancia entre *M.*

*separabilis* y *M. huascari*, corrobora los resultados de estudios morfológicos, los cuales plantean que ambas especies se encuentran más cercanamente relacionadas entre sí que en relación a *M. capillaceus* (Ramírez *et al.*, 2012).

Asimismo, se halló un valor muy bajo de divergencia dentro de *M. huascari* (1.5%), el cual no supera al 5% determinado como límite en los estudios de moluscos europeos del género *Iberus* (Elejalde *et al.*, 2008). El rango de divergencia entre las poblaciones de *M. huascari* (0%-2%) es similar al encontrado en otras especies, como es el caso de anfibios (0%-3%) (Vences *et al.*, 2005) y peces (0.37%-4.9%) (Frederico *et al.*, 2012).

#### **7.4. *M. huascari*: un clado monofilético**

La arquitectura genética de las especies está modelada por los procesos geológicos, climáticos e históricos y puede ser evidenciada mediante análisis filogenéticos de las secuencias de DNA (Avice, 2000). Generalmente, al estudiar filogenias intraespecíficas en moluscos se espera obtener un resultado que relacione la distribución de los haplotipos con sus diferencias genéticas, este es el caso de Bunje (2005) quien por medio de la reconstrucción de árboles filogenéticos empleando máxima parsimonia y máxima verosimilitud observó la presencia de dos clados monofiléticos con distribución restringida para el caracol acuático *Theodoxus fluviatilis*. Asimismo, Pfenninger y Magnin (2001) observaron la presencia de dos grupos de haplotipos altamente divergentes dentro de la especie *Candidula unifasciata*, siendo esta división concordante con diferencias morfológicas y de distribución geográfica, proponiendo la existencia de dos linajes evolutivos diferentes.

Los árboles filogenéticos obtenidos para el marcador mitocondrial 16S rRNA con diferentes métodos (NJ, MP, ML, BA) mostraron una topología similar, sustentando la monofilia de *M. huascari* con respecto a su grupo hermano (*M. separabilis*) y grupo externo (*M. capillaceus*). La concordancia entre las topologías se debe a la elección de un correcto modelo de sustitución nucleotídica, el cual permitió optimizar la calidad de

los datos (Wägele & Mayer, 2007), sin generar problemas en el análisis de las relaciones evolutivas de los taxa (Philipps *et al.*, 2004). Tales filogenias dividieron a la especie *M. huascari* en dos clados (Clado A y Clado B) con un alto valor de *bootstrap* (100%). Aunque dentro del clado A no se llegó a observar una estructura genética que se corresponda con la distribución geográfica de las poblaciones, puesto que más de un haplotipo fue compartido entre ellas, todas éstas se encontraron cercanamente distanciadas geográficamente, factor que estaría influenciando el flujo génico entre estas poblaciones. Éste no es el caso del clado B, debido a que en éste se encontraron poblaciones altamente distanciadas geográficamente, con una separación de hasta 83 km.

El *network* para los haplotipos de *M. huascari* mostró la existencia de dos grupos (Fig. 22). Según la red generada para el grupo formado por los haplotipos H1, H2 y H3, surge la hipótesis de que los haplotipos H1 y H3 surgieron diferencialmente a partir de una sola mutación en el haplotipo H2. Este hecho puede tener su origen en el efecto fundador, por medio del cual algunos individuos de las poblaciones de Tzachopén o Kantarizú (que comparten el haplotipo H2) fueron transportados de forma accidental o con fines medicinales o de comercialización, ya sea hacia La Esperanza o Utcuyacu, generando la dispersión de su *pool* génico en estas poblaciones, que al ser colindantes facilitó el flujo génico entre ellas haciendo posible que en la actualidad compartan el haplotipo H3.

El segundo grupo, mostró haplotipos separados entre ellos por tan solo una mutación. Es notable la mayor frecuencia del haplotipo H4 únicamente distribuido en Ñagazú, así también el haplotipo H10 compartido entre las poblaciones de Sanchirio Palomar y Ñagazú. Los haplotipos H9 y H10 son separados del resto debido a la existencia de un haplotipo indeterminado o extinto. La mínima cantidad de pasos mutacionales entre los haplotipos de este grupo indica un amplio flujo génico entre los individuos de estas poblaciones, cuya separación geográfica, como ya fue discutido, es muy corta.

En cuanto al análisis de diversidad genética, la presentada por el clado A fue mayor que la del clado B, implicando que el clado A puede representar el centro de distribución genética.

En síntesis, la distribución de los haplotipos de *M. huascari* reveló una ausencia de relación con las distribuciones geográficas de los individuos muestreados, sugiriendo la pérdida de estructura geográfica. Un resultado similar fue obtenido por Silva *et al.* (2011), quienes al analizar las poblaciones amazónicas de la tortuga *Podocnemis sextuberculata* hallaron una pérdida de estructura poblacional, la cual fue atribuida a la presencia de un haplotipo muy frecuente distribuido a través de todas las áreas muestreadas. Del mismo modo, Romero (2010) al analizar la filogeografía de *Systrophia helicycloides* en la Amazonía peruana notó la presencia de haplotipos distribuidos en más de una localidad lo cual condujo a la ausencia de estructura geográfica de la diversidad genética.

En este contexto, a pesar de que los caracoles terrestres presentan poca vagilidad (Hugall *et al.*, 2002), condición que los predispone a un claro aislamiento y diferenciación entre sus poblaciones, las condiciones cambiantes de ambientes más dinámicos, como es el caso del bosque amazónico (Whitmore, 1998), pueden modificar la distribución de sus poblaciones y provocar una mayor dispersión de los individuos (Romero, 2010).

#### **7.5. Linajes genéticamente diferenciados y estructurados**

Los resultados del estadístico *Fst* y el test de AMOVA, muestran que las poblaciones de *M. huascari*, al igual que las de otros caracoles terrestres de la Amazonía peruana (Romero, 2010), tienen un escaso nivel de estructura genética. Sin embargo, sí existe estructuración a nivel de los dos clados propuestos. Un resultado similar fue observado por Yang *et al.* (2012) quienes al estudiar la filogeografía de los peces *Squalidus argentatus* en China y Taiwan, hallaron ausencia de estructura en las poblaciones, así como, la formación de dos linajes bien diferenciados.

La estructura y diferenciación genética de los clados A y B son resultado del aislamiento geográfico y la capacidad limitada de dispersión en la especie. Los efectos de este aislamiento geográfico se ven reflejados en la ausencia de haplotipos compartidos (Avice, 2000). Este aislamiento pudo haberse generado por el retiro de las poblaciones de estos caracoles a zonas de mayor altitud a manera de refugios, provocado por la pérdida y fragmentación de sus hábitats naturales ocasionado por la creciente actividad humana observada en la zona, como deforestación, caza y expansión de los campos de cultivo. Sin embargo, también podemos atribuir estos resultados a eventos mucho más anteriores a la mano del hombre, los cuales serán discutidos en la siguiente sección.

#### **7.6. Influencia de la Cordillera de los Andes y la incursión humana**

Los patrones biogeográficos en Sudamérica tropical se piensa que han sido influenciados por uno o más factores tales como: los cambios en la distribuciones de la tierra y el mar debido a los movimientos tectónicos o las fluctuaciones del nivel del mar, efectos de barrera de los ríos amazónicos, existencia de refugios aislados durante periodos de sequia del Terciario y Cuaternario, una combinación de efectos de barrera de los ríos y cambios en la vegetación durante los periodos de aridez, interacciones competitivas entre las especies durante los periodos de frio en el Pleistoceno, así como el origen de la Cordillera de los Andes (Antonelli *et al.*, 2010).

Empleando análisis filogeográficos es posible probar la efectividad de la hipótesis de las barreras de flujo génico en la Amazonía (Avice, 2000). Varias barreras paleogeográficas han sido propuestas. La orogénesis de los Andes y los arcos resultantes en conjunto con las introgresiones marinas (Räsänen *et al.*, 1995) han sido hipotetizadas como importantes eventos que causaron la divergencia genética dentro de las especies y las poblaciones (Patton & da Silva, 1998). Varios autores han encontrado soporte para esta hipótesis en especies de roedores y marsupiales (Patton & da Silva, 1998), y sapos (Gascon *et al.*, 2000; Loughheed *et al.*, 1999).

La cordillera de los Andes es una gran cadena de montañas en conexión directa con la Selva tropical. Tiene su origen en el Cretácico (Milnes, 1987) aparentemente procedente de sur a norte y de oeste a este (Taylor, 1991), y ha promovido la especiación en varias formas: creando una variedad de nuevos hábitats montano y premontano neotropical disponibles para la colonización de los primeros ancestros; produciendo vicarianza y consecuentemente aislamiento genético entre las poblaciones a ambos lados de la montaña emergente; cambiando la hidrología y el clima del continente Sudamericano, creando de esta forma nuevas presiones evolutivas en taxa montanos y de tierras bajas (Antonelli *et al.*, 2010).

La influencia de la cordillera de los Andes en la evolución de las especies ha sido analizada en diversos estudios, tales como los realizados en el geco *Gonatodes* (Gamble *et al.*, 2008), en el sapo *Epipedobates trivittatus* (Roberts *et al.*, 2006), en especies de aves del género *Tangara* (Burns & Naoki, 2004), en el mono araña *Ateles* (Collins & Dubach, 2000), así como otras especies distribuidas a lo largo de Sudamérica.

Los resultados de la presente tesis, sugieren que la especie *M. huascari* se diversificó de las demás especies en el Pleistoceno, periodo de continuos ciclos de glaciación e interglaciación que iniciaron hace 1-2 millones de años. Asimismo, la gran divergencia entre los linajes ocurrida hace aproximadamente 150 mil años, permite inferir que la estructura geográfica y genética de estos dos grupos puede haber sido influenciada por procesos geológicos relacionados a la formación de los arcos resultantes de la expansión de la Cordillera de los Andes, lo cual ha originado que en la actualidad las poblaciones de *M. huascari* sean encontradas a una gran altitud, por encima de los 1400 msnm.

El análisis de tiempos de divergencia arrojó un tiempo de 25 mil años para la generación de los haplotipos del linaje B. Este tiempo coincide con el arribo de los humanos a Sudamérica, el cual se halla en un rango de hace 11 000 y 45 000 años

(Dillehay, 1999). En vista de ello es que se propone que los linajes de *M. huascari*, generados antes de la llegada de los humanos a la región, pudieron ser trasladados a localidades diferentes por el hombre, perdiendo así su estructuración geográfica.

### **7.7. Expansión demográfica de las poblaciones de *M. huascari***

Ambas pruebas, test de Tajima y  $F_s$  de Fu, indican sucesos diferentes en las poblaciones de *M. huascari*. Sin embargo, debido a que el test  $F_s$  de Fu ha demostrado ser mucho más sensitivo que el test de Tajima en la detección de crecimiento poblacional, los resultados del estadístico  $F_s$  de Fu serán considerados en este estudio para dar soporte a la hipótesis de expansión poblacional.

Aunque no se halló significancia estadística, los valores negativos de  $F_s$  de Fu en los linajes A y B indican que las poblaciones experimentaron un evento de expansión demográfica siguiendo un modelo neutral, resultado que es compartido con el del análisis demográfico mediante *mismatch distribution*, el cual resultó en una distribución unimodal para ambos linajes, indicando que las poblaciones dentro de los linajes han pasado por una reciente expansión demográfica o que presentan un amplio rango de expansión con altos niveles de migración entre las poblaciones vecinas. Resultados similares también fueron hallados por Yang *et al.* (2012) para peces de la especie *Squalidus argentatus* distribuida al sur de China.

### **7.8. Código de barras de DNA usando el marcador 16S rRNA**

Las secuencias de DNA constituyen la mayor fuente de información que permite entender las relaciones genéticas y evolutivas de las distintas especies de organismos. Estas relaciones biológicas pueden ser evaluadas gracias al desarrollo de dos ramas de la Biología: la filogenética molecular, y la genética de poblaciones. La filogenética molecular se ocupa de las relaciones evolutivas entre diferentes especies, mientras que la genética de poblaciones se encarga de analizar la variación genética existente dentro y entre las poblaciones de una misma especie. En este contexto, el código de

barras del DNA ocupa una posición intermedia ya que busca una amplia cobertura de especies, delimitándolas más que buscando sus relaciones (Hajibabaei *et al.*, 2007).

En recientes años, el código de barras de DNA ha sido empleado con enfoques filogenéticos y comerciales en muchos crustáceos y moluscos (Kim *et al.*, 2010). Inicialmente el *DNA barcoding* fue casi exclusivamente utilizado para estudios de biodiversidad pero en la actualidad ha sido extendido incluso hasta permitir la identificación de especies en alimentos procesados para la comercialización (Tanabe *et al.*, 2007; Dawnay *et al.*, 2007).

El enfoque basado en distancias mediante NJ puede ser empleado para la identificación de especies a nivel molecular, pues permiten mostrar la existencia de monofilia en los haplotipos de una determinada especie.

Por otro lado, la divergencia genética también juega un rol importante a la hora de establecer los límites entre una especie y otra. En este sentido Hebert *et al.* (2004) propusieron un umbral estándar para definir nuevas especies, este umbral, conocido como *barcoding gap* define que la divergencia interespecífica debe ser 10 veces mayor a la intraespecífica; en la tabla 12 se puede observar que la variación intraespecífica de *M. huascari* (1.5%) es diez veces menor que aquella encontrada con su especie hermana, *M. separabilis* (11.6%).

Considerando los resultados de 1) la comparación de las secuencias de *M. huascari* con la base de datos del *GenBank*, 2) el establecimiento de la monofilia entre sus haplotipos y 3) la distancia genética interespecífica mayor que la intraespecífica, puede determinarse la validez del perfil genético 16S rRNA como código de barras de DNA para la especie *M. huascari*.

### **7.9. *M. huascari*: una especie promisorio del biocomercio**

Como ya se mencionó, la caracterización genética de especies de importancia ecológica y comercial es vital pues permite su identificación y diferenciación de otras, en especial si se trata de especies nativas y/o endémicas. Tal es el caso de un grupo

de moluscos gastrópodos de Chile, estudiados por Aguilera-Muñoz *et al.* (2009), quienes analizaron las secuencias de cuatro especies nativas y dos exóticas de moluscos acuícolas, principal recurso marino cultivado y comercializado en ese país, los cuales a pesar de su importancia, presentaban escasos estudios a nivel molecular. Este trabajo permitió analizar la divergencia entre las secuencias de los genes empleados (16S rRNA, COI, ITS1-5.8S- ITS2 rDNA), establecer las relaciones filogenéticas de las seis especies analizadas, así como agruparlas en familias, proporcionando las bases que permitan su certificación a nivel comercial.

La presente tesis permite considerar a la especie *M. huascari* como promisoría del biocomercio, debido a las diferentes propiedades que comparte con otros miembros de su familia, los cuales han sido materia de diversos estudios. Entre éstas, destacan las propiedades nutricionales, pues según estudios realizados en algunas especies de *Megalobulimus* (*M. capillaceus*, *M. maximus*, *M. oblongus*), la carne de estos gastrópodos presenta alto contenido de minerales y proteínas, así como un escaso contenido en grasa y colesterol (Ramírez y Cáceres, 1991; Romairone, 2002). Así también, las propiedades medicinales de estos caracoles han sido aprovechadas por las comunidades nativas a lo largo de los años para curar afecciones respiratorias, y en la actualidad, este conocimiento se ha extendido de tal forma que en diversas publicaciones se reconoce a estos especímenes como potenciales remedios usados en medicina tradicional en Latinoamérica para contrarrestar enfermedades como el asma (Alves y Alves, 2011). Asimismo, a juzgar por lo observado en las salidas de campo, cabe considerar que la especie podría ser altamente cultivada con una baja inversión inicial, actividad que junto a su ya caracterizada diversidad genética registrada en la presente tesis, impulsarían los esfuerzos por consolidar a esta especie en el biocomercio. A esto se le suma que en la actualidad hay una demanda creciente de moluscos terrestres en España, Francia, Italia y otros lugares del mundo (Martinez, 2002; Rodriguez, 2006). Razones por las cuales, el cultivo y la comercialización de *M.*

*huascari* podrían convertirse en una atractiva nueva actividad económica en nuestro país. Actividad económica que ya contaría con una certificación comercial a nivel molecular, gracias al desarrollo de esta tesis.

#### **7.10. Implicancias en conservación**

En la actualidad, la tasa de extinción de especies es una de las mayores en la historia de nuestro planeta (Lawton & May, 1995). Esta pérdida de diversidad biológica es preocupante, ya que la biodiversidad tiene importantes beneficios para la humanidad (Balmford *et al.*, 2002). A pesar de las numerosas acciones encaminadas a evitar la progresiva pérdida de especies, aún son relativamente escasos los esfuerzos de conservación sobre la fauna invertebrada, siendo que esta supone aproximadamente el 97% de la diversidad de especies conocidas, y cumple un importante papel en los ecosistemas (Nee, 2004). Dentro de los invertebrados, los moluscos son el grupo animal que registra el mayor número de extinciones documentadas, con los moluscos terrestres mostrando el mayor descenso poblacional en los últimos años (Lydeard *et al.*, 2004).

*M. huascari*, un caracol endémico de la Selva Central del Perú, cuyo hábitat se restringe a zonas de mayor altitud, sobre los 1400 msnm, cumple importantes funciones al ser un importante eslabón de la cadena trófica, incluyendo al ser humano como uno de los depredadores, el cual se beneficiaría de su conservación.

Las principales amenazas que sufre esta especie son: la destrucción de su hábitat generado por actividades humanas como la deforestación, expansión de las zonas urbanas y campos de cultivo, actividad ganadera, así como la construcción de carreteras, lo cual ha venido alterando la dinámica natural de los bosques. En este sentido, cabe mencionar que en la actualidad, el departamento de Junín posee tan sólo un 6% de superficie de bosque, siendo el resto de área destinado a la agricultura, zonas residenciales, comerciales, industriales, de protección, entre otros (INDECI,

2007). Por otro lado, el calentamiento global puede modificar los ciclos de actividad e incrementar la mortandad de los ejemplares inmaduros de esta especie.

Finalmente, cabe destacar la acción directa del ser humano, mediante la recolección de ejemplares con fines gastronómicos y ornamentales. Actividades que han venido siendo desarrolladas desde hace siglos, como sucede con las familias nativas de las comunidades ashaninkas, las cuales recolectan y consumen caracoles para balancear su dieta, ya que estas son fuente de proteínas (INRENA, 2002). Cabe mencionar que el empleo de caracoles por los antiguos peruanos no sólo se halló restringido a las zonas de Selva sino también se extendió a zonas de la Costa del Perú, afirmación sustentada en evidencias registradas por Shadi (2006), quien halló restos de caracoles pertenecientes al género *Megalobulimus* durante sus investigaciones realizadas a la ciudadela de Caral en Lima.

Actualmente, *M. huascari* no está considerada dentro de ninguna lista de especies protegidas. El presente estudio considera que deben tomarse acciones inmediatas que permitan orientar a la población sobre el uso sustentable de esta especie, a fin de preservar su diversidad genética y minimizar los posibles riesgos de extinción.

La presente tesis ha permitido mostrar la forma en que la especie *Megalobulimus huascari* se halla estructurada tanto a nivel genético como poblacional, conocimientos que aportan a su identificación y diferenciación de diversas especies, lo cual permitirá no sólo optimizar las medidas relacionadas a su conservación y uso sustentable, sino también certificar a la especie dentro del biocomercio. Por otro lado, debe destacarse que desconocemos si las poblaciones de *M. huascari* están creciendo, se encuentran estables o en declive. Y este es un primer punto que tendríamos que resolver para poder actuar de manera precisa ya sea en busca de su conservación o introducción en el biocomercio.

## 8. CONCLUSIONES

La especie *M. huascari* forma un grupo monofilético estructurado en dos linajes (Linaje A y Linaje B).

La alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica en las poblaciones de *Megalobulimus huascari* son atribuidas a una reciente expansión poblacional.

Las poblaciones del linaje A representarían el centro de distribución génica en *M. huascari*.

La orogénesis de la Cordillera de los Andes ha influenciado la evolución de la especie *M. huascari*.

*M. huascari* posee un perfil 16S rRNA característico, que permite diferenciarlo de otras especies y que puede ser empleado para su identificación.

## 9. REFERENCIAS

- AGUILERA-MUÑOZ, F.; LAFARGA-CRUZ, F.; GALLARDO-ESCÁRATE, C. Molecular analysis in Chilean commercial gastropods based on 16S rRNA, COI and ITS-5.8s-ITS2 rDNA sequences. *Gayana*. 2009, vol. 73, n° 1, p. 17-27.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990, vol. 215, p. 403-410.
- ALVES, Rómulo y ALVES, Humberto. The faunal drugstore: Animal-based remedies used in traditional medicines in Latin America. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2011, vol. 7, p. 9. doi:10.1186/1746-4269-7-9
- ANTONELLI, A.; QUIJADA-MASCAREÑAS, A.; CRAWFORD, A.J.; BATES, J.M.; VELAZCO, P.M.; WÜSTER, W. Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. En: HOORN, C.; WESSELINGH, F.; VONHOFF, H. (edit.). *Amazonia: Landscape and Species Evolution*. Oxford: Blackwell Publishing, 2010, p. 386-404.
- AVISE, John C. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, 2000. ISBN 0-674-66638-0.
- AVISE, John C. *Molecular markers, natural history and evolution*. 2nd ed. New York, U.S.: Sinauer Associates Inc, 2004. ISBN 0-87893-041-8.
- BALMFORD, A.; BRUNER, A.; COOPER, P.; COSTANZA, R.; FARBER, S.; GREEN, R.E.; JENKINS, M.; JEFFERISS, V.; JESSAMY, J.; MADDEN, K.; MUNRO, N.; MYERS, S.; NAEEM, J.; PAAVOLA, M.; RAYMENT, P.; ROSENDO, S.; ROUGHGARDEN, J.; TRUMPER K.; TURNER K. Economic reasons for conserving wild nature. *Science*. 2002, vol. 297, p. 950-953.
- BANDELT, H.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 1999 vol. 16, p. 37-48.
- BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; SAYERS, E. W. GenBank. Bethesda: USA. *Nucleic Acids Research*. 2011, vol. 39, p. D32-D37.
- BEQUAERT, J. C. Monograph of the Strophocheilidae a Neotropical family of terrestrial mollusks. *Bull. Mus. comp. Zool. Harvard*. 1948, vol. 100, n° 1, p. 1-210.
- BORDA PÚA, Víctor Octavio. "Especies de *Megalobulimus* (MOLLUSCA: MEGALOBULIMIDAE) con peristoma rojo del Perú: discriminación, estatus taxonómico y descripción de una nueva especie".

- Asesor: Rina Ramírez Mesías. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Ciencias Biológicas, Lima, 2011.
- BROWN, W.; GEORGE, M.; WILSON, A. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, vol. 76, p. 1967-1971.
- BUNJE, P.M.E. Pan-European phylogeography of the aquatic snail *Theodoxus fluviatilis* (Gastropoda: Neritidae). *Molecular Ecology*. 2005, vol. 14, p. 4323–4340.
- BURNS, K.J. and NAOKI, K. Molecular phylogenetics and biogeography of Neotropical tanagers in the genus *Tangara*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2004, vol. 32, p. 838–854.
- CBD. Convenio de Diversidad Biológica. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. 1992.
- CHIBA, S. Accelerated evolution of land snails *Mandarina* in the oceanic Bonin Islands. *Evolution*. 1999, vol. 53, p. 460-471.
- COLLINS, A.C. and DUBACH, J.M. Phylogenetic relationships of spider monkeys (*Ateles*) based on mitochondrial DNA variation. *Int J Primatol.* 2000, vol. 21, p. 381–420.
- CONGRAINS, C.; CHIRINOS, J.; RAMÍREZ, R; RAMÍREZ, P. “Extremadamente baja diversidad genética de *Megalobulimus capillaceus* (Mollusca, Gastropoda) de la Región de San Martín-Perú”. En: XVIII Reunión Científica ICBAR. Lima, Perú, 19-21 Agosto 2009, p.71.
- CONGRAINS CASTILLO, Carlos. “Ayudando a descifrar el enigma taxonómico, el código de barras de DNA de *Megalobulimus* spp. (Mollusca, Gastropoda) del departamento de San Martín – Perú”. Asesor: Rina Ramírez Mesías. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Genética y Biotecnología, Lima, 2010.
- DAWNAY, N.; OGDEN, R.; MCEWING, R.; CARVALHO, G.R.; THORPE, R.S. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci. Intl.* 2007, vol. 173, p. 1-6.
- DILLEHAY, T.D. The Late Pleistocene cultures of South America. *Evolutionary Anthropology*. 1999, vol. 7, n° 6, p. 215.
- DOYLE and DOYLE. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987, vol. 19, p. 11-15.
- DYER N.; LAWTON, S.; RAVEL, S.; CHOI, K.; LEHANE, M.; ROBINSON, A.; OKEDI, L.; HALL, M.; SOLANO, P.; DONNELLY, M. Molecular phylogenetics of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) based on

- mitochondrial (COI, 16S, ND2) and nuclear ribosomal DNA sequences, with an emphasis on the palpalis group. *Mol Phylogenet Evol.* 2008, vol. 49, n<sup>o</sup> 1, p. 227-239.
- ELEJALDE, A.; MADEIRA, M.J.; ARRÉBOLA, J.R.; MUÑOZ, B.; GÓMEZ-MOLINER, B.J. Molecular phylogeny, taxonomy and evolution of the land snail genus *Iberus* (Pulmonata:Helicidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research.* 2008, vol. 46, p.193-202.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 1992, vol. 131, p. 479–491.
- EXCOFFIER, L. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Mol. Ecol.* 2004, vol. 13, n<sup>o</sup> 4, p. 853-864.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* 2005, vol. 1, p. 47–50.
- FENG, Y.; LI, Q.; KONG, L.; ZHENG, X. DNA barcoding and phylogenetic analysis of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial COI and 16S rRNA genes. *Mol. Biol. Rep.* 2011, vol. 38, p. 291–299.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1994, vol. 3, p. 294–299.
- FREDERICO, R.G.; FARIAS, I.P.; GÓES DE ARAÚJO, M.L.; CHARVET-ALMEIDA P.; ALVES-GOMES, J.A. Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology.* 2012, vol. 10, n<sup>o</sup> 1, p. 71-80.
- FU, Y.-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitch-hiking, and background selection. *Genetics.* 1997, vol. 147, p. 915-925.
- GAMBLE, T.; SIMONS, A.M.; COLLI, G.R.; VITT, L.J. Tertiary climate change and the diversification of the Amazonian gecko genus *Gonatodes* (Sphaerodactylidae, Squamata). *Mol Phylogenet Evol.* 2008, vol. 46, p. 269–277.
- GASCON, C.S.; MALCOLM, J.R.; PATTON, J.L.; DA SILVA, M.N.F.; BOGART, J.P.; LOUGHEED, S.C.; PERES, C.A.; NECKEL, S.; BOAG, P.T. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000, vol. 97, p. 13672–13677.

- GRANT, W.S. and BOWEN, B.W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.* 1998, vol. 89, p. 415–426.
- HAJIBABAEI M., G.A. SINGER, P.D. HEBERT & D.A. HICKEY. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.* 2007, vol. 23, n° 4, p.167-172.
- HARPENDING, H.C.; BATZER, M.A.; GURVEN, M.; JORDE, L.B.; ROGERS A.R.; SHERRY, S.T. Genetic traces of ancient demography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998, vol. 95, p. 1961–1967.
- HEBERT, P.; CYWINSKA, A.; BALL S.; DE WAARD, J. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Royal Soc. London. B. Biol. Sci.* 2003, vol. 270, p. 313-321
- HEBERT, P. and GREGORY, T. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst. Biol.* 2005, vol. 54, p. 852-859.
- HUANG, X. and MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Research.* 1999, vol. 9, p. 868-877.
- HUELSENBECK, J.P. AND RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2001, vol. 17, n° 8, p. 754-755.
- HUGALL, A.; MORITZ, C.; MOUSSALLI A.; STANISIC, J. Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Gnarosophia bellendenkerensis* (Brazier 1875). *PNAS.* 2002, vol. 99, p. 6112-6117.
- INDECI. Instituto Nacional de Defensa Civil. Mapa de peligros, plan de usos del suelo y medidas de mitigación ante desastres de la ciudad de San Ramón. Proyecto INDECI – PNUD PER/02/051. Diciembre 2007. 273 pp.
- INRENA. Instituto Nacional de Recursos Naturales. Reserva comunal ashaninka. Expediente técnico de categorización de la zona reservada Apurímac. Noviembre 2002. 43 pp.
- KIM, S.; EO, H.S.; KOO, H.; CHOI, J.K.; KIM, W. DNA barcode-based molecular identification system for fish species. *Mol. Cells.* 2010, vol. 30, p. 507-512.
- KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature.* 1968, vol. 217, p. 624-626.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980. 16: 111–120.

- LANAVE, C.; PREPARATA, G.; SACCONI, C.; SERIO, G. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.* 1984, vol. 20, n° 1, p. 86-93.
- LANE, D.; PACE, B.; OLSEN, G.; DAVID, A.; SOGIN, M.; PACE, N. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985, vol. 82, p. 6955-6959.
- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007, vol. 23, p. 2947–2948.
- LAWTON, J.H. and MAY, R.M. Extinction rates. Oxford University Press. Oxford. 1995.
- LOUGHEED, S.C.; GASCON, C.; JONES, D.A.; BOGART, J.P.; BOAG, P.T. Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonia diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1999, vol. 266, p. 1829–1835.
- LUKHTANOV, V.A.; SOURAKOV, A.; ZAKHAROV, E.V.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding Central Asian butterflies: increasing geographical dimension does not significantly reduce the success of species identification. *Mol. Ecol. Resour.* 2009, vol. 9, p. 1302–1310.
- LYDEARD, C.; COWIE, R.H.; PONDER, W.F.; BOGAN, A.E.; BOUCHET, P.; CLARK, S.A.; CUMMINGS, K.S.; FREST, T.J.; GARGOMINY, O.; HERBERT, D.G.; HERSHLER, R.; PEREZ, K.E.; ROTH, B.; SEDDON, M.; STRONG, E.E.; THOMPSON, F.G. The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience.* 2004, vol. 54, p. 321-330.
- MARTÍNEZ, S. Caracoles, Alimentación y Comercialización. 2002. <http://www.agroconnection.com>
- MATSUMOTO, M. and HAYAMI, I. Phylogenetic analysis of the family Pectinidae (Bivalvia) based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1. *Journal of Molluscan Studies.* 2000, vol. 66, p. 477-488.
- MAYNARD, S. and HAIGH, J. The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genet. Res.* 1974, vol. 23, p. 23-35.
- McCARTHY, C. Chromas: version 1.3. Griffith University, Brisbane, Australia. 1996.
- MILNES, A.G. Tectonic evolution of the southern Andes, Tierra del Fuego: A summary. En: SCHAEER, J.-P., RODGERS, J. (edit.). *The Anatomy of Mountain Ranges.* Princeton: Princeton University Press, 1987, p. 173–177.

- MOORE, W.S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*. 1995, vol. 49, p. 718–726.
- NEE, S. More than meets the eyes. Earth's real biodiversity is invisible, whether we like it or not. *Nature*. 2004, vol. 429, p. 804-805.
- NEI, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. 1987.
- PAGE, R. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. 1996, vol. 12, p. 357-358.
- PALUMBI, R. Nucleic Acids II: The polymerase Chain Reaction. En: HILLIS, D.; MORITZ, C. and MABLE, B. (edit.). *Molecular Systematics*, 1996, p. 205-247.
- PATTON, J.L. and DA SILVA, M.N.F. Rivers, refuges and ridges: the geography of speciation of Amazonian mammals. En: Howard, D.J. and Berlocher, S.H. (edit.). *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, New York, 1998, p. 202–212.
- PFENNINGER, M. and MAGNIN, F. Phenotypic evolution and hidden speciation in *Candidula unifasciata* ssp. (Helicellinae, Gastropoda) inferred by 16S variation and quantitative shell traits. *Molecular Ecology*. 2001, vol. 10, p. 2541-2554.
- PFENNINGER, M. and POSADA, D. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution*. 2002, vol. 56, n° 9, p. 1776–1788.
- PFENNINGER, M.; POSADA, D. and MAGNIN, F. Evidence for survival of Pleistocene climatic changes in Northern refugia by the land snail *Trochoidea geyeri* (Soós 1926) (Helicellinae, Stylommatophora). *BMC Evolutionary Biology*. 2003, vol. 3, p. 8.
- PHILIPPS, M.J.; DELSUC, F. and PENNY, D. Genome-scale phylogeny and the detection of systematic biases. *Mol. Biol. Evol.* 2004, vol. 21, p. 1455-1458.
- POSADA, D. and CRANDALL, K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998, vol. 14, n° 9, p. 817-818.
- POSADA, D. and BUCKLEY, T. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches over Likelihood Ratio Tests. *Syst. Biol.* 2004, vol. 53, n° 5, p. 793–808.
- PRIMACK, R.B. and RODRIGUES, E. *Biologia da Conservação*. Londrina-Paraná, Brasil, 2001. 327 p.

- RAMIREZ MALAVER, Jorge Luis. "Genómica evolutiva de *Bostryx aguilar* (Gastropoda: Orthalicidae), relaciones filogenéticas con otros Orthalicidos del Perú". Asesor: Rina Ramírez Mesías. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Genética y Biotecnología, Lima, 2009.
- RAMÍREZ, R. y CÁCERES, S. Caracoles terrestres (Mollusca, Gastropoda) comestibles en el Perú. *Boletín de Lima*. 1991, vol. 77, p. 67-74.
- RAMÍREZ, R; PAREDES, C. and ARENAS, J. Moluscos del Perú. *Rev. Biol. Trop.* 2003, vol. 51, n° 3, p. 225-284, 2003.
- RAMÍREZ MESÍAS, Rina Lastenia. "Sistemática e Filogeografía dos Moluscos do Ecosistema de "Lomas" do Deserto da Costa Central do Peru". Tese de Doutorado em Zoologia. PURS, Brasil, 2004.
- RAMÍREZ, R; CONGRAINS, C.; CALDERÓN, J.; RAMÍREZ, J.; CHIRINOS, J.; MATOS, P.; QUISPE, M.; FERNÁNDEZ, D.; BORDA, V.; MEDINA, N.; BRACAMONTE, O.; RAMÍREZ, P. "Avances en el conocimiento de la genómica mitocondrial de caracoles terrestres comestibles del género *Megalobulimus* (Mollusca, Gastropoda) de la Amazonía Peruana". En: 13° Congreso Latinoamericano de Genética, VI Congreso Peruano de Genética. Lima, Perú, 4-7 Mayo 2008, p. 229.
- RAMÍREZ, R; BORDA, V.; CONGRAINS, C.; CHIRINOS, J.; FERNÁNDEZ, D.; QUISPE, M.; ROMERO, P.; CALDERÓN, J.; MEDINA, N.; ZARRIA, J.; RAMÍREZ, P. "Diferenciación morfológica y molecular en cuatro especies comerciales de *Megalobulimus* (Mollusca, Gatropoda)". En: XVIII Reunión Científica ICBAR. Lima, Perú, 19-21 Agosto 2009a, p. 229.
- RAMÍREZ, R; CONGRAINS, C.; CHIRINOS, J.; BORDA, V. "Variantes genéticas y morfológicas en caracoles comestibles de la Amazonía Peruana". En: VII Congreso Peruano de Genética. Cusco, Perú, 14-16 Octubre 2009b.
- RAMÍREZ, R; BORDA, V.; CHIRINOS, J. "Variabilidad de la concha en *Megalobulimus huascari* (Mollusca, Gatropoda)". En: XIX Reunión Científica ICBAR. Lima, Perú, 26-27 Agosto 2010a, p.100.
- RAMÍREZ, R; CHIRINOS, J.; ZÚÑIGA, L.; BORDA, V. "Biogeografía de *Megalobulimus* spp. en el Valle del Chanchamayo". En: XIX Reunión Científica ICBAR. Lima, Perú, 26-27 Agosto 2010b, p.135.
- RAMÍREZ, R.; BORDA, V.; ROMERO, P.; RAMIREZ, J.; CONGRAINS, C.; CHIRINOS, J.; RAMÍREZ, P.; VELÁSQUEZ, L.E.; MEJÍA, K. Biodiversidad y endemismo de moluscos terrestres en la Amazonía occidental, con especial referencia a *Megalobulimus* y *Systrophia*. *Rev. peru. biol.* 2012, vol. 19, n° 1, p. 59–74.

- RÄSÄNEN, M.E.; LINNA, A.M.; SANTOS, J.C.R.; NEGRI, F.R. Late Miocene tidal deposits in the Amazonian foreland basin. *Science*. 1995, vol. 269, p. 386–389.
- RATNASINGHAM, S. and HEBERT, P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System 19 ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Mol Ecol Notes*. 2007. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
- RAY, N.; CURRAT, M. and EXCOFFIER, L. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Mol. Biol. Evol.* 2003, vol. 20, p. 76-86.
- ROBERTS, J.L.; BROWN, J.L.; MAY, R.V.; ARIZABAL, W.; SCHULTE, R.; SUMMERS, K. Genetic divergence and speciation in lowland and montane peruvian poison frogs. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2006, vol. 41, p. 149–164.
- RODRÍGUEZ A., Víctor Hugo. Cultivo de caracoles para la exportación. <http://www.tattersall.cl/revista/REV171/Produccion.htm> - 18k.
- ROGERS, A.R. and HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 1992, vol. 9, p. 552-569.
- ROGERS, A.R. Genetic evidence for a Pleistocene population expansion. *Evolution*. 1995, vol. 49, p. 608-615.
- ROMAIRONE, A. Caracoles: Características. Nutritivas. En: RENGIFO A. PEREZ P. PINEDO L. Caracterización Morfológica del "Congompe" *Megalobulimus maximus* (Sowerby, 1825) y posibilidades de su cultivo, Iquitos-Perú. MEMORIAS: Manejo de Fauna Silvestre en Amazonía y Latinoamérica. 2002, p. 269-275.
- ROMERO, Pedro Eduardo. "Diversidad y estructura genética de *Bostryx scalariformis* (Mollusca, Gastropoda) en base a polimorfismos del gen mitocondrial 16S rRNA". Asesor: Rina Ramírez Mesías. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Ciencias Biológicas, Lima, 2008.
- ROMERO, P. "Filogeografía de *Systrophia helicycloides*: El reflejo de la dinámica del bosque lluvioso tropical en los genes 16S rRNA y COI de moluscos terrestres". Asesor: Rina Ramírez Mesías. Tesis Maestría en Biología Molecular. UPG-FCB, Lima, 2010.
- ROSS, T. Phylogeography and conservation genetics of the Iowa Pleistocene snail. *Molecular Ecology*. 1999, vol. 8, n° 9, p. 1363-1373.
- ROZAS, J.; SANCHEZ-DEL BARRIO, J.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and omethods. *Bioinformatics*. 2003, vol. 19, p. 2496-2497.

- SAIKI, R.; GELFAND, D.; STOFFEL, S.; SCHARFJ, S.; HIGUCHI, R.; HORN, G.; MULLIS, K.; ERLICH, H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988, vol. 239, p. 487–91.
- SAITOU, N. and NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987, vol. 4, p. 406-425.
- SCHNEIDER, S.; ROESSILI, D. and EXCOFFIER, L. ARLEQUIN: Version 2.000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland. 2000.
- SHADY, Ruth. La civilización Caral: sistema social y manejo del territorio y sus recursos. Su trascendencia en el proceso cultural andino. *Boletín de Arqueología PUCP*. 2006, vol. 10, p. 59-89. ISSN 1029-2004
- SILVA, T.J.; MONJELÓ, L.A.S.; VIANA, M.N.S.; PEZZUTI, J.C.; ANDRADE, P.C.M.; VOGT R.C.; FARIAS, I.P. Population genetics analysis of *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemidae): lack of population structure in the central Amazon Basin. *Genetics and Molecular Research*. 2011, vol. 10, n<sup>o</sup> 3, p. 1393-1402.
- SLATKIN, M. and HUDSON, R.H. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*. 1991, vol. 129, p. 555-562.
- STOECKLE, M. Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *BioScience*. 2003, vol. 53, n<sup>o</sup> 9, p. 2-3.
- SWOFFORD, D. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0b8a. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA. 1998.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989, vol. 123, p. 585-595.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 2007, vol. 24, p. 1596-1599.
- TANABE, S.; MIYAUCHI, E.; MUNESHIGE, A.; MIO, K.; SATO, C.; SATO, M. PCR method of detecting pork in foods for verifying allergen labelling and for identifying hidden pork ingredients in processed foods. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2007, vol. 71, p. 1663-1667.
- TAYLOR, D.W. Paleobiogeographic relationships of Andean angiosperms of Cretaceous to Pliocene age. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 1991, vol. 88, p. 69–84.

- VENCES, M.; THOMAS, M.; MEIJDEN, A.; CHIARI, Y.; VIEITES, D. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*. 2005, vol. 2, p. 5.
- WÄGELE, J.W. and MAYER, C. Visualizing differences in phylogenetic information content of alignments and distinction of three classes of long-branch effects. *BMC Evol Biol*. 2007, vol. 7, p. 147.
- WHITMORE, T. Potential impact of climatic change on tropical rain forest seedlings and forest regeneration. *Climatic Change*. 1998, vol. 39, n<sup>o</sup> 2/3, p. 429-438.
- XIA, X., and XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*. 2001, vol. 92, p. 371-373.
- YANG, J.-Q.; TANG, W.-Q.; LIAO, T.-Y.; SUN, Y.; ZHOU, Z.-C.; HAN, C.-C.; LIU, D.; LIN, H.-D. Phylogeographical Analysis on *Squalidus argentatus* Recapitulates Historical Landscapes and Drainage Evolution on the Island of Taiwan and Mainland China. *Int. J. Mol. Sci*. 2012, vol. 13, p. 1405-1425. doi: 10.3390/ijms13021405.
- ZHANG, D.X. and HEWITT, G.M. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol*. 1996, vol. 11, p. 247–251.
- ZINK, R.M. and Barrowclough, G.F. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Mol. Ecol*. 2008, vol. 17, p. 2107–2121.