

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN
ACUICULTURA**



**“Identificación molecular de invertebrados marinos de interés
comercial de la bahía El Ferrol, Chimbote, Perú, a través de la técnica
de Código de Barras de ADN”**

AUTOR:

Bach. José Jhoel Gonzáles Máximo

ASESOR:

M. Sc. Eliana Victoria Zalada Mázmela

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



“Identificación molecular de invertebrados marinos de interés comercial de la bahía El Ferrol, Chimbote, Perú, a través de la técnica de Código de Barras de ADN”

AUTOR:

Bach. José Jhoel Gonzáles Máximo

ASESOR:

M.Sc. Eliana Victoria Zelada Mázmela

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



“Identificación molecular de invertebrados marinos de interés comercial de la bahía El Ferrol, Chimbote, Perú, a través de la técnica de Código de Barras de ADN”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

Bach. José Jhoel Gonzáles Máximo

Asesora: M.Sc. Eliana Victoria Zelada Mázmela

Co-Asesor: Blgo. Lorenzo Eduardo Reyes Flores

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



“Identificación molecular de invertebrados marinos de interés comercial de la bahía El Ferrol, Chimbote, Perú, a través de la técnica de Código de Barras de ADN”

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR
PRESENTADO POR:**

José Jhoel Gonzáles Máximo

APROBADO POR EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR LOS
SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Carlos Azañero Díaz
Presidente

Blga. Carmen Yzásiga Barrera
Integrante

M. Sc. Eliana Zelada Mázmela
Integrante

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el Aula multimedia 3^{er} piso Facultad de Ciencias, siendo las 12:00 horas del día 27.11.19, dando cumplimiento a la Resolución N° 201-2019-UNS-FC se reunió el Jurado Evaluador presidido por Dr. Carlos Aguirre Díaz, teniendo como miembros a Blg. Carmen Izariga Barren (secretario) (a), y M.Sc. Eliana Zelada Higuera (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de Biólogo Acuicultor, realizado por el, (la), (los) tesista (as) José Shoaí Anzures Marín

....., quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada:

"Identificación moléculas de invertebrados marinos de interés comercial de la Bahía El Ferrol, Chimbote, Perú, a través de la técnica de Código de Barras de ADN".

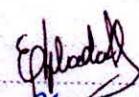
Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como de sobresaliente asignándole un calificativo de 19 puntos, según artículo 103° del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa, vigente (Resolución N° 492-2017-CU -R-UNS)

Siendo las 13:45 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad


Nombre: Dr. Carlos Aguirre Díaz
Presidente


Nombre: Blg. Carmen Izariga Barren
Secretario


Nombre: M.Sc. Eliana Zelada Higuera
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (3), tesis (1) y archivo (02).





Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: **José Jhoel Gonzáles Máximo**
Título del ejercicio: **PREGRADO - BIOLOGIA**
Título de la entrega: **Identificación molecular de inverteb...**
Nombre del archivo: **TESIS.pdf**
Tamaño del archivo: **1.72M**
Total páginas: **101**
Total de palabras: **23,952**
Total de caracteres: **139,759**
Fecha de entrega: **09-dic-2019 09:17a.m. (UTC-0500)**
Identificador de la entrega: **1230590111**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



"Identificación molecular de invertebrados marinos de interés comercial de la bahía El Ferrol, Chimbote, Perú, a través de la técnica de Código de Barras de ADN"

AUTOR:

Bach. José Jhoel Gonzales Máximo

ASESOR:

M.Sc. Eliana Victoria Zejada Mázmeza

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ
2019

*El hombre forja muchos proyectos, pero al final prevalecen
los designios del Señor.*

Proverbios 19:21

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi Dios, quién dio su vida por mi existir, por darme a la hermosa familia, por estar conmigo a pesar de mis errores, por darme las fuerzas para seguir adelante, para no desmayar en los problemas que se presentaban desde los inicios de mi vida universitaria, y enseñarme a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

Ya te lo he ordenado: ¡Sé fuerte y valiente! ¡No tengas miedo ni te desanimes! Porque el Señor tu Dios te acompañará dondequiera que vayas. (Josué 1:9).

GRACIAS.

Para mis padres por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos. A mis hermanas por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar. Los amo.

GRACIAS

AGRADECIMIENTO

La culminación de esta tesis es el resultado a la dedicación e ilusión personal y la de mi familia. Durante este tiempo muchas personas, me han apoyado y ayudado, y a todas ellas quiero expresar mi más sincera gratitud.

Agradezco en primer lugar a mi Dios el Todo Poderoso. A nuestra madre la Virgen María por su intersección constante.

A mi asesora de tesis, la Blga. Eliana Zelada Mázmela, quien con paciencia y dedicación ha sabido guiarme con su conocimiento y el amor a la ciencia. La profesora, a quien quedaré siempre agradecido, por encaminarme, corregirme cuando ha sido necesario. Gracias a usted he podido obtener nuevos conocimientos y he podido desenvolverme en nuevas técnicas que en la vida universitaria no se me fueron impartidas. Por su apoyo y consejo incondicional en los momentos difíciles y por su amor a quienes forma y enseña. Gracias profesora por todo lo enseñado.

A mi Co-asesor, al Biólogo Eduardo Reyes, por su interminable apoyo en todo este proceso. Gracias a él pude aprender a ser más dedicado y perseverante, pude aprender a continuar y levantarme cada vez que algo no salía bien. Gracias por ser más que un asesor, ser un amigo, alguien que escucha y enseña. Al biólogo Percy Pinedo, por su apoyo en este proceso. Gracias a usted pude aprender a ser más paciente, y continuar a no rendirme cuando no se obtienen los resultados esperados.

A mi profesora, Bióloga Carmen Izásiga, por sus consejos, su alegría y buen humor. Usted nos enseñó y enseña a ver la vida con optimismo, que aunque muchas cosas pueden estar contra nosotros, con fe y haciendo las cosas bien, todo puede resultar al final. Muchas gracias profesora.

Agradezco a cada uno de mis profesores de pregrado, que con diligencia y responsabilidad han velado por cada estudiante y se han dispuesto a apoyarnos y animarnos a siempre salir adelante.

A las personas del Círculo de Investigación: Catalogando la Biodiversidad Marina del Perú, Código de Barras de ADN para el estudio, conservación y uso sostenible de los recursos; junto con el IMARPE y la ONG Pro Delphinus, por haber contribuido con parte del financiamiento de mi trabajo de investigación.

A mi amada Universidad Nacional del Santa, Facultad de Ciencias, Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura. A los amigos del laboratorio, por crear un ambiente alegre de trabajo, perseverancia y compañerismo. Un grupo de trabajo muy unido: Alex, Julissa, Sissy, Karen, Brenda, Panchito, Sonia, Melissa, Naldy, Candela, Rosmery, Erick, Luis, Irina, Claudia y Paola. Gracias por brindarme esa linda amistad fortalecida en un trabajo colaborativo. Me enseñan mucho de sus propias experiencias, viéndolos luchar siempre, esforzándose, y tomando la vida con buen humor. Gracias por hacer que los días en el laboratorio sean siempre los mejores.

A Karla, una persona que siempre extendió una mano para apoyarme, guiar y aconsejar, la persona que me acercó más a Dios y de la que quedare siempre agradecido. A mis compañeros de aula Promoción 2011, que con sus experiencias pude aprender mucho, por el compañerismo y las múltiples risas que brotaron de mi persona por con ustedes, son ejemplo de constancia, de fuerza y alegría. Gracias a Dios por ser parte de mi vida.

Finalmente agradezco a quien lee esta pequeña información “tesis”, por permitir a mis experiencias, investigación y conocimiento, incurrir dentro de su repertorio de información mental.

Para todos ustedes, mi eterna gratitud y cariño.

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	; Error! Marcador no definido.
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1. INVERTEBRADOS MARINOS DE INTERÉS COMERCIAL	6
□ Phylum Mollusca	6
□ Phylum Arthropoda	7
□ Phylum Echinodermata	7
2.2. UTILIZACIÓN DE ADN EN LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES	9
2.3. ADN BARCODING	10
2.3.1. Marcadores mitocondriales	10
2.3.2. Barcoding DNA (Código de barra de ADN)	11
2.3.3. La secuencia del gen <i>Citocromo Oxidasa I</i> (COI) como código de barras	14
2.4. DISTANCIA GENÉTICA INTRAESPECÍFICA E INTERESPECÍFICA APLICADAS A ADN BARCODING	15
3. OBJETIVOS	17
3.1. OBJETIVO GENERAL	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19

4.1. ÁREA DE ESTUDIO	19
4.2. MUESTRA BIOLÓGICA Y COLECTA DE LA MUESTRA	19
4.3. ANÁLISIS GENÉTICOS	21
4.3.1. Extracción de ADN	21
4.3.2. Cuantificación de ADN	21
4.3.3. Evaluación de la calidad de ADN	21
4.3.4. Elección de los marcadores génicos	21
4.3.5. Amplificación por PCR del gen <i>Citocromo Oxidasa I</i>	22
4.3.6. Secuenciación	22
4.4. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	23
4.4.1. Edición de las secuencias	23
4.4.2. BLAST de las secuencias consenso	23
4.4.3. Alineamiento de secuencias consenso	23
4.5. ANÁLISIS DE DIVERGENCIA GENÉTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES	24
4.6. OUTGROUP - <i>Nereis vexillosa</i>	25
4.7. RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA	25
4.7.1. Método de Maximum Likelihood (ML)	26
4.7.2. Método Inferencia Bayesiana (BI)	26
4.8. DELIMITACIÓN DE LA UNIDAD TAXONÓMICA OPERACIONAL MOLECULAR (MOTUs)	27
<input type="checkbox"/> El modelo GMYC	27
<input type="checkbox"/> El modelo bPTP	27
<input type="checkbox"/> El modelo BINs	28
<input type="checkbox"/> El modelo ABGD	28
5. RESULTADOS	29

5.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	29
5.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS SECUENCIAS CONSENSO ..	30
5.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES SOBRE LA BASE DE ESTIMADOS DE DIVERGENCIA GENÉTICA.....	31
5.3.1. Divergencia por especie	31
5.4. DELIMITACIÓN DE ESPECIES EN BASE A ÁRBOLES FILOGENÉTICOS	36
<input type="checkbox"/> Delimitación de MOTUs.....	37
6. DISCUSIÓN	40
7. CONCLUSIONES	49
8. RECOMENDACIONES	50
9. REFERENCIAS.....	51
10. ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procedimientos en laboratorio para obtener el código de barra de ADN, en especímenes recolectados del campo.....	14
Figura 2. Estaciones de muestreo (E-1, E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7) para la captura de invertebrados marinos de interés comercial en la bahía El Ferrol, Chimbote – Perú. Estas estaciones fueron tomadas según los reportes de biodiversidad de invertebrados marinos descritas en el trabajo por Berrú et al. (2007).....	19
Figura 3. Barcoding gap, generado de la comparación entre la distancia máxima intraespecífica vs la distancia interespecífica del vecino más cercano.	35
Figura 4. Esquema de la brecha del <i>Barcoding gap</i> sin superposición entre la distancia genética K2P intraespecífica e interespecífica.	36
Figura 5. Árbol construido en base al método IB y ML, ha obtenido el agrupamiento de 11 MOTUs. Los números sobre los nodos son los valores de probabilidad (probabilidad posterior).....	38
Figura 6. Árbol bayesiano que muestra el agrupamiento de 11 MOTUs, obtenidos a partir de 4 modelos de análisis de delimitación de especies (ABGD, BINs, bPTP, GMYC).....	39
Figura 7. Ejemplar de <i>Acanthopleura echinata</i> , colectado en la bahía El Ferrol.....	69
Figura 8. Ejemplar de <i>Emerita analoga</i> colectado en la bahía El Ferrol.	70
Figura 9. Ejemplar de <i>Thaisella chocolata</i> colectado en la bahía El Ferrol.....	71
Figura 10. Ejemplar de <i>Thaisella chocolata</i> colectado en la bahía El Ferrol.....	72
Figura 11. Ejemplar de <i>Bursa ventricosa</i> colectado en la bahía El Ferrol.	73
Figura 12. Ejemplar de <i>Fisurella maxima</i> colectado en la bahía El Ferrol.	74
Figura 13. Ejemplar de <i>Tagelus dombeii</i> colectado en la bahía El Ferrol.....	75
Figura 14. Ejemplar de <i>Argopecten purpuratus</i> colectado en la bahía El Ferrol.	76
Figura 15. Ejemplar de <i>Semele solida</i> colectado en la bahía El Ferrol.	77
Figura 16. Ejemplar de <i>Octopus mimus</i> colectado en la bahía El Ferrol.....	78
Figura 17. Ejemplar de <i>Cancer porteri</i> colectado en la bahía El Ferrol.	79
Figura 18. Ejemplar de <i>Cancer setosus</i> colectado en la bahía El Ferrol.	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Extracción anual de invertebrados marinos de interés comercial en la bahía El Ferrol, período 2014, 2015 y 2016.	8
Tabla 2. Cebadores utilizados para invertebrados marinos de la bahía El Ferrol	22
Tabla 3. Especies de Invertebrados marinos de interés comercial recolectados en la bahía El Ferrol, identificados por taxonomía tradicional y metodología molecular.	30
Tabla 4. Porcentaje de las bases nitrogenadas, encontradas en las secuencias consenso del fragmento amplificado del gen mitocondrial <i>COI</i> (593 pb), para los 53 especímenes agrupadas por clase.....	31
Tabla 5. Comparación de la distancia genética media y máxima intraespecífica con respecto a la distancia interespecífica del vecino más cercano.....	34
Tabla 6. Distancias genéticas interespecíficas entre especies de invertebrados marinos de la bahía El Ferrol, estimadas por <i>K2P</i> (Kimura, 1980). Debajo de la diagonal, en negrita, se muestran los valores de distancias y encima, los errores estándares de las mismas.	34

ANEXO

ANEXO 1. Descripción taxonómica de: <i>Acanthoplerua echinata</i> , <i>Emerita analoga</i> , <i>Thaisella chocolata</i> , <i>Fisurella maxima</i> , <i>Bursa ventricosa</i> , <i>Tagelus dombeii</i> , <i>Argopecten purpuratus</i> , <i>Semele solida</i> , <i>Octopus mimus</i> , <i>Cancer porteri</i> , <i>Cancer setosus</i>	69
ANEXO 2. Secuencias de las especies: <i>A. echinata</i> , <i>E. analoga</i> , <i>T. chocolata</i> , <i>F. maxima</i> , <i>B. ventricosa</i> , <i>T. dombeii</i> , <i>A. purpuratus</i> , <i>S. solida</i> , <i>O. cf hubbsorum</i> , <i>C. porteri</i> , <i>C. setosus</i> ..	81
ANEXO 3. Codificación PeMar de los especímenes de la bahía El Ferrol para su identificación en el Laboratorio de Genética Fisiología y Reproducción de la Universidad Nacional del Santa y código PMIN asignado por la base de datos internacinal BOLDsystems como muestra voucher para su identificación en la página www.boldsystems.org	85

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se logró la identificación molecular de 11 especies de invertebrados marinos de interés comercial de la bahía El Ferrol, Chimbote-Perú, a través de la técnica Código de Barras de ADN. Para ello se colectaron 110 especímenes y se aplicó la siguiente metodología: extracción de ADN por el método de fenol cloroformo, evaluación de la calidad de ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1%, cuantificación del ADN por espectrofotometría, amplificación del gen mitocondrial *COI* por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y el secuenciamiento de los amplicones.

Del total de especímenes colectados, solo se obtuvieron 53 secuencias consenso, las cuales están agrupadas en 11 especies. Posterior a ello mediante la herramienta blast se realizó la búsqueda de secuencias idénticas en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) y al Sistema de Datos del Código de Barras de la Vida (BOLDSystems), identificando haplotipos similares para 10 especies, y para el caso específico de la especie *F. maxima* no se encontró reporte alguno. Además, quedó demostrado que las secuencias de los especímenes de *T. chocolata* separadas inicialmente en grupo F1 y F2 por sus diferencias fenotípicas han formado clado monofilético con una distancia promedio de 1.35%.

Posteriormente se realizó un análisis estadístico a las secuencias consenso con el algoritmo genético *Kimura 2* parámetros (K2P), obteniendo distancias intraespecíficas menores al 3 %, dicho valor fue criterio en este trabajo para delimitar especies. Las distancias intraespecíficas e interespecíficas de K2P fueron agrupadas por el algoritmo Neighbor – Joining (NJ) obteniéndose clados definidos para 11 especies, las cuales estuvieron fuertemente soportados con los árboles filogenéticos de Inferencia Bayesiana (IB) y *Maximun Likelihood* (ML), a la que a través de soportes estadísticos establecieron 11 Unidades Taxonómicas Operacionales molecular (MOTUs) para los 4 modelos (GMYC, bPTP, ABGD y BINs). Además, se obtuvo un umbral del *barcode gap* de 8.2 x para el grupo de invertebrados de interés comercial de la bahía El Ferrol.

De manera general, el código de barras del ADN constituye una herramienta eficaz en la identificación de los invertebrados marinos para la bahía El Ferrol y una vía rápida para identificar posibles complejos de especies.

Palabras Clave: Invertebrados marinos, gen mitocondrial *COI*, distancias intra e interespecífica.

ABSTRACT

In this research work, the molecular identification of 11 species of marine invertebrates of commercial interest of El Ferrol Bay, Chimbote-Peru, was achieved through the DNA Barcode technique. For this, 110 specimens were collected and the following methodology was applied: DNA extraction by the phenol chloroform method, evaluation of DNA quality by 1% agarose gel electrophoresis, quantification of DNA by spectrophotometry, amplification of the IOC mitochondrial gene by the conventional polymerase chain reaction (PCR) method and sequencing of the amplicons.

Of the total specimens collected, only 53 consensus sequences were obtained, which are grouped into 11 species. Subsequently, using the blast tool, the search for identical sequences was carried out in the National Center for Biotechnological Information (NCBI) and the Data System of the Barcode of Life (BOLDSystems), identifying similar haplotypes for 10 species, and for In the specific case of the *F. maxima* species, no report was found. Furthermore, it has been demonstrated that the sequences of the *T. chocolata* specimens initially separated in group F1 and F2 due to their phenotypic differences have formed monophyletic clade with an average distance of 1.35%.

Subsequently, a statistical analysis was performed on the consensus sequences with the genetic algorithm Kimura 2 parameters (K2P), obtaining intraspecific distances less than 3%, this value was criteria in this work to delimit species. The intraspecific and interspecific distances of K2P were grouped by the Neighbor - Joining (NJ) algorithm obtaining defined clades for 11 species, which were strongly supported with the phylogenetic trees of Bayesian Inference (IB) and Maximun Likelihood (ML), to which through statistical supports they established 11 Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) for the 4 models (GMYC, bPTP, ABGD and BINs). In addition, a gap threshold of 8.2 x was obtained for the group of invertebrates of commercial interest in the El Ferrol bay.

In general, the DNA barcode is an effective tool in the identification of marine invertebrates for El Ferrol Bay and a fast way to identify possible species complexes

Keywords: Marine invertebrates, COI mitochondrial gene, intra and interspecific distances.

1. INTRODUCCIÓN

El Perú es uno de los países con alta diversidad genética, reconocido como uno de los diecisiete países llamados megadiversos, por poseer en conjunto más del 70 % de la biodiversidad del planeta, representada por una gran variedad de ecosistemas, especies de flora y fauna, que han contribuido y contribuyen al desarrollo y la sostenibilidad mundial (MINAM, 2014). Estas características en el caso de nuestro país, se debe a una geografía muy contrastante caracterizada por una combinación de grandes altitudes, de ambiente de bosques húmedos, desiertos y ambientes costeros marinos, el que comprende un complejo sistema de corrientes que da origen a un rico sistema de afloramiento (MINAM, 2010).

El sistema del afloramiento o surgencia de la Corriente Peruana o de Humboldt, condiciona los ambientes marino-costeros de la costa peruana, considerados de los más ricos en el mundo por su alta productividad y variedad de especies (MINAM, 2010; ONU y COP20, 2014; Brack y Mendiola, 2000). Islas y Puntas Guaneras, son un tipo de ecosistemas marino-costeros, y están ubicadas dentro de las 12 millas del litoral hacia el centro y norte del país, constituidas por un total de 77 islas que están incorporadas al Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado (SINANPE), a fin de asegurar su continuidad y gestionar su manejo sostenible (MINAM, 2010).

Los ecosistemas marino-costeros constituyen bancos naturales de diversidad biológica marina donde se alberga numerosas poblaciones de aves y mamíferos y, en muchos casos, son sitios claves de reproducción y cría de peces e invertebrados en la costa peruana (MINAM, 2010). Esta excepcional diversidad biológica ha sustentado a una de las industrias pesqueras más grandes del mundo que constituye el segundo sector productivo más importante del Perú (MINAM, 2010), convirtiéndose en la fuente principal de alimento y abastecedor de empleos para la sociedad (PNUMA, 1999; FAO, 1996). En el 2007, el sector pesquero representó el 8% de las exportaciones totales de Perú, con un valor aproximado de US\$ 2 billones constituyendo con el 0.72% del PBI (COMUMA, 2013).

Diversos estudios muestran que la industria pesquera, la sobre explotación, el cambio climático producto de la contaminación, los eventos de El Niño, y los impactos inducidos por otras actividades humanas (exploración sísmica, explotación petrolera, turismo, transporte) son actividades que constituyen una fuente de amenaza a la biodiversidad (MINAM, 2014), habiendo llevado incluso a la desaparición de muchas especies (Cerdenares *et al.*, 2014), agravando esta problemática, los escasos estudios científicos relacionados a ecosistemas marinos (González, 2012).

La industria pesquera se ha convertido en una amenaza debido a su mala gestión al incumplir los ordenamientos pesqueros que establecen temporadas de pesca, cuotas, tallas mínimas de captura y tolerancia máxima de ejemplares juveniles, artes de pesca, el arrojado de sus desperdicios (plásticos, redes, combustible, aceites, detergentes) y otras medidas en favor de la sostenibilidad (COMUMA, 2013; MINAM, 2014).

En la región Ancash, los ecosistemas marino-costeros vienen peligrando desde los años 70 particularmente la bahía El Ferrol, que comprende la Isla Blanca y una serie de islotes (Isla Ferrol Norte, Ferrol Centro y Ferrol Sur) (Tresierra *et al.*, 2007). Dicho ecosistema fue considerado la “Perla del Pacífico” en los años 60 por su gran belleza escénica y su gran biodiversidad de organismos hidrobiológicos (IMARPE, 2009).

En la actualidad la bahía El Ferrol está catalogada como una de la más contaminadas del Perú, encontrándose en el Plan de Recuperación Ambiental mediante RESOLUCION SUPREMA N°004-2012-MINAM (MINAM, 2012), debido según IMARPE (2009) al mal manejo del ecosistema por actividades industriales, arrojado de desperdicios por parte de los pescadores artesanales y vertimientos de aguas residuales domésticas sin ningún previo tratamiento; lo que han afectado a la bahía en su sedimento y la calidad del agua. Además, presenta condiciones de anoxia, elevada demanda bioquímica de oxígeno y coliformes termo tolerantes que superan lo permitido por la Ley General de Aguas, metales pesados como plomo y cinc, por encima de los estándares internacionales (Tresierra *et al.*, 2007; Jacinto *et al.*, 1997), provocando que las especies que habitan dicho ecosistema disminuyan su capacidad para proporcionar servicios sustentables (MINAM, 2010; Ramírez *et al.*, 2003).

De la fauna existente, los organismos bentónicos viven en contacto con los fondos marinos, por lo que es previsible que la contaminación tenga mayor repercusión sobre ellos (Freire y Labarta, 2003). El bentos puede ser infaunal o epifaunal (Muniz *et al.*, 2013), pueden verse alterados, disminuyendo y modificando su riqueza específica e incluso desaparecer por completo (Leticia, 2011).

En el caso de las especies de invertebrados marinos para la bahía El Ferrol, el grado de conocimiento es mucho menor, debido a que no existe aún un esfuerzo nacional oficial para integrar la información de diversidad de especies en este importante grupo (MINAM, 2010). Los estudios realizados por Tresierra *et al.* (2007) en la bahía El Ferrol, han demostrado que el lado oriental de la Isla Blanca, está fuertemente impactada debido a que por su ubicación sirve como barrera para el avance de los efluentes de la industria pesquera que, por el flujo de corrientes de la bahía, precipitan en el flanco Este de la isla; ocasionando la fragmentación del hábitat y de manera particular, imposibilitando el desarrollo de invertebrados de interés comercial.

Sin embargo, IMARPE (2009) argumenta que algunas zonas del margen sur de la bahía, presentan áreas libres de contaminación, que permiten el asentamiento y desarrollo de invertebrados comerciales tales como: *Thaisella chocolata*, caracol; *Argopecten purpuratus*, concha de abanico; *Cancer porteri*, cangrejo jaiva; *Octopus mimus*, pulpo; *Cancer setosus*, cangrejo peludo; *Logilo gahi*, calamar, *Concholepas concholepas*, chanque; *Semele solida*, almeja; *Sinum simba*; babosa; *Platyxanthus orbigny*, cangrejo violáceo; *Patallus mollis*, ancoco; *Acanthopleura echinata*, chiton; *Fissurella crassa*, lapa, *Fissurella maxima*, lapa, *Bursa ventricosa*, caracol rosado, *Tagelus dombeii*, lapicero.

Según los reportes hechos por IMARPE (2014) e IMARPE (2015), el puerto de Chimbote representó en el 2014 el 8.54% de la pesca de captura de invertebrados marinos en todo el Perú, y el 11.28% para el 2015, contribuyendo al sustento económico de la población peruana. Para el 2016, IMARPE (2016) reporta que la extracción de los invertebrados marinos fue de 21 983 kg para *O. mimus*; 9 118 kg para *A. purpuratus*; 6 598 kg para *T. dombeii*; 977 kg para *C. setosus*; 1 454 kg para *S. solida*; 1 159 kg para *Fisurella sp*; 107 kg

para *C. porteri*; 11 936 para *B. ventricosa*; 28 504 kg para *T. chocolata* y 12 kg para *A. echinata*.

Estos organismos marinos desempeñan un papel muy importante en la ecología marina como animales filtradores de grandes volúmenes de agua y consumidores de grandes cantidades de detritus orgánico (Hopkins, 2009), a la vez han sido estudiados por muchos años como indicadores del grado de contaminación de los ecosistemas. En sus estudios, Rodríguez *et al.* (1992) y Berrú *et al.* (2007) mencionan que el asentamiento de invertebrados marinos bentónicos es un proceso de gran importancia que tiene repercusiones a nivel ecológico, fisiológico y biotecnológico, y solo una buena calidad del sustrato y de parámetros oceanográficos, permite el asentamiento y desarrollo de invertebrados.

Los invertebrados marinos en el mundo son de gran importancia y han sido resaltados por De Zoysa (2012), Gopal *et al.* (2008) y Benkendorff (2010) determinándose las bondades medicinales del consumo de los distintos filos (crustáceos, moluscos, gasterópodos y equinodermos) para el tratamiento de distintas enfermedades como la tuberculosis, síndrome de malabsorción, hepatomegalia, tos, asma, enfermedades urinarias, ser fuentes de sales de calcio, tener propiedad hematínico, combatir la hiperacidez, entre otros.

Por tanto, dada la problemática que rodea la bahía El Ferrol por su contaminación y con ella la pérdida de su biodiversidad desde los años sesenta, urge de estudios que permitan clasificar a un ritmo acelerado y eficaz la diversidad de sus especies, con el fin de evitar pérdidas de variabilidad genética (Loayza, 1998). Por lo cual, la aplicación de técnicas moleculares es considerada como una gran oportunidad única para incrementar el conocimiento de la diversidad biológica en el Perú, acompañadas de investigaciones bioacústica, el uso de posicionamiento global (GPS) y sistemas de información geográfica (von May *et al.*, 2012).

La técnica molecular que viene utilizándose a nivel mundial es *DNA barcoding*, una técnica no destructiva (Páiz, 2009), que está basada en la idea, de que todas las especies de un grupo de organismos comparten una misma región genética, y que esta región presenta variaciones entre distintas especies (González, 2012; Serrato *et al.*, 2013), siendo su principal propiedad, la de asociar fácilmente todas las etapas del ciclo de vida y sexos, en particular cuando la

morfología, el comportamiento y el hábitat son consistentemente diferentes (Casiraghi *et al.*, 2010).

La región estándar que viene siendo utilizada como *Barcode* para casi todos los grupos de animales, es un fragmento del gen *citocromo oxidasa* subunidad I (*COI*), con aproximadamente 648 pares de bases (Páiz, 2008; Folmer *et al.*, 1994; Hebert *et al.*, 1994 ; Hebert *et al.*, 2003a), que se logra amplificar a través de un par de secuencias universales de *primers* (LCO 1490 Y HCO 2198) (Hebert *et al.*, 2003a). Esta técnica viene siendo utilizada para una amplia gama de metazoos y su eficacia ha sido comprobado en distintos laboratorios del mundo para: *Crassostrea*, *Ostrea*, *Mercenaria*, hidrozoos marinos y lapas (Folmer *et al.*, 1994).

La descripción e identificación de especies son fundamentales para la biología, ya que, sin la taxonomía, los biólogos en varias disciplinas serían incapaces de relatar sus conclusiones empíricas o tener acceso a la información disponible sobre sus organismos objetivo, porque no estarían seguros de sus identidades (Ciprandi y Marinoni, 2010). La formalización de un inventario de la diversidad biológica de invertebrados en los ecosistemas marinos, es una encomiable iniciativa, por un lado, porque la riqueza de especies es la principal variable descriptiva de la biodiversidad de un país y por otro, porque los crecientes impactos a los ambientes marinos se están acelerando y la pérdida de comunidades con ellos (Castillo, 2014). Para ello, es necesario acelerar el inventario de la biodiversidad y comprender mejor su funcionamiento, para proponer planes de manejo acertados para su conservación (González, 2012).

Ante esta problemática, el Perú, en el 2014, a través de alianzas entre Instituciones Peruanas y el Instituto de Biodiversidad de Ontario de la Universidad de Guelph, formalizó el empleo de la técnica *DNA barcode* para el Perú (PeBol), con el objetivo de elaborar una Estrategia Nacional de Código de Barras de ADN para nuestro país y empezar a construir una biblioteca digital de referencia, de los códigos de barras de ADN para la fauna y la flora peruana, que permita su conservación y aprovechamiento sostenible (PeBol, 2014). Por lo mencionado, se ha planteado el siguiente problema de investigación ¿Cuál será la identidad molecular de los invertebrados marinos de interés comercial de la bahía El Ferrol?

2. MARCO TEÓRICO

2.1. INVERTEBRADOS MARINOS DE INTERÉS COMERCIAL

La extracción de invertebrados marinos en su mayoría, es el principal sustento económico para la pesquería artesanal (IMARPE, 2009). Esta actividad extractiva se desarrolla a lo largo de la costa peruana, debido a la diversidad de sus recursos hidrobiológicos (PNUMA, 1999). Están conformados por una variedad de especies bentónicas, las que según IMARPE (2009) son principalmente: *T. chocolata*, caracol; *A. purpuratus*, concha de abanico; *C. porteri*, cangrejo jaiva; *O. mimus*, pulpo; *C. setosus*, cangrejo peludo; *L. gahi*, calamar, *C. concholepas*, chanque; *Semele sp*, almeja; *S. simba*; babosa; *P. orbigny*, cangrejo violáceo; *P. mollis*, ancoco; *A. echinata*, chiton; *Fissurella sp*, lapa.

Los invertebrados marinos en el mundo son de gran importancia debido a sus propiedades nutricionales y medicinales (Crustáceos, moluscos y equinodermos) (De Zoysa, 2012; Gopal *et al.*, 2008; Benkendorff, 2010), además de tener un papel muy importante en la ecología marina (Hopkins, 2009); permitiendo además determinar el grado de contaminación de los ecosistemas, ya que el asentamiento larval y desarrollo solo se realiza en condiciones ambientales óptimas (Berrú *et al.*, 2007).

- **Phyllum Mollusca**

Los moluscos en su mayoría tienen una simetría bilateral, celomados y segmentados (excepto los gasterópodos), cuerpo blando, desnudo o protegido por una concha; pie muscular, branquias o pulmones; y órganos sensoriales, tales como tacto, olfato, gusto, equilibrio y vista en algunos cefalópodos (Castillo, 2014). Forman parte importante de la biodiversidad de nuestro planeta, ya que después de los artrópodos constituyen el grupo animal de mayor diversidad (Osorio, 2002); estimándose 117 358 especies (Zhi-Qiang, 2011).

Este filo incluye invertebrados marinos, dulceacuícolas y terrestres, tan diferentes entre sí como los chitones, caracoles, babosas, almejas, ostras, mejillones, así como nautilus, calamares y pulpos, y son los gasterópodos y los bivalvos que presentan mayor diversidad con 67000 y 15000 especies respectivamente (Paredes *et al.*, 1999).

El estudio de los moluscos marinos es atractivo para paleontólogos, genetistas, biólogos, debido a la vasta complejidad de características que contribuyen al éxito en su colonización, desde la zona intermareal, hasta taludes y profundidades oceánicas, incluyendo las fuentes hidrotermales de más de 5 000 m de profundidad (Castillo, 2014). Estos organismos viven adheridos fijos, cementados o perforando sustratos sólidos o blandos, reptando, saltando sobre arenas y blandos fangos y como epibiontes de algas y animales (Osorio, 2002).

- **Phyllum Arthropoda**

Otro grupo altamente diversos son los artrópodos que incluyen a los crustáceos con aproximadamente 66,914 especies (Zhi-Qiang, 2011). Los crustáceos en su mayoría son marinos y poseen un cuerpo segmentado y provistos de numerosos apéndices articulados, con un exoesqueleto compuesto por quitina y proteínas, generalmente reforzado con sales calcáreas, que lo tornan más grueso y pesado (Vinuesa *et al.*, 2015).

Los crustáceos cambian periódicamente su exoesqueleto en un proceso llamado muda o ecdisis, permitiendo el crecimiento corporal (Vinuesa *et al.*, 2015). Habitan comúnmente en la plataforma continental, pero llegan a localizarse hasta en los fondos marinos, por lo general, se desplazan caminando, aunque en algunas ocasiones en etapas juveniles pueden ser nadadores y en otras se encuentran fijos al fondo (Cifuentes *et al.*, 1997).

En el aspecto biológico, los crustáceos son fundamentales en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos; por su abundancia y diversidad dan estructura a las comunidades de macroinvertebrados que habitan en ellos; por la posición que ocupan en las cadenas tróficas, como consumidores secundarios se encargan de la transformación de la materia orgánica en energía y proteínas consumibles por los eslabones finales (García *et al.*, 2014).

- **Phyllum Echinodermata**

Los equinodermos son invertebrados estrictamente marinos que están representados por las estrellas de mar y sus afines (lirios de mar, estrellas quebradizas u ofiuros, erizos y pepinos de mar) (Villalobos y Mendoza, 2010). Los equinodermos pueden habitar desde las pozas de

marea, hasta profundidades abisales mayores a 11 000 m, con ambientes tropicales, pero incluso pueden vivir en ambientes extremos e incluso hasta los polos (Solís *et al.*, 2014). En zonas profundas llegan a constituir el 90 % de la biomasa presente (Villalobos y Mendoza, 2010).

Se registran aproximadamente 6 500 especies de equinodermos reconocidas en 5 clases: Crinoideos (aproximadamente 700 especies); asteroideos (aproximadamente 1800 especies); los ofiuroideos (aproximadamente 2000 especies); equinoideos (aproximadamente 900 especies); y holoturoideos (aproximadamente 1200 especies) (Villalobos y Mendoza, 2010).

Los equinodermos son dioicos, con una alta frecuencia de especies hermafroditas (Solís *et al.*, 2014). Se han considerado de gran interés debido a su extenso registro fósil, su importancia ecológica y medicinal, su morfología como adultos, sus características biomecánicas inusuales, y sus embriones manipulables experimentalmente (Borrero *et al.*, 2012).

Tabla 1. Extracción anual de invertebrados marinos de interés comercial en la bahía El Ferrol, período 2014, 2015 y 2016.

Pesca de invertebrados marinos - bahía El Ferrol			
Especies	Extracción (Kg) 2014	Extracción (Kg) 2015	Extracción (Kg) 2016
<i>Octopus mimus</i>	458	17 158	21983
<i>Argopecten purpuratus</i>	1288	3667	9118
<i>Tagelus dombeii</i>	3597	11509	6598
<i>Cancer setosus</i>	174	470	977
<i>Cancer porteri</i>	21	15	107
<i>Thaisella chocolata</i>	9036	69594	28504
<i>Bursa ventricosa</i>	81	13428	11936
<i>Semele solida</i>	676	1334	1454
<i>Acanthopleura echinata</i>	0	0	12
<i>Fissurella sp</i>	58	302	1159

Fuente: IMARPE (2016)

2.2. UTILIZACIÓN DE ADN EN LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

Históricamente el hombre ha utilizado animales y plantas como alimento, medicina, herramienta o vestido; básicamente por eso comenzó la necesidad de identificar y distinguir especies, puesto que en algunos casos le suponía su propia supervivencia (Rey, 2012). Tradicionalmente, la identificación taxonómica se ha basado en caracteres morfológicos exclusivos del grupo animal o vegetal, y que ha representado una tarea desafiante, debido a que se requiere de taxonomistas experimentados (Fiser y Buzan, 2013).

Este reto ha sido una tarea extenuante y difícil, ya que se requiere de la identificación, clasificación y ordenamiento de una enorme cantidad de organismos (Paz *et al.*, 2011). Cuando se quiere identificar una población no son útiles los caracteres morfológicos puesto que no todos los especímenes de la especie presentan las mismas similitudes; por lo tanto, esta tarea solo se ha podido solucionar usando el ADN (Rey, 2012). Puesto que los animales se someten a complejos ciclos de vida, que muchos casos consisten en varias etapas morfológicamente distintas; no es raro que estas especies tengan claves morfológicas que describan las distintas etapas adultas con referencia a un solo género (Fiser y Buzan, 2013).

Por tal envergadura, con el desarrollo y el avance de la tecnología se han ido incorporando herramientas moleculares que comparan secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) para explicar las similitudes y diferencias entre las especies (Hajibabaei *et al.*, 2007). Hebert *et al.* (2003) muestra que, en las últimas dos décadas, fragmentos cortos de ADN molecular estandarizado, llamados códigos de barras de ADN, se han desarrollado para discriminación de especies.

Hebert *et al.* (2004) argumenta que las integraciones de códigos de barras de ADN en la taxonomía tradicional, podrían revelar la biodiversidad oculta y de una manera más fiable, que la sola aplicación de métodos tradicionales. Por causa de que el método tradicional consume mucho tiempo, los taxonomistas están decreciendo y el número de especies desconocidas van aumentando (Fiser y Buzan, 2013); por lo que la herramienta molecular se ha convertido en un pilar de la taxonomía moderna.

La utilización del ADN en identificación de especies se desarrolla a partir de muestras biológicas, que en el caso de los organismos animales pueden ser restos de tejidos, pelos, huesos o incluso heces, mientras que en el caso de las plantas pueden ser hojas, frutos, semillas o incluso flores (Biosfera, 2014).

2.3. ADN BARCODING

2.3.1. Marcadores mitocondriales

La molécula de ADNmt animal es circular, de doble cadena, covalentemente cerrada, excepcionalmente compacta con pocas o ninguna región intergénica y carece de intrones. El ADNmt contiene los genes para las subunidades *12S* y *16S* del ARN ribosomal, 22 genes de ARN de transferencia y para 13 genes de las proteínas: citocromo b, las subunidades I, II y III del complejo citocromo oxidasa, las subunidades 6 y 8 del complejo ATPasa y las subunidades 1-6 y 4L del complejo NADH deshidrogenasa de la cadena respiratoria. Además, tiene una región reguladora o de control de sus procesos de replicación y transcripción (Lara, 2008).

El código de barras de ADN más común utilizado en animales es un fragmento del gen mitocondrial *citocromo c oxidasa (COI)*, mientras que, para las plantas dos regiones, la correspondiente a la subunidad S de la región *rubisco (rbcL)* y la correspondiente a la *maturasa K (matK)* son ampliamente utilizados (Fiser y Buzan, 2013). El ADN mitocondrial ha sido utilizado ampliamente como un marcador de especies, dado que cumple una serie de requisitos para identificación. Esta región posee una longitud aceptable, suficiente diferenciación entre especie congénicas o próximas, y acumula puntos de mutación interesantes que originan cambios puntuales capaces de diferenciar géneros o especies (Aranguren *et al.*, 2009)

El gen mitocondrial *COI* es un excelente marcador ya que posee una tasa de evolución entre cinco y 10 veces más rápida que la de genes nucleares de copia

única (Hajibabaei *et al.*, 2007). Al detectar variaciones genéticas, los marcadores genéticos pueden proporcionar información útil en diferentes niveles: estructura de la población, niveles de flujo de genes, relaciones filogenéticas, patrones de biogeografía histórica (Pierre, 2001). Además, permiten identificar especies y cepas, asignar paternidad o parentesco, apoyar la trazabilidad, identificar *loci* asociados a caracteres cuantitativos y realizar selección asistida por marcadores (Astorga, 2008).

Los marcadores moleculares han sido utilizados mayoritariamente en áreas biológicas como: la evolución, sistemática, acuicultura y la ecología, y para el caso específico de organismos marinos fue propuesto como marcador universal (Astorga, 2008)

2.3.2. Barcoding DNA (Código de barra de ADN)

En el 2003, investigadores de la Universidad Guelph en Ontario, Canadá, propusieron el Código de Barras Genético, “*DNA barcode*”, como una técnica para identificar especies usando una secuencia corta de ADN, de una localidad uniforme del genoma (Páiz y Huete, 2008). De acuerdo a lo mencionado, Stoeckle (2003) añade que esta técnica es aplicable por cualquier persona, en cualquier momento, sin la necesidad de ser especialista del grupo en cuestión; además de favorecer el descubrimiento de nuevas especies. Esta metodología se propuso para identificar animales a partir de un fragmento del gen mitocondrial *citocromo c oxidasa* subunidad 1 (*COI*), debido a su alta variación de la secuencia entre especies del mismo género (Hebert *et al.*, 2003a)

El gran interés de científicos en todo el mundo por la técnica *DNA barcode*, llevó a crear en el 2004, el consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL), con una plataforma bioinformática de códigos de barras validados (<http://www.barcodinglife.org>), el cual incluye más de 120 organizaciones de 45 países, y a la vez el desarrollo de alianzas internacionales de investigación

necesarios para construir, en los próximos 20 años, una biblioteca de código de barras para toda la vida eucariota (Ratnasingham y Hebert, 2007). Con respecto a peces, Lanteri (2007) hace referencia que *FISH-BOL* (www.fishbol.org) es otra base de datos cada vez más completa.

El aumento progresivo por descubrir la biodiversidad a nivel molecular aplicando la técnica *DNA barcode*, llevo a que en el 2010 se oficializara una plataforma bioinformática a nivel mundial con el nombre de *Barcode of Life* o iBOL. De los países de América Latina, México, Brasil y Argentina actúan como nodos regionales, y como nodos nacionales están participando Panamá, Costa Rica y Perú (Paz *et al.*, 2011).

El código de barras se ha convertido en una característica universal de etiqueta digital de lectura mecánica, formada por una serie de rayas, que codifica la información de una determinada especie (Blaxter, 2004), y es calificada como una taxonomía moderna que cumple con tres criterios esenciales: a) la molecularización (es decir, el uso de la variabilidad en un marcador molecular como un discriminador), b) la informatización (es decir, la no redundante transposición de los datos mediante el uso de soportes informáticos) y c) la normalización (es decir, la extensión de la aproximación a grandes grupos de organismos que no están profundamente relacionada) del enfoque taxonómico (Casiraghi *et al.*, 2010)

Estos criterios permiten según Stoeckle (2003) utilizar *DNA barcode* en donde el método de una taxonomía tradicional presenta limitación como, por ejemplo, en cualquier estadio de vida (huevos, larvas, juveniles, adultos); en análisis de contenido estomacal o de excretas. Asimismo, la tecnología moderna se encamina hacia la producción de dispositivos que permitirán obtener secuencias de ADN y permitan facilitar la identificación casi automática; contribuyendo a tal punto en que los taxónomos puedan dedicarse a resolver cuestiones científicas que les son

propias como la delimitación y descripción de especies y taxones superiores (Lanteri, 2007).

La información recopilada a partir de códigos de barras de ADN puede usarse más allá de los estudios taxonómicos, como la ecología (evaluación rápida de la biodiversidad y análisis de cadenas alimentarias), biología de la conservación (monitoreo de especies protegidas), bioseguridad (identificación temprana de especie de plaga invasora), medicina (identificación de patógenos médicamente importantes y sus vectores) y farmacología (identificación de compuestos activos) (Fiser y Buzan, 2013).

Por ejemplo, el Código de Barras de ADN fue aplicado por Rehman *et al.* (2015) para detectar el contrabando en la venta de la carne de una tortuga (*Lissemys punctata*) en el mercado chino. Yu *et al.* (2016) lo utilizó para detectar el adulteramiento de la planta medicinal *Piper kadsura*. En la actualidad *DNA barcode* viene utilizándose en diferentes laboratorios como herramienta para el estudio de trazabilidad de alimentos (Barcaccia *et al.*, 2015), ayuda a revelar divergencia genética muy alta dentro de una misma especie, sugiriendo la existencia de especies crípticas en diferentes grupos taxonómicos (von May *et al.*, 2012); es decir, una o más especies genéticamente diferentes y previamente conocida como una sola especie (Paz *et al.*, 2011; González, 2012; von May *et al.*, 2012). La presencia de especies crípticas es relativamente común en los ecosistemas marinos (Trivedi *et al.*, 2016).

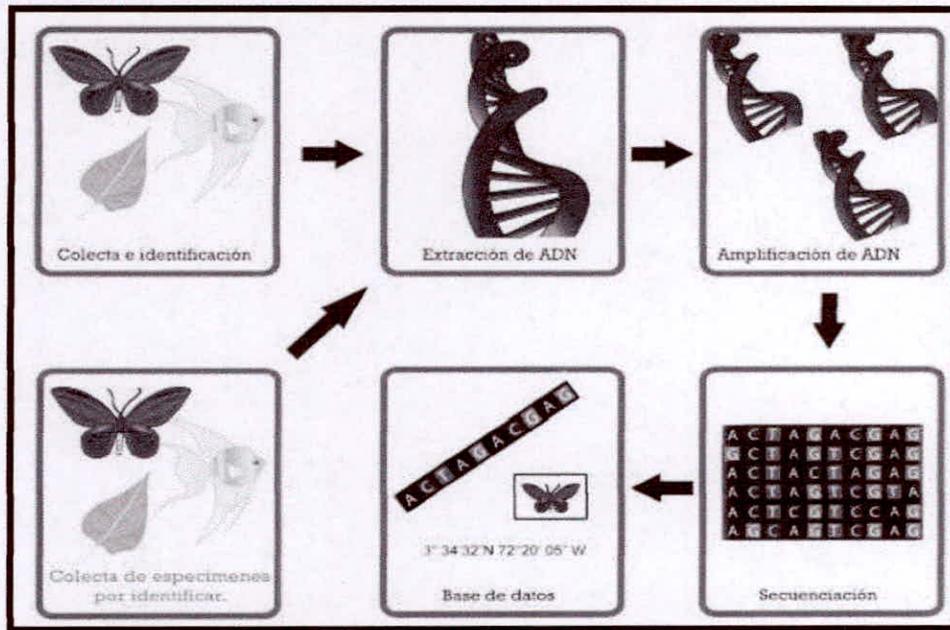


Figura 1. Procedimientos en laboratorio para obtener el código de barra de ADN, en especímenes recolectadas del campo.

Fuente: Paz *et al.* (2011)

2.3.3. La secuencia del gen *Citocromo Oxidasa I* (COI) como código de barras

Para que una región sea práctica como código de barras de ADN debe cumplir con tres

características específicas (Kress y Erickson, 2008):

- I. Tener una variabilidad y divergencia genética significativas a nivel de especie,
- II. Poseer sitios flanqueantes conservados para desarrollar cebadores universales para una amplia aplicación taxonómica.
- III. Tener una longitud de secuencia relativamente corta para facilitar las capacidades actuales de extracción y amplificación de ADN.

La fracción del gen mitocondrial *citocromo oxidasa I* (COI) de aproximadamente 650 pb, fue el primero empleado como código de barras, y viene teniendo gran aceptación en la comunidad científica (Hebert *et al.*, 2003a; Kress y Erickson,

2008). Las pruebas hechas hasta el momento en diferentes grupos demuestran que el fragmento de *COI*, puede ser útil y suficiente para proveer un código de cuatro letras con innumerables combinaciones para lograr la identificación de aproximadamente el 99% de las especies (Lara, 2008).

2.4. DISTANCIA GENÉTICA INTRAESPECÍFICA E INTERESPECÍFICA APLICADAS A ADN BARCODING

Para que una región del genoma pueda ser utilizada como código de barras de ADN es necesario que esta permita distinguir entre variación interespecífica (*i.e.*, entre especies cercanamente relacionadas) y variación intraespecífica (*i.e.*, dentro de la misma especie) (Paz *et al.*, 2011). De lo anterior, se genera el concepto de *-barcoding gap-*, que es la diferencia que existe entre la variación interespecífica e intraespecífica (Vera *et al.*, 2012), encontrándose que cuanto mayor sea la diferencia entre estas, la discriminación específica será más acertada (Meyer y Paulay, 2005).

En lo que respecta a la relación entre niveles de divergencia genética y su significación taxonómica, los defensores del «DNA barcode» han propuesto valores estimativos del 1-2% de divergencia en el ADNmt para la variación intraespecífica y valores mayores para separar especies, mientras que Hebert *et al.* (2004) y Lanteri (2007) refieren una variación intraespecífica del 3%. Asimismo, según las distancias que aplica el modelo de Kimura dos parámetros (K2P), los promedios de divergencia para géneros serían del 9.93%, para familias del 15.46%, para órdenes del 22.18% y para clases del 23.27%. Estos porcentajes, calculados sobre la base de *COI*, no pueden generalizarse a todos los grupos taxonómicos pues no cabría esperar que fueran constantes (Lanteri, 2007).

Diversos trabajos han encontrado valores umbrales de las distancias genéticas en diferentes taxa, para sugerir que la secuencia nueva proviene de una especie distinta (Hebert *et al.*, 2004). Por ejemplo, según el autor antes mencionado refiere que para el caso de aves y lepidópteros se ha propuesto una divergencia de su secuencia *COI* mayor a 2% como indicador de especie distinta. En cuanto para anfibios se encontró una divergencia intraespecífica del 7% al 14% tanto a nivel intra como interpoblacional, debidas

probablemente a una marcada estructuración filogeográfica de las especies, con haplotipos característicos de las distintas subpoblaciones (Vences *et al.*, 2005). Para moluscos y crustáceos, Davison *et al.* (2009) encontraron una divergencia intraespecífica promedio de 2,6% (0,0 – 8,1%) y la interespecífica de 10% (2,4 – 17,6%). Estos mismos autores también propusieron que el límite de divergencia entre las especies de moluscos sería de 4%. En cuanto a crustáceos, Costa *et al.* (2007) ha encontrado una máxima variación intraespecífica en la especie *Gammarus oceanicus* de 3.1% en sus secuencias nucleotídicas, y valores interespecíficos de 19.2% y 48.3%, en tanto que para especies congénéricas fue de 17.16%.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Establecer molecularmente la identidad de los invertebrados marinos de interés comercial de la bahía El Ferrol, mediante la técnica Código de Barras de ADN.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar, estandarizar y optimizar la PCR con los *primers* universales LCO 1490 Y HCO 2198 para el gen *COI* de los invertebrados con valor económico de la bahía El Ferrol.
- Identificar las 11 especies de invertebrados comerciales de la bahía El Ferrol, con las secuencias de nucleótidos obtenidas del gen *COI*, en la base de datos internacional *Barcode of Life Data Systems (BOLD)* (<http://www.barcodinglife.org/>) y en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- Obtener el porcentaje de las bases nitrogenadas de las secuencias consenso según su complementariedad AT (Adenina y Timina) y GC (Guanina y Citosina), para los invertebrados marinos de interés comercial de la bahía El Ferrol, agrupadas según su clase.
- Determinar el umbral del *barcoding gap* entre las 11 especies de invertebrados de interés comercial de la bahía El Ferrol, a partir de las distancias genéticas interespecífica e intraespecífica obtenidas del gen *COI*.

- Construir un árbol filogenético consenso entre Inferencia Bayesiana y *Maximum Likelihood* de los invertebrados comerciales de la bahía El Ferrol, utilizando el gen *COI* para determinar su relación filogenética.
- Establecer las unidades taxonómicas operacionales molecular (MOTUs) para el gen *COI*, con los modelos de delimitación (GMYC, bPTP, ABGD y BINs), para los invertebrados de interés comercial de la bahía El Ferrol.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio fue la bahía El Ferrol, ubicada en la costa norte del Perú, provincia del Santa, departamento de Ancash. Los especímenes fueron capturados alrededores de las islas Blanca, Ferrol Norte, Ferrol Centro, Ferrol Sur y la playa Agua Fría. Se asignaron siete puntos de muestreo que se visualizan en la Figura 2 (E-1, E-2, E-3, E-4, E-5, E-6 y E-7).

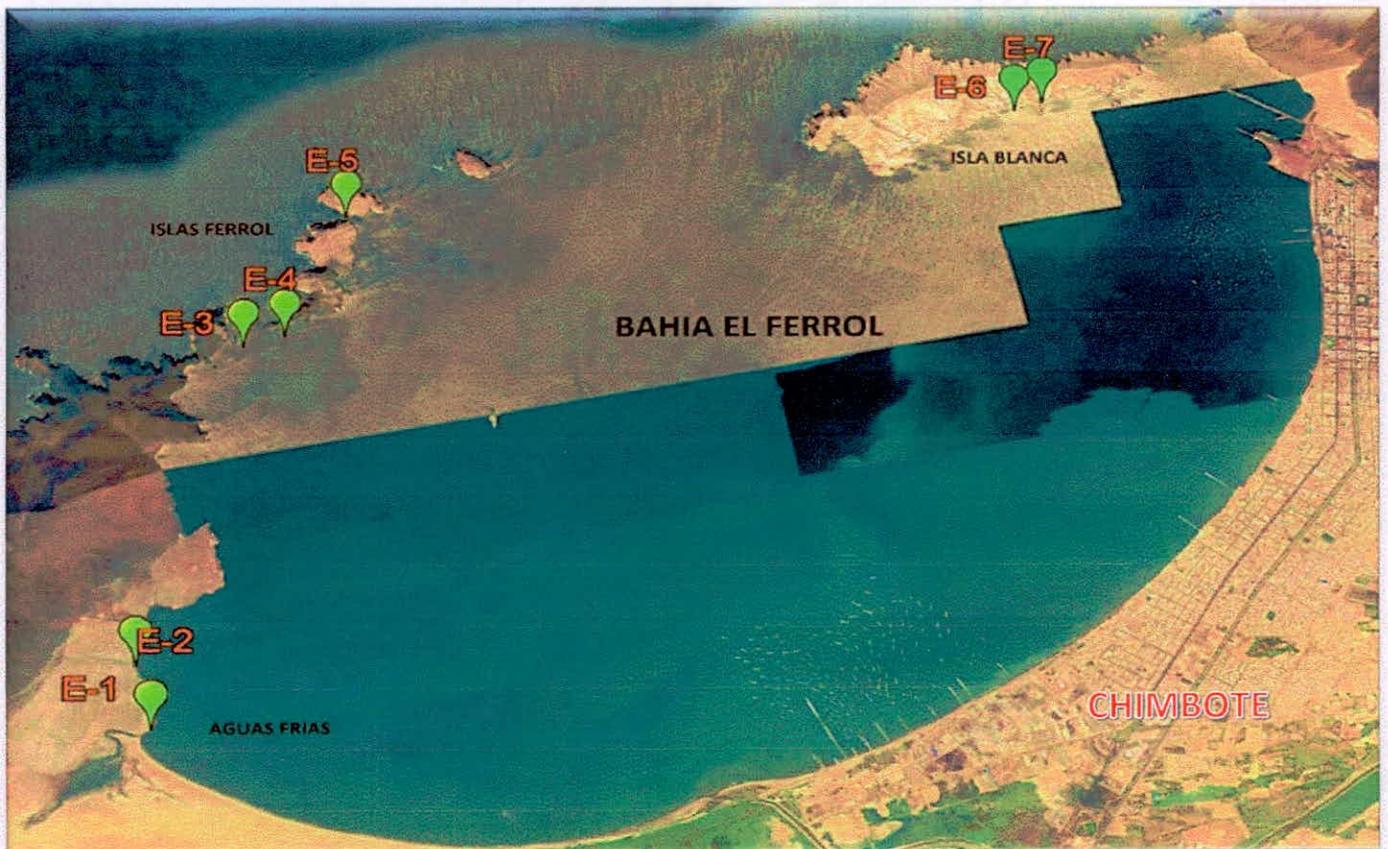


Figura 2. Estaciones de muestreo (E-1, E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7) para la captura de invertebrados marinos de interés comercial en la bahía El Ferrol, Chimbote – Perú. Estas estaciones fueron tomadas según los reportes de biodiversidad de invertebrados marinos descritas en el trabajo por Berrú *et al.* (2007).

4.2. MUESTRA BIOLÓGICA Y COLECTA DE LA MUESTRA

De acuerdo a la información generada por Berrú *et al.* (2007) e IMARPE (2009) acerca de la biodiversidad de invertebrados con interés comercial para esta zona de muestreo, se determinó la recolección de un mínimo de 10 especímenes para cada una de las siguientes

especies: *O. mimus*, pulpo; *T. chocolata*, caracol negro; *C. setosus*, cangrejo peludo; *B. ventricosa*, caracol rosado; *A. purpuratus*, concha de abanico; *A. echinata*, barquillo; *E. analoga*, muy muy; *F. maxima*, lapa; *T. dombeii*, lapicero; *S. solida*, almeja; *C. porteri*, cangrejo jaiva. Esta área de estudio, se integra al levantamiento de especies por el Círculo de Investigación denominado "Catalogando la Biodiversidad Marina del Perú, Código de Barras de ADN para el estudio, conservación y uso sostenible de los recursos, constituido por la Universidad Nacional de Santa, IMARPE y Pro Delphinus".

El método de recolección fue por buceo semiautónomo. Por cada punto de muestreo y captura de las especies se anotó su posicionamiento por medio de un GPS. Los organismos colectados fueron puestos en baldes rotulados de 4 litros, llenos de alcohol al 96%. Una vez terminado el muestreo, los baldes con las muestras fueron transportados al laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción de la Universidad Nacional del Santa para la separación y rotulación respectiva. Los organismos rotulados fueron puestos en envases plásticos de 50 y 150 ml de capacidad, con alcohol al 96%, reemplazándose así el alcohol de transporte por uno nuevo para garantizar la integridad del ADN (Stein *et al.*, 2013).

Finalmente, se codificó y registró en una base de datos, en el que se le asignó: nombre científico, lugar, fecha de colecta, estación, número de organismo colectado y un código PeMar asignado por el círculo de investigación. Seguidamente a ello se seleccionó una muestra voucher de cada especie para su identificación taxonómica por el Instituto del Mar del Perú (IMARPE). Posteriormente a ello, los organismos fueron sometidos al proceso de extracción de ADN (Tabla 3; ANEXO 1). Para el caso específico de la especie *T. chocolata*, se identificaron 2 fenotipos, y fueron separadas en dos grupos: F1, con 5 especímenes que presentaron tubérculos pronunciados en el hombro de su concha y un grupo F2, con 5 especímenes que no presentan tubérculos en el hombro de su concha, ambos grupos fueron sometidos a los procesos antes mencionados.

4.3. ANÁLISIS GENÉTICOS

4.3.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de las 96 muestras colectadas y conservadas se realizó mediante el método fenol cloroformo (Taggart *et al.*, 1992) a partir del músculo (0,20 mg aproximadamente) previamente preservado en alcohol al 96%.

4.3.2. Cuantificación de ADN

El ADN obtenido fue cuantificado por espectrometría, utilizando un cuantificador marca Epoch, valorándose la calidad del extracto midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda. Después de la cuantificación cada muestra fue alicuotada hasta una concentración final de 50 ng/ul, para posteriormente utilizarla en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Las alícuotas fueron almacenadas a 4°C y las soluciones stock a -20 °C.

4.3.3. Evaluación de la calidad de ADN.

Se evaluó el estado del ADN por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando una solución amortiguadora TBE 0.5X (Tris-HCL, Ácido Bórico, EDTA). La electroforesis se realizó en una cámara electroforética horizontal marca Cleaver por 45 minutos a 80 voltios y fueron visualizados en un fotodocumentador marca MyECL Imager (Thermo Scientific). Las calidades de las muestras solo fueron aceptadas como válidas, cuando no se visualizó presencia de ARN o ADN degradado y se visualizan las bandas definidas de alto peso molecular (Figura 3).

4.3.4. Elección de los marcadores génicos

El marcador mitocondrial seleccionados para este trabajo fue *Citocromo Oxidasa I*, usándose como el cebador el descrito por Folmer *et al.* (1994).

Tabla 2. Cebadores utilizados para invertebrados marinos de la bahía El Ferrol

Cebadores o primers	Secuencias	Referencia
LCO 1490	5' GGTCACAAATCATAAAGATATTGG 3'	Folmer et al., 1994
HCO 2198	5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'	

4.3.5. Amplificación por PCR del gen *Citocromo Oxidasa I*

La amplificación por PCR para el gen *COI*, se utilizó el siguiente protocolo:

12.16 ul H₂O de PCR, 1.89 ul de *Taq* buffer – KCl MgCl₂ (10x), 1.44 MgCl₂ (2.5 mM), 0.94 ul de dNTPs (2.5 mM), 0.19 ul de cada Primer LCO 1490 (50 uM), 0.19 ul de Primer HCO 2198 (50 uM), 0.19 ul de *Taq* polimerasa y 1 ul de DNA, siguiendo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, 25 / 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 1 min, alineación a 55 / 50 °C por 1 min, y extensión a 72°C por 1 min), y una extensión final a 72° C por 3 min.

Finalmente, los productos de amplificación obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 1% para comprobar la especificidad de los *primers*.

4.3.6. Secuenciación

Limpieza de los productos amplificados

Para la purificación de los productos de PCR, se utilizó el kit exoSAP-IT. A cada muestra de amplificación se agregó 1ul, se programó el termociclador en 37°C por 60 min, seguido por 85°C por 15 min y para finalizar 10°C ∞.

Secuenciación:

Al menos 20 ul de los productos de PCR positivos por muestra (10 muestras por especie), fueron enviados a la compañía MACROGEN USA (www.macrogen.com) para la secuenciación por electroforesis capilar de ambas

hebras, por lo que se obtuvo 2 secuencias por espécimen, una en sentido forward y otra en sentido reverse.

4.4. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

4.4.1. Edición de las secuencias

Las secuencias forward y reverse fueron editadas y ensambladas manualmente utilizando el programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 7) (Kumar *et al.*, 2016). Este software permitió obtener una secuencia consenso o contig por espécimen.

De todas las secuencias generadas, se seleccionaron aquellas secuencias consenso de buena calidad para su análisis posterior y fueron dejadas de lado aquellas secuencias de baja calidad. Se entienden como secuencias de baja calidad aquellas secuencias con picos dobles, ruidos de fondo, pseudogenes y cuya longitud de secuencia son menores a 200 pb.

4.4.2. BLAST de las secuencias consenso

Las 53 secuencias consenso seleccionadas fueron comparadas con secuencias previamente publicadas en dos bases de datos internacional BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007), y NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Esta búsqueda permitió garantizar resultados verídicos y descartar errores por contaminación con ADN de otra especie. Para el caso específico de la especie *F. maxima* no se encontró secuencia idéntica a ella.

4.4.3. Alineamiento de secuencias consenso

Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias consenso con el algoritmo Clustal W que se encuentra añadido en el programa MEGA7, generando una matriz de secuencias alineadas, con una longitud estándar de 593 pb. Esto se realizó previo al análisis de divergencia genética y filogenético.

4.5. ANÁLISIS DE DIVERGENCIA GENÉTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

El análisis de divergencia para el marcador genético *COI*, se realizó aplicando el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016), con el cual se calculó la distancia interespecífica con el algoritmo *Kimura 2 parameters* (K2P) (Kimura, 1980) que permite corregir los sesgos en la proporción de cambios transversionales y transicionales, los resultados se muestran en la Tabla 6.

Asimismo, con la base de datos BOLD Systems se realizó el análisis de divergencia intraespecífica mínima y máxima; se calculó la distancia del vecino más cercano para cada especie (NN) (Tabla 5), dichos resultados generaron el *barcoding gap* (Figura 6). Los errores estándares de las distancias calculadas fueron estimados mediante bootstrap de 1 000 réplicas.

Además, se construyó un dendograma de similitud de las distancias genéticas de los haplotipos para el gen *COI* con el algoritmo *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou y Nei, 1987), utilizando las distancias K2P (Kimura, 1980) (Figura 5), con el objetivo de proveer una representación gráfica de la divergencia entre las especies. Aunque el número de caracteres taxonómicos es limitado para establecer relaciones entre grupos de divergencia evolutiva lejana, se estimó la robustez de los nodos a nivel interespecífico mediante una prueba no paramétrica de *bootstrap* con 1 000 réplicas.

NJ es útil en estudios de código de barras molecular ya que los individuos pertenecientes a una misma especie formarán grupos aislados debido a su alto nivel de semejanza (o semejanza de sus secuencias *COI*). Sin embargo, el método NJ no toma en cuenta la relación ancestro –descendientes, por lo cual no es considerado un árbol filogenético (Peña, 2011).

El objetivo fundamental de este método es poder identificar individuos cuando se desconoce la especie a la que pertenecen (Peña, 2014). Además, existe la posibilidad de descubrir especies crípticas en grupos de morfología compleja o inaccesible (Hebert *et al.*, 2004).

4.6. OUTGROUP - *Nereis vexillosa*

Para realizar la filogenia se eligió al género *Nereis* como extragrupo, porque pertenece a un phylum externo (Annelida), el cual tiene una relación entre los phylum Mollusca y Arthropoda, datos convincentes para obtener un árbol filogenético por *Maximum likelihood* y de Inferencia Bayesiana. Esta relación es destacada por Kim *et al.* (1996) que menciona que los anélidos, moluscos y artrópodos se destacan tanto por la segmentación larval trocófora como mesodérmica, siendo el plan corporal segmentado en Arthropoda - Annelida, característica que los vincula como los parientes más cercanos; y que Annelida - Mollusca tienen etapas larvianas de trocófos en al menos algunos de sus representantes marinos.

El grupo " Arthropoda-Mollusca " es algo consistente con la evidencia de otros caracteres, como la distribución de los pigmentos respiratorios hemocianina (Ghiselin 1989). Un estudio molecular que usó datos parciales de la secuencia de *18S rDNA*, sugirió que Mollusca y Arthropoda son taxones hermanos (Holland *et al.*, 1991).

Las secuencias del gen *COI* de grupo externo fueron extraídas de la base de datos de BOLD con código "BAMPOL0205", luego de hacer una búsqueda exhaustiva teniendo en cuenta que el tamaño de la misma no debía ser menor que el obtenido en este estudio y que su amplificación por PCR haya sido con los *primers* universales de Folmer *et al.* (1994).

4.7. RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA

La finalidad de los análisis filogenéticos es estimar una filogenia (árbol filogenético) que muestre la historia evolutiva del grupo taxonómico de estudio. Es decir, que sea reflejo del proceso de evolución donde las entidades biológicas son el resultado de "descendencia con modificación" entre especies ancestrales y descendientes (Peña, 2011).

Los análisis filogenéticos se realizaron en base a dos metodologías diferentes: el método de *Maximum Likelihood* (ML) y el método de Inferencia Bayesiana (BI). Ambos métodos estadísticos están basados en modelos de evolución molecular, frecuentemente usando secuencias de nucleótidos de ADN (Peña, 2011).

En comparación de ambos métodos, el análisis bayesiano es mucho más rápido porque utiliza “atajos” para los cálculos, al emplear el algoritmo conocido como Markov Chain Monte Carlo (MCMC), el cual permite realizar búsquedas a través de un número menor de árboles según sus valores de probabilidades posteriores (Jiménez, 2009), lo que permite que la BI demande menos poder computacional y sea más rápida que ML (Peña, 2011).

4.7.1. Método de Maximum Likelihood (ML)

El análisis de *Maximum likelihood* (ML) está implementado en el programa RAxML v. 8 (Stamatakis, 2014), el cual fue configurado utilizando el modelo GTR+GAMMA y la robustez de los nodos se evaluó usando bootstrapping no paramétrico con 1000 réplicas de bootstrap.

4.7.2. Método Inferencia Bayesiana (BI)

- **Árbol ultramétrico**

Se generó un árbol ultramétrico utilizando el programa Beast 2.4.3 (Bouckaert *et al.*, 2014), con una configuración de Reloj Relajado Log Normal, un modelo *Birth-death process*, y se eligió un modelo de sustitución GTR+GAMMA utilizando jModeltest 2 (Darriba *et al.*, 2012); además se utilizó 150 millones de generaciones MCMC y un *burn-in* del 25 %. Las demás configuraciones en el BEAUti (Drummond *et al.*, 2012) fue por defecto como el rate AG.s.cytb con el valor Alpha=2 y Beta=0.5 y la distribución en uclDStdev fue el *Exponential* con un promedio de 0.3337.

Se realizó dos corridas con los mismos parámetros anteriormente descritos en el BEAUti, las cuales fueron fusionadas para obtener un consenso con el software Log-Combiner V1.7.1 con un 25% *burn-in*. Ambas corridas fueron evaluadas con el programa Tracer v.1.5 para observar su tamaño de muestra alcanzada (ESS), la que fue superior a 200.

4.8. DELIMITACIÓN DE LA UNIDAD TAXONÓMICA OPERACIONAL MOLECULAR (MOTUs)

Se realizó análisis de delimitación de especies utilizando cuatro métodos: (i) una implementación bayesiana del modelo de proceso de árbol de Poisson (bPTP) de Zhang *et al.* (2013); (ii) GMYC, una implementación bayesiana del modelo General Mixto Yule Coalescent (GMYC) de Pons *et al.* (2006); (iii) el sistema de números de índice de barras (BINs) (Ratnasingham y Hebert, 2013) y (iiii) el descubrimiento automático de brechas de códigos de barras (ABGD) (Puillandre *et al.*, 2012). GMYC y PTP utilizan un árbol de entrada filogenético a partir del cual se modela el ajuste de procesos de especiación (Larson *et al.*, 2016).

- **El modelo GMYC**

Se implementó utilizando el árbol ultramétrico calibrado en el tiempo basado en el gen *COI* producido anteriormente con BEAST (Larson *et al.*, 2016), con un reloj relajado lognormal, y un modelo de sustitución GTR, elegido a través del programa jModeltest 2 (Darriba *et al.*, 2012), utilizando 150 millones de generaciones MCMC y un burn-in del 25%. Este modelo se ejecutó con un umbral único, implementado en los paquetes *splits* en el software estadístico R 3.3.3 (R Core Team, 2017), para inferir MOTUs (unidades taxonómicas operacionales moleculares) (Ramirez *et al.*, 2017).

Este modelo se utiliza para comprobar si los datos apoyan un escenario de soporte en un determinado grupo de muestras como perteneciente a una sola especie o no (Wei *et al.*, 2006). GMYC identifica los puntos de transición entre las tasas de ramificación inter e intra especie en un árbol ultramétrico calibrado en el tiempo, maximizando el puntaje de probabilidad del modelo (Zhang *et al.*, 2013).

- **El modelo bPTP**

El PTP (Zhang *et al.*, 2013) se usó para la delimitación de MOTUs a través del servidor bPTP (<http://species.h-its.org>), usando valores predeterminados. El modelo PTP incluye una implementación bayesiana del servidor bPTP y el PTP de máxima verosimilitud original (Larson *et al.*, 2016; Ramirez *et al.*, 2017).

Para la entrada de PTP, se generó un árbol no ultramétrico usando el programa MsBayes con un reloj estricto, un modelo de sustitución GTR, utilizando 150 millones de generaciones de MCMC y un *burn-in* del 25%. El modelo de PTP está destinado a delimitar especies en filogenias moleculares de *locus* único, y proporciona un enfoque objetivo para delimitar los límites de especies putativos que son consistentes con los criterios de especies filogenéticas (Zhang *et al.*, 2013).

- **El modelo BINs**

Este modelo es un algoritmo de agrupamiento en línea, el cual agrupa las secuencias de códigos de barras, generando una página web para cada grupo. Este sistema se puede utilizar para verificar las identificaciones de especies con su soporte taxonómico (Ratnasingham y Hebert, 2013). El resultado de este trabajo se determinó automáticamente en el BOLD Workbench que forma parte de la interfaz web (<http://www.boldsystems.org/>).

- **El modelo ABGD**

Es un procedimiento automático que clasifica las secuencias en especies hipotéticas basadas en la brecha del código de barras, que se puede observar cada vez que la divergencia entre organismos pertenecientes a la misma especie es menor que la divergencia entre organismos de diferentes especies (Puillandre *et al.*, 2012).

El ABGD se realizó utilizando la distancia de Kimura-2-parameter (K2P) con una configuración por defecto a través de la interfaz web (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>), excepto de la configuración del Pmax que se indicó a 0.01 y ancho de espacio relativo de 1.3, con el modelo Kimura (K80) TS / TV 2.0.

5. RESULTADOS

5.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Se recolectaron 11 especies de invertebrados (Tabla 3), 10 organismos por cada especie, haciendo un total de 110 ejemplares, de los cuales solo se obtuvieron 53 secuencias consenso, las 67 secuencias restantes fueron descartadas por su baja calidad. La cantidad de secuencia consenso por especie han sido de : *O. cf hubbsorum* (n=5); *T. chocolata* (n=10); *C. setosus* (n=5); *B. ventricosa* (n=5); *A. purpuratus* (n=5); *A. echinata* (n=2); *E. analoga* (n=2); *F. maxima* (n=5); *T. dombeii* (n=5); *S. solida* (n=5); *C. porteri* (n=4) (Figura 5), con una longitud de 593 pb. En el caso específico de *T. chocolata* separadas en grupo F1 y F2, la primera fue recolectada en la Estación 4 (E-4), lugar expuesto a oleaje y con una amplia variedad de depredadores entre ellos *C. porteri*, *C. setosus* y *Hepatus chilensis*, mientras que para F2 los organismos fueron capturados en la Estación 6 (E-6), lugar protegido de oleaje por la Isla Blanca y no se visualizó presencia de depredadores durante el muestreo (Tabla 3 y Figura 2) (Tresierra *et al.*, 2007); ambos grupos a través del análisis de delimitación de especies (ABGD, BINs, bPTP y GMYC) han mantenido un clado monofilético para la especie *T. chocolata* (Figura 6 y ANEXO I).

La herramienta BLAST confirmó la amplificación del *gen* mitocondrial *COI* en todos los especímenes, y descartó errores por contaminación, además que coincidió la identificación taxonómica tradicional con la identificación molecular por medio de la técnica Código de Barras de ADN del fragmento *COI* (ANEXO II). El alineamiento múltiple realizado a las 53 secuencias consenso resultó con 593 sitios, presentando 206 sitios conservados, 387 sitios variables y 386 sitios informativos.

Tabla 3. Especies de Invertebrados marinos de interés comercial recolectados en la bahía El Ferrol, identificados por taxonomía tradicional y metodología molecular.

Estación de muestreo	Género	Especie	Lugar de extracción	Coordenadas	
				Latitud	Longitud
E - 1	<i>Fisurella</i>	<i>F. maxima</i>	BF-AF	9°10'13.22"S	78°34'25.36"O
E - 2	<i>Emerita</i>	<i>E. analoga</i>	BF-AF	9°10'15.00"S	78°34'45.96"O
E - 3	<i>Bursa</i>	<i>B. ventricosa</i>	BF-IFS	9° 9'34.85"S	78°36'24.17"O
E - 3	<i>Cancer</i>	<i>C. porteri</i>	BF-IFS	9° 9'34.85"S	78°36'24.17"O
E - 3	<i>Argopecten</i>	<i>A. purpuratus</i>	BF-IFS	9° 9'34.85"S	78°36'24.17"O
E - 4	<i>Semele</i>	<i>S. solida</i>	BF-IFS	9° 9'23.30"S	78°36'25.40"O
E - 4	<i>Cancer</i>	<i>C. setosus</i>	BF-IFS	9° 9'23.30"S	78°36'25.40"O
E - 4	<i>Thaisella</i>	<i>T. chocolata</i> (F1) (sin tubérculos)	BF-IFS	9° 9'34.85"S	78°36'24.17"O
E - 5	<i>Acanthopleura</i>	<i>A. echinata</i>	BF-IFC	9° 9'1.05"S	78°37'4.21"O
E - 5	<i>Octopus</i>	<i>O. cf hubbsorum</i>	BF-IFC	9° 9'1.05"S	78°37'4.21"O
E - 6	<i>Thaisella</i>	<i>T. chocolata</i> (F2) (con tubérculos)	BF-IFS	9° 5'47.51"S	78°37'4.32"O
E - 7	<i>Tagellus</i>	<i>T. dombeii</i>	BF-IB	9° 5'39.05"S	78°37'5.67"O

Abreviaturas: **BF - IFS** "Bahía El Ferrol - Isla Ferrol Sur", **BF - IFC** "Bahía El Ferrol - Isla Ferrol Centro", **BF -AF** "Bahía El Ferrol - Playa Agua Fría" y **BF - IS** "Bahía El Ferrol - Isla Blanca".

5.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS SECUENCIAS CONSENSO

El porcentaje de la composición nucleotídica del fragmento *COI* para las 53 secuencias consenso según clase, está representada en la Tabla 4, mostrando mayor porcentaje en el agrupamiento Adenina-Timina (AT) con respecto al de Guanina-Citocina (GC). La composición promedio más alta AT es de 66.9%, que pertenece a la clase cefalópoda y GC de 41.8 % para la poliplacófora. Por otro lado, la composición promedio más baja AT es de 58.2% para la poliplacófora y GC de 39.3% para la malacostraca. Esta complementariedad mayor de AT con respecto al de GC forma parte de un patrón en la mayoría de secuencias de genomas mitocondriales (Arquez *et al.*, 2012).

Saber el porcentaje GC es de suma importancia, a partir de ello se tiene en cuenta para la creación de *primers* específicos para obtener PCR exitosos; elegir la temperatura adecuada para su desnaturalización del ADN; ayuda a clasificar microorganismos en taxonomía y además sirve para saber la complejidad del genoma de un organismo (Arquez *et al.*, 2012)

Tabla 4. Porcentaje de las bases nitrogenadas, encontradas en las secuencias consenso del fragmento amplificado del *gen* mitocondrial *COI* (593 pb), para los 53 especímenes agrupadas por clase.

Filo	Clase	Especie	Base nitrogenada	Porcentaje de bases nitrogenadas		
				Min %	Promedio %	Max %
MOLUSCA	Gasterópodos	- <i>T. chocolata</i> - <i>B. ventricosa</i>	GC	34.5	40.3	46.6
		- <i>F. maxima</i>	AT	55.4	61.6	65.5
	Poliplacóforos	- <i>A. echinata</i>	GC	39.3	41.8	43.1
			AT	57.5	58.2	58.9
Bivalvos	- <i>A. purpuratus</i> - <i>S. solida</i>	GC	37.1	39.9	42.1	
	- <i>T. dombeii</i>	AT	57.1	59.7	60.8	
Cefalópodos	- <i>O. cf hubbsorum</i>	GC	33.2	33.6	34	
		AT	66.6	66.9	67.1	
ARTHROPODA	Crustáceos	- <i>C. porteri</i> - <i>C. setosus</i> -	GC	37.9	39.3	42.5
		<i>E. analoga</i>	AT	58.2	60.6	61.9

5.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES SOBRE LA BASE DE ESTIMADOS DE DIVERGENCIA GENÉTICA.

El árbol consenso de la Figura 5; construido tanto por el método *Neighbord - Joining* (NJ), máximo Likelihood (ML) y Bayesiano (IB), demuestran que todos los especímenes se agrupan según definición *a priori* con su género y especie, respectivamente. Asimismo, las comparaciones entre las secuencias de ADN, utilizando el modelo Kimura 2 parametros (K2P) y tomando el criterio de un 3% de divergencia evolutiva para distinguir las especies hermanas entre sí (Hebert *et al.*, 2003a). La distancia intraespecífica mínima y máxima y la distancia del vecino más cercano (NN) se detallan según Tabla 5 y la distancia interespecífica según Tabla 6. Estos valores se especifican a continuación para las 11 especies en estudio.

5.3.1. Divergencia por especie

- *T. chocolata*

Ambos grupos de *T. chocolata* (F1 y F2) forman parte de un mismo linaje, con una variación del 1 % (Tabla 6), por debajo del 3%, que es indicador de especie distinta. Estos resultados han obtenido a la vez un fuerte soporte estadístico agrupando a

todos los especímenes dentro de un mismo clado (Figura 5). La agrupación de los ejemplares ha obtenido una distancia máxima intraespecífica del 2.24%, siendo el vecino más cercano *B. ventricosa* con un 20.34%. La distancia interespecífica más lejana es *A. purpuratus* con un 67% en su distancia genética.

- *B. ventricosa*

Los ejemplares de *B. ventricosa* han obtenido una variación máxima intraespecífica del 1.54% y con el vecino más cercano *T. chocolata* una variación del 20.34%. La distancia interespecífica más lejana es *A. purpuratus* con una variación del 66% en su secuencia nucleotídica.

- *F. maxima*

Las comparaciones entre sus secuencias para esta especie, presentan una distancia mínima del 0.17 % y una máxima de 0.34%, y con respecto al vecino más cercano *B. ventricosa* ha sido del 26.95%. La distancia interespecífica más lejana es *A. purpuratus* con una variación del 64% en su secuencia nucleotídica.

- *A. echinata*

La comparación de sus secuencias intraespecíficamente ha sido del 0% como se muestra en la Tabla 5, este dato estadístico es debido a que solo se ha hecho comparaciones entre dos muestras como se visualiza en la Figura 5, y con su vecino más cercano *B. ventricosa* ha sido del 27.91%. La distancia interespecífica más lejana es *A. purpuratus* con una variación del 66% en su secuencia nucleotídica.

- *T. dombeii*

La comparación entre sus cinco especímenes ha obtenido una variación intraespecífica mínima de 0.07% y una máxima de 0.17%, y la distancia con su vecino más cercano *S. solida* ha sido de 25.05%. La distancia interespecífica más lejana es *A. purpuratus* con una variación del 72% en su secuencia nucleotídica.

- *A. pupuratus*

La variación intraespecífica mínima obtenida es de 0.37% y una variación máxima de 1.54%. La variación con el vecino más cercano *F. maxima* ha sido de un 64 % y

su distancia interespecífica más lejana es *E. analoga* con una variación del 74% en su secuencia nucleotídica.

- *S. solida*

Se ha obtenido un valor intraespecífico mínimo de 0.07% y una máxima del 0.17%. La variación con su vecino más cercano *T. dombeii* ha sido del 25.05% y su distancia interespecífica más lejana es *A. purpuratus* con una variación del 69% en su secuencia nucleotídica.

- *O cf hubbsorum*

Esta especie ha registrado valor intraespecífico mínimo del 0 %, a la vez que muestra una variación del 26.56% con la especie vecina *B. ventricosa*. La distancia interespecífica más lejana es *A. purpuratus* con una variación del 65% en su secuencia nucleotídica.

- *E. analoga*

Se ha obtenido una variación intraespecífica de 0.17%, esta estadística fue solo de dos especímenes. La variación con su vecino más cercano *C. porteri* ha sido del 30.05% y la distancia interespecífica más lejana es *A. purpuratus* con una variación del 74% en su secuencia nucleotídica

- *C. porteri*

La variación intraespecífica mínima para esta especie es de 0.08 y la máxima de 0.17 %. La variación con su vecino más cercano *C. setosus* ha sido de 18.29% y la distancia interespecífica más lejana es *A. purpuratus* con una variación del 71% en su secuencia nucleotídica.

- *C. setosus*

Se ha obtenido una variación intraespecífica mínima de 0.27% y una máxima de 0.68%, a la vez se ha obtenido una variación con la especie vecina más cercana *C. porteri* de 18.29% y la distancia interespecífica más lejana es *A. purpuratus* con una variación del 69% en su secuencia nucleotídica.

Tabla 5. Comparación de la distancia genética media y máxima intraespecífica con respecto a la distancia interespecífica del vecino más cercano.

CODIGO BOLD POR ESPECIE	Especies	Distancia Med Intra %	Distancia Máx Intra %	"NN"	Especie cercana	Distancia Interespecífica entre NN y la especie cercana %
PMNV058-18	<i>S. solida</i>	0.07	0.17	PMNV058-18	<i>T. dombeii</i>	25.05
PMNV031-18	<i>T. dombeii</i>	0.07	0.17	PMNV031-18	<i>S. solida</i>	25.05
PMNV028-18	<i>A. echinata</i>	0	0	PMNV028-18	<i>B. ventricosa</i>	27.91
PMNV064-18	<i>C. porteri</i>	0.08	0.17	PMNV064-18	<i>C. setosus</i>	18.29
PMNV077-18	<i>C. setosus</i>	0.27	0.68	PMNV077-18	<i>C. porteri</i>	18.29
PMNV074-18	<i>E. analoga</i>	0.17	0.17	PMNV074-18	<i>C. porteri</i>	30.05
PMNV003-18	<i>F. maxima</i>	0.17	0.34	PMNV003-18	<i>B. ventricosa</i>	26.95
PMNV037-18	<i>B. ventricosa</i>	1.06	1.54	PMNV037-18	<i>T. chocolata</i>	20.34
PMNV008-18	<i>T. chocolata</i>	1.35	2.24	PMNV008-18	<i>B. ventricosa</i>	20.34
PMNV003-18	<i>O. cf hubbsorum</i>	0	0	PMNV003-18	<i>B. ventricosa</i>	26.56
PMNV051-18	<i>A. purpuratus</i>	0.37	0.51	PMNV051-18	<i>F. maxima</i>	64

Abreviatura: NN "vecino más cercano", Med intra "Media intraespecífica", Max intra "Máxima intraespecífica".

Tabla 6. Distancias genéticas interespecíficas entre especies de invertebrados marinos de la bahía El Ferrol, estimadas por K2P (Kimura, 1980). Debajo de la diagonal, en negrita, se muestran los valores de distancias y encima, los errores estándares de las mismas.

Especies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>A. echinata</i>		0.05	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03
2 <i>A. purpuratus</i>	0.66		0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
3 <i>B. ventricosa</i>	0.28	0.66		0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.04	0.04	0.02	0.02
4 <i>C. porteri</i>	0.34	0.71	0.37		0.02	0.03	0.03	0.03	0.05	0.04	0.03	0.03
5 <i>C. setosus</i>	0.36	0.69	0.33	0.20		0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03
6 <i>E. analoga</i>	0.41	0.74	0.39	0.32	0.31		0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03
7 <i>F. maxima</i>	0.32	0.64	0.27	0.40	0.38	0.40		0.03	0.04	0.04	0.03	0.03
8 <i>O. cf hubbsorum</i>	0.35	0.65	0.28	0.37	0.36	0.38	0.35		0.04	0.04	0.03	0.03
9 <i>S. solida</i>	0.56	0.69	0.51	0.60	0.59	0.58	0.50	0.56		0.02	0.04	0.04
10 <i>T. dombeii</i>	0.58	0.72	0.48	0.55	0.56	0.51	0.50	0.55	0.25		0.04	0.04
11 <i>T. chocolata (F1)</i>	0.30	0.67	0.21	0.38	0.38	0.38	0.30	0.33	0.56	0.49		0.00
12 <i>T. chocolata (F2)</i>	0.30	0.68	0.21	0.38	0.37	0.38	0.30	0.33	0.55	0.49	0.01	

De las 11 especies en estudio de la bahía El Ferrol, la especie *T. chocolata* y *B. ventricosa*, fueron las más variables intraespecíficamente, con valores que oscilan entre 1.35% a 2.24% y 1.06% a 1.54%, respectivamente (Tabla 5). Los especímenes del grupo *T. chocolata* han mostrado el máximo valor de distancia intraespecífica con un valor de 2.24%, y el mínimo valor intraespecífico se reportó para la especie *S. solida* y *T. dombeii* con un valor de 0.07% (Tabla 5). Para la comparación se tuvo en cuenta la cantidad mínima de 4 especímenes por especie (Figura 5).

Por otro lado, la distancia del vecino más cercano ha sido de 18.29% entre *C. porteri* y *C. setosus*, en tanto para el vecino más lejano fue de 64% entre *A. purpuratus* - *F. maxima* (Tabla 5). La mínima distancia interespecífica K2P del vecino más cercano de 18.29% comparada con el máximo valor coespecífico de 2.24%, han generado un umbral *barcoding gap* de 8.2 x (Tabla 5 y Figura 3). El *barcoding gap* es la brecha que existe entre la distancia mínima del vecino más cercano con respecto al valor máximo intraespecífico, y que sirve para comparar valores de divergencias cercanas o distantes para delimitar especies (Layton *et al.*, 2014).

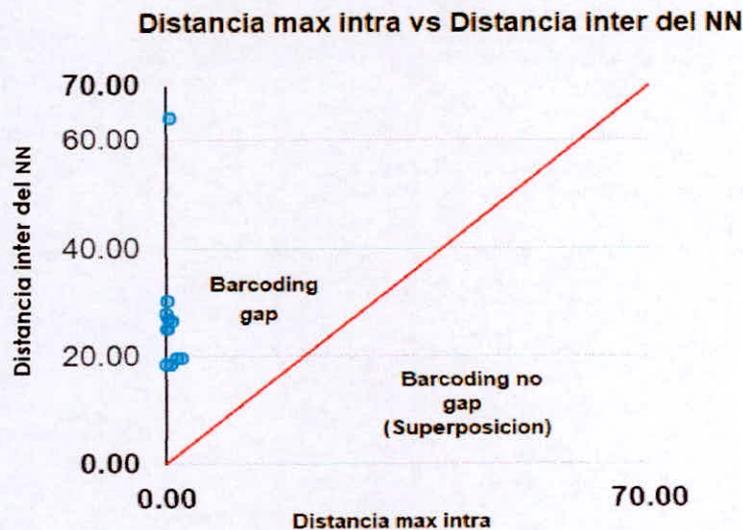


Figura 3. *Barcoding gap*, generado de la comparación entre la distancia máxima intraespecífica vs la distancia interespecífica del vecino más cercano.

La gráfica es el resultado de los datos generados en la Tabla 5, comparando la distancia máxima intraespecífica vs la distancia interespecífica del NN. El umbral del *barcoding gap* es de 8.2 x del mínimo valor interespecífico del NN de 18.29%, con respecto al máximo intraespecífico de 2.24%. La línea entre los ejes X y Y representa la igualdad entre la distancia intraespecífica y la interespecífica, y se espera que las secuencias nucleotídicas tengan características *barcoding gap*, cuando se ubiquen por encima de la línea (Vera *et al.*, 2012).

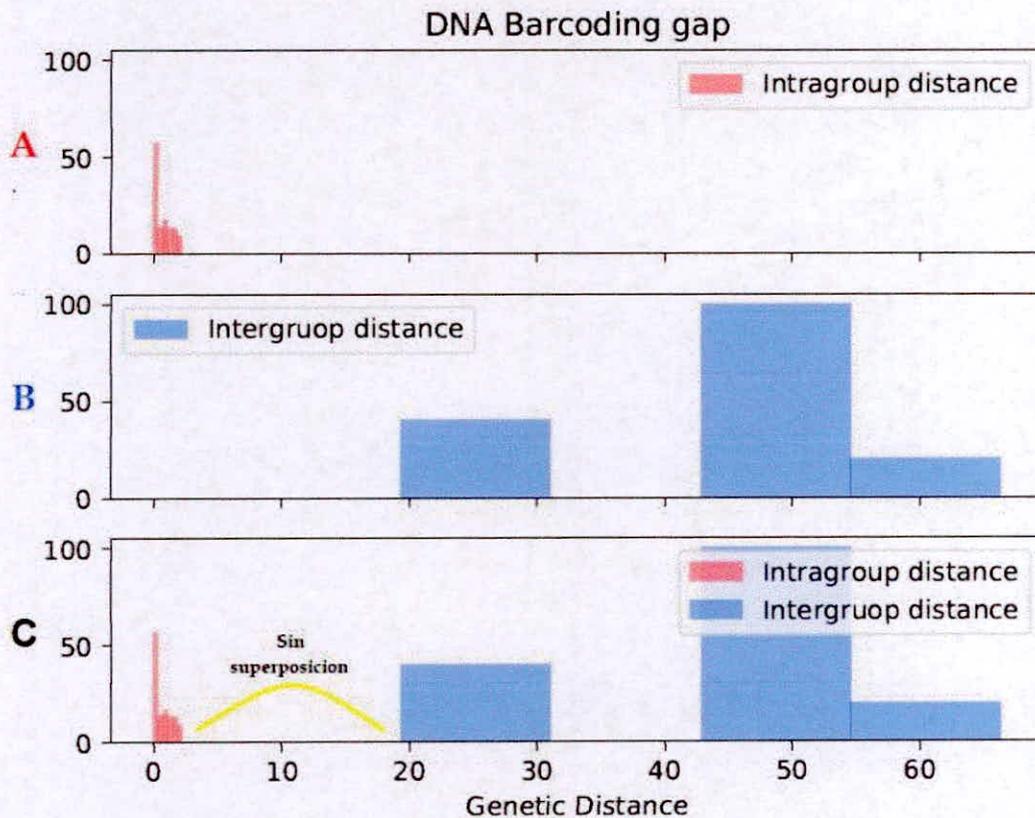


Figura 4. Esquema de la brecha del *Barcoding gap* sin superposición entre la distancia genética K2P intraespecífica e interespecífica.

La distribución de la variación intraespecífica se muestra en rojo (A), y la divergencia interespecífica en azul (B). Mundo ideal para códigos de barras, con distribuciones discretas y sin superposición (C). La figura se realizó tomando los datos de la tabla 5.

5.4. DELIMITACIÓN DE ESPECIES EN BASE A ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

El análisis filogenético de *máximum likelihood* (ML) y el árbol Bayesiano (IB) tuvieron congruencia entre ambos (Figura 5). Los linajes *a priori* fueron soportados en un 100 % en cada bootstrap, identificando la existencia de 11 especies fuertemente agrupadas, a la vez que los 10 organismos de la especie *Thaisella chocolata* (F1 y F2) fue resuelto, determinándose como linaje monofilético a pesar de mostrar una variabilidad intraespecífica alta (2.24%) como refiere la Tabla 5.

- **Delimitación de MOTUs**

El análisis GMYC indicó la existencia de 11 MOTUs (*C. porteri*, *C. setosus*, *E. analoga*, *A. echinata*, *A. purpuratus*, *S. solida*, *T. dombeii*, *F. maxima*, *B. ventricosa*, *T. chocolata* (F1 Y F2) y *O. cf hubbsorum*). El modelo fue seleccionado como preferido sobre el modelo nulo (Likelihood ratio 42.01798, $P < 0.001$), indicando que los resultados GMYC fueron confiables. El análisis PTP (Maximum likelihood e implementación bayesiana) arrojó los mismos 11 MOTUs obtenidos con GMYC. El análisis ABGD encontró 2 particiones de 11 ($P = 1.00e-03$), 12 ($P = 7.74e-03$), incluyendo una partición con los mismos 11 MOTUs ($P = 1.00e-03$) obtenidos en los análisis GMYC y PTP. Sin embargo, el sistema BOLD determinó 11 BINs que muestran concordancias encontrados en los tres análisis antes mencionados GMYC, PTP y ABGD. La agrupación de los MOTUs obtenidos por estos análisis se muestran en la Figura 6.

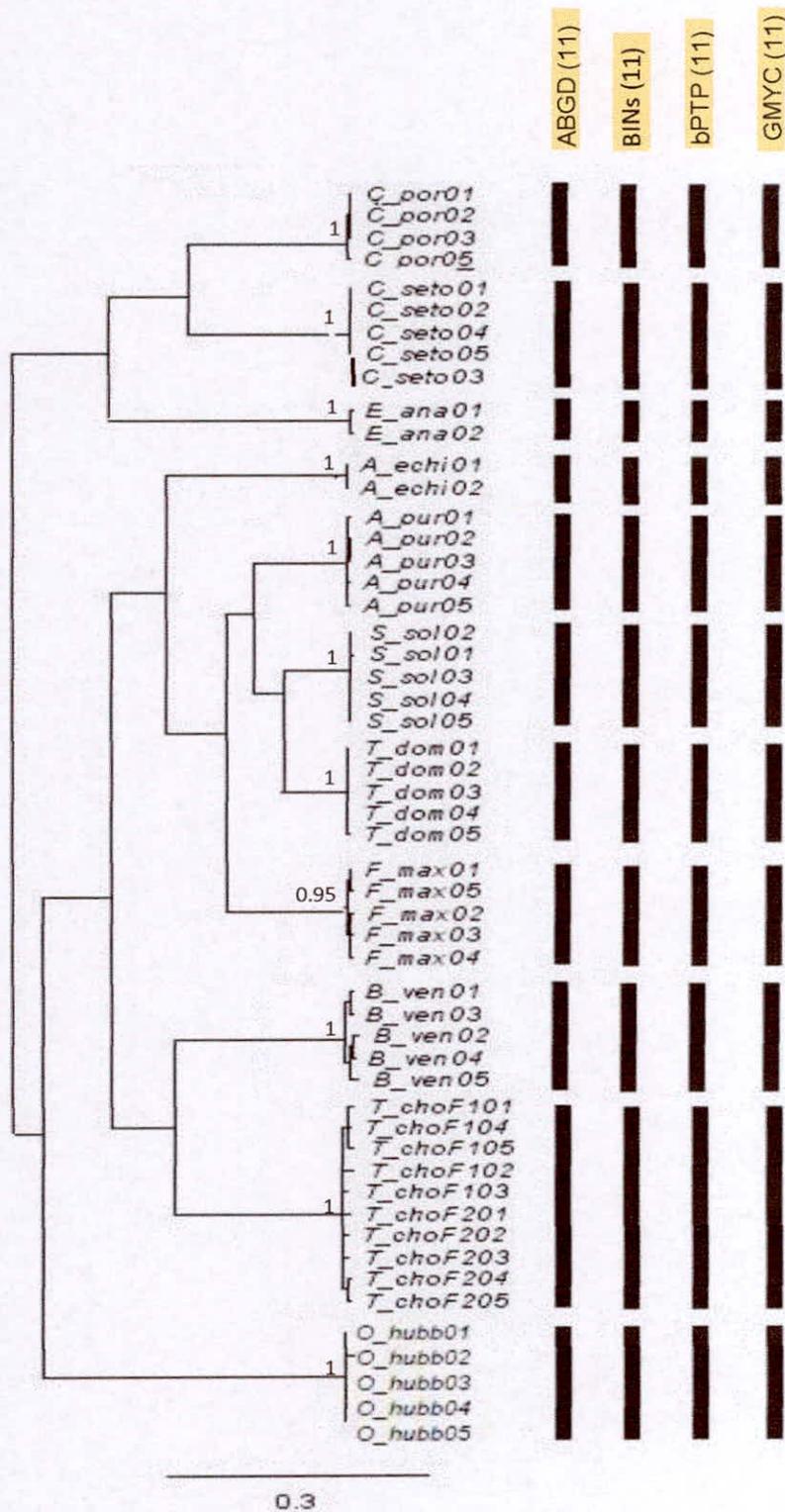


Figura 6 . Árbol bayesiano que muestra el agrupamiento de 11 MOTUs, obtenidos a partir de 4 modelos de análisis de delimitación de especies (ABGD, BINs, bPTP, GMYC).

6. DISCUSIÓN

La aplicación de la técnica códigos de barras de ADN en este trabajo, ha identificado 11 MOTUs fuertemente soportados por clados, dentro de los 53 especímenes trabajados por los análisis de delimitación de especies: ABGD, BINs, bPTP y GMYC (Figura 5). Este agrupamiento es corroborado por medio de su divergencia intraespecífica e interespecífica como se muestra en la Tabla 5 y 6.

Los criterios para delimitar especies en este trabajo fueron tomados de Hebert *et al.* (2003), Lanteri (2007) y Davison *et al.* (2009) que consideran valores mayores a un 3% de divergencia intraespecífica para delimitar especies y cuyos valores reportados en este trabajo están por debajo de dicho valor (Tabla 5), obteniéndose clados bien definidos según su especie, a través de los análisis filogenético ML y BI (Figura 5 y 6). Asimismo, del análisis K2P se ha generado un *barcoding gap* de 8.2 x (Tabla 5 y Figura 3), mayor a los rangos de 3.3 y 6.8 x planteados para gasterópodos y crustáceos marinos respectivamente por Meyer y Paulay (2005), y cerca del rango 10 x considerado como el óptimo (Hebert *et al.*, 2004). Otro punto aceptable para los códigos de barras de ADN, es que los fragmentos de ADN cuenten con un tamaño de entre 400 - 800 pb para caracterizar eficazmente las especies (Kress y Erickson, 2008), lo cual comprueba la eficacia de nuestro trabajo al obtener fragmentos de ADN de 593 pb para los 53 especímenes (ANEXO II).

Por otro lado, obtener proporciones de complementariedad A-T mayores en porcentaje a las de G-C en secuencias nucleotídicas, indican la veracidad del amplificado del gen mitocondrial *COI*. La afirmación antes mencionada lo justifica de Sun *et al.* (2016), que en estudios de ADN *barcode*, sus frecuencias medias de nucleótidos para todas las 569 especies de moluscos descritas por él, han obtenido un agrupamiento promedio de A-T de 62.38% y para G-C de 37.62%. Otro trabajo por Arquez *et al.* (2012) mantiene proporciones similares de A-T 64.42 % y G-C de 36.5% hallados para invertebrados marinos. Porcentajes similares reportan este trabajo con un agrupamiento media de A-T de 66.9% y G-C de 41.8% mostrados en la Tabla 4.

La técnica código de barra de ADN ha sido un método muy efectivo para ampliar el estudio de biodiversidad e identificar con precisión los invertebrados de interés comercial de la bahía El Ferrol. Las 11 especies identificadas son: *T. chocolata*, *T. dombeii*, *S. solida*, *O. cf hubbsorum*, *F. maxima*, *E. analoga*, *C. setosus*, *C. porteri*, *B. ventricosa*, *A. purpuratus*, y *A. echinata*; las que están divididas taxonómicamente en 5 clases: (i) Bivalvos, (ii) Gasterópodos, (iii) Cefalópodos, (iv) Poliplacóforos y (v) Crustáceos (Tabla 4). Los moluscos son uno de los filos más diversos, por lo que se debe de tener mayor precaución en la asignación de valores de divergencia para la discriminación de especies (Romero y Ramírez, 2011).

En la actualidad los moluscos bivalvos cuentan con un enfoque molecular estandarizado y ampliamente utilizado para identificar o discriminar con precisión especies (Hamaguchi *et al.*, 2017), esto se comprobó para las tres especies capturadas en la bahía El Ferrol: *A. purpuratus*, *T. dombeii* y *S. solida*, las mismas que han sido identificadas mediante taxonomía tradicional (ANEXO I). Su identificación a nivel molecular coincidió con los haplotipos reportados en BOLD, para *A. purpuratus* (KF601246) del 99.5%, *T. dombeii* (MH194523) del 99.6 % y *S. solida* (KT161260) del 99.6%. Además se ha obtenido una divergencia intraespecífica promedio de 0.37%, 0.07% y 0.07% respectivamente (Tabla 5) y una divergencia interespecífica con la especie vecina *S. solida* - *T. dombeii* de 25.05% (Tabla 5) y *S. solida* - *A. purpuratus* de 69% (Tabla 6). Estos resultados han sido fuertemente soportados por análisis filogenéticos con los modelos delimitadores de MOTUs (GMYC, bPTP, ABGD y BINs) (Figura 6).

Resultados obtenidos por de Sun *et al.* (2016), comprueban la eficacia de esta técnica molecular para la divergencia genética en moluscos, en donde realizaron una captura de 2801 especímenes en el noroeste del Pacífico y pudieron clasificarlas molecularmente en 569 especies del género *Meretrix*, *Serratina* y *Echinolittorina*, con una variación intraespecífica media de 0.97%, interespecífica 18.67%; entre familias 22.47% y para clases de 30.60%. Hamaguchi *et al.* (2017) lograron una identificación precisa de las especies japonesas mostrando divergencia interespecífica del género *Ostrea* (*O. futamiensis* - *O. fluctigera* 21.8%, *O. setoensis* - *O. stentina* 21.6% y *O. edulis* - *O. Chilensis* 15.4%), taxonómicamente problemáticas, pero eficaces con la técnica *ADN barcode*.

Otro de los moluscos más importante son los gasterópodos, organismos que a lo largo del tiempo se han convertido en una fuente de alimentación y recurso de importancia económica para nuestro país. Meyer y Paulay (2005) manifiestan la eficacia de *DNA barcode* en su investigación hasta de un 99% para identificar distintas especies de esta clase. Los especímenes capturados pertenecen a tres especies *T. chocolata*, *B. ventricosa* y *F. maxima*, las cuales fueron previamente identificadas por taxonomía tradicional como se muestra en el ANEXO I. Estos especímenes han mostrado un rango de similitud en un 100% con los haplotipos reportados en BOLD, tanto para *T. chocolata* (FJ610235) como para *B. ventricosa* (BOLD:Private). Respecto a *F. maxima* no se encuentra información pública en estos momentos, por lo que se considera como primer reporte a nivel molecular para esta base de dato *barcode of life* (<http://www.barcodinglife.org>).

Los especímenes de *T. chocolata* fueron separados inicialmente en dos grupos, por presentar 2 fisonomías divergentes F1 (sin tubérculos en el hombro y se encuentran en la E- 4), mientras que la F2 (presentan tubérculos en el hombro y se encuentran en la E- 6) (Tabla 3 y ANEXO I). A través de la técnica molecular *DNA barcode* se confirmó para ambos fenotipos un agrupamiento fuertemente soportado por el análisis estadístico delimitador de MOTUs (GMYC, bPTP, ABGD y BINs) que establece la monofilia en este grupo (Figura 6), con una divergencia intraespecífica media de 1.35%; mientras que para *B. ventricosa* y *F. maxima* las distancias fueron de 1.06% y 0.17% respectivamente; las cuales se encuentran en el rango de 0% a 1.5% reportada por de Zou *et al.* (2012) para moluscos de aguas costeras de China. Además, el autor antes mencionado ha encontrado distancias interespecíficas de 6.7% a 25.2% entre las especies: *Thais clavigera*, *Thais luteostoma*, *Rapana venosa*, *Rapana rapiformis*, *Thais mutabilis* y *Thais javanica*; estas distancias guardan relación a lo reportado en este trabajo entre las especies *T. chocolata* - *B. ventricosa* con una distancia de 21% y entre *B. ventricosa* - *F. maxima* de 27% (Tabla 6). Romero y Ramirez (2011), proponen una divergencia intraespecífica hasta del 4% para delimitar especies en los gasterópodos.

La explicación que algunos investigadores dan a la divergencia fenotípica dentro de una misma especie en gasterópodos, es que estos se ven influenciados por el oleaje, depredación, temperatura y el sustrato. Giraldo y Gómez (1999) visualizaron que la lapa *Siphonaria gigas*

de la costa del Pacífico colombiano expuestas a oleaje su concha es gruesa y menos alta a diferencia de ambientes protegidos, que son de menor grosor y más alta. Boulding (1990) visualizo gasterópodos sin tubérculos en zonas expuestas a oleajes, por el contrario, Sotil (2008) encontró que la especie *Stramonita haemastoma* en la costa peruana predominaron tubérculos en sus conchas en ambientes expuestas a oleajes. Esta variabilidad ecofenotípica en gasterópodos pueden ser responsables a confusiones taxonómicas (Espoz *et al.*, 2004). Los estudios por los autores antes mencionados ayudan a comprender la diferencia fenotípica de *T. chocolata* de la bahía El Ferrol, en donde el fenotipo F1 se encuentra impactada por el oleaje y con ello la pérdida de los tubérculos en su concha a diferencia del fenotipo F2, que se encuentran protegidos por la Isla Blanca del oleaje (Figura 2).

Por otra parte, los cambios fenotípicos por depredación han sido estudiados por Trusell (2000), cuyo trabajo en laboratorio demostró que tanto gasterópodos y bivalvos aumentan el espesor de sus conchas en respuesta al depredador (cangrejo) fenómeno denominado plasticidad fenotípica, la que puede estar reflejada con una variación intraespecífica (Salinas, 2010 ; Medina *et al.*, 2015), Blanco y Arroyave (2009) demostraron que la especie *Neritina virginea* disminuye el grosor de su caparazón y tamaño en donde hay depredadores para ahorrar energía durante su migración, Sotil (2008) manifiesta que la especie *S. haemastoma* a lo largo de la costa peruana no presentaron tubérculos en su concha en lugares expuestos a gran variedad de depredadores. Esto justificaría en el presente trabajo de investigación la alta variabilidad intraespecífica y su divergencia en el fenotipo para la especie *T. chocolata*, ya que durante la captura de los especímenes del fenotipo F1 se visualizó gran variedad de depredadores entre ellos *C. setosus*, *C. porteri* y *Hepatus chilensis* y que a decir de los buzos que muestrearon en la Estación 6, y cuyos especímenes presentan el fenotipo F2, no hubo presencia de crustáceos (Tabla 3).

Otra clase capturada de molusco en el presente estudio son los cefalópodos, los que según la FAO, presentan problemas reales en su identificación por la taxonomía tradicional (De Luca *et al.*, 2014). En este contexto, los enfoques genéticos constituyen una herramienta útil para investigar su biodiversidad. Los 5 especímenes de cefalópodos capturados según la taxonomía tradicional (ANEXO I) pertenecen a la especie *O. mimus* Gould, 1852. Esta

especie es uno de los cefalópodos marinos con más extracción en el Perú, registrándose para el año 2016 según IMARPE (2017) una extracción de 21 983 Kg en las costas de Chimbote, específicamente de la bahía El Ferrol (Tabla 1).

La cadena nucleotídica del ADN de 5 especímenes de pulpo capturados de la bahía El Ferrol han obtenido una divergencia intraespecífica del 0% (Tabla 5), las cuales han mostrado un rango de similitud en un 100% con los haplotipos públicos en GenBank para *O. mimus* de Perú (MH194435) y *O. hubbsorum* de México (KY985063). La muestra MH194435 pertenece a una de las cuatro muestras de pulpos reportadas por Marín *et al.* (2018), quienes han realizado un estudio de diversidad genética del sector pesquero peruano utilizando el gen COI, 16S Y 12S. EL autor antes mencionado ha reportado como parte de su análisis filogenético que la muestra MH194435 con identidad *O. mimus* ha formado un clado distinto a las otras tres muestras reportadas como *O. mimus* (MH194493, MH194545 y MH194502), manteniendo incluso una distancia genética interespecífica entre ambos de 0.7% y además que solo fue la única muestra que ha emparejado en un 100% con la especie *O. hubbsorum*. Por lo tanto, puede concluirse que los especímenes de la bahía El Ferrol pertenecen a la especie *O. hubbsorum* (Figura 6 y Tabla 3).

El linaje *O. hubbsorum* de la bahía El Ferrol tiene mayor solides debido a que en un trabajo paralelo en el Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción de la Universidad Nacional del Santa, han logrado identificar taxonómicamente y molecularmente las especies *O. hubbsorum* y *O. mimus* en la playa El Dorado, Chimbote - Perú. Ambas especies han sido analizadas filogenéticamente con los 5 especímenes de pulpo capturados de la bahía el Ferrol, y estas últimas han emparejado con la secuencia de ADN de *O. hubbsorum*, manteniendo una distancia genética del 0.7% con el otro clado formado por la especie *O. mimus* (datos no mostrados), dicho porcentaje de divergencia entre ambas taxas se mantiene en el rango de lo reportado por Marín *et al.* (2018), López *et al.* (2005) y Pliego *et al.* (2014). Por otro lado, dentro del muestreo en la bahía El Ferrol se ha logrado recolectar una sexta muestra de pulpo como se visualiza en el ANEXO 4 con código PMINV054-18, el mismo que ha establecido emparejamiento del 100% con los dos haplotipos públicos en GenBank MH194545 y MH194502 y pertenecen a la especie *O. mimus*, además mediante análisis filogenético donde

se incluyó las muestras de *O. mimus* y *O. hubbsorum* de la playa El Dorado ha formado clado monofilético con *O. mimus* (datos no mostrados). Esto demuestra que dentro de la bahía el Ferrol están coexistiendo dos especies de *octopus* y las cuales estarían sustentando el comercio de cefalópodos en nuestra región.

Un estudio genético realizado por Pliego *et al.* (2014) ha sugerido que ambas especies *O. mimus* y *O. hubbsorum* sean considerados sinónimos debido a su baja divergencia genética entre ambas especies, no superando el umbral medio de 4x aceptado para gasterópodos. Además, que la diferencia taxonómica entre ambas especies solo suele atribuirse a la presencia de ocelo. Guerra *et al.* (1999) y Cardoso *et al.* (2004) han reconocido como una característica fenotípica para la especie *O. mimus* la presencia de un ocelo tenue a cada lado de la cabeza, en el nacimiento de los brazos 2 y 3, a diferencia de lo establecido por Pliego *et al.* (2014) y Domínguez *et al.* (2013) que *O. hubbsorum* no presenta ocelo. La presencia de ocelos en *O. mimus* es un tema controvertido (Pliego *et al.*, 2014), ya que Cardoso *et al.* (2004) ha identificado pulpos con y sin ocelos en el litoral peruano. Lo que haría suponer que las secuencias depositadas en GenBank y BOLDsystems como *O. mimus* y no cuentan con un exhaustivo estudio taxonómico podrían pertenecer a *O. hubbsorum* (Pliego *et al.*, 2014).

Por otro lado, se cree que la distribución de ambos cefalópodos *O. hubbsorum* y *O. mimus* se encuentran restringidas. La primera especie se encontraría en el norte, desde el Golfo de California hasta Oaxaca en México (un ambiente tropical), mientras que *O. mimus* se distribuiría, desde Perú hasta Chile (con aguas templadas) (Pliego *et al.*, 2014). Sin embargo estudios genéticos de cefalópodos a lo largo de la costa ecuatoriana ha demostrado la presencia de *O. mimus* y la de *O. hubbsorum*, existiendo la controversia por definirse a la especie (Pliego *et al.*, 2016), la misma controversia la tiene Quinteiro (2016), ya que tanto al norte y sur de Ecuador no se ha definido a un la aceptación de *O. mimus* u *O. hubbsorum*.

Estudios realizados por López *et al.* (2005) han reportado una distancia intraespecífica entre *O. mimus* y *O. hubbsorum* de 0% - 1.6%. Estos resultados también los detalla Pliego *et al.* (2014) quienes encontraron una distancia interespecífica de *O. hubbsorum* del Golfo de California de 0.0%, 0,8 y 0.9% con la especie *O. mimus* de Chile (Iquique), Chile (Coloso) y

Perú respectivamente, y de 0.2% con *O. sp* de Colombia. Al respecto López *et al.* (2005) y Kaneko *et al.* (2011) refieren que debido al bajo valor genético, ambas especies pertenecen a un único linaje, en comparación con otras especies del género *Octopus*, en la que se halló diferencia interespecífica significativa de 4.6 % - 18.4%, como lo detalla Söller *et al.* (2000) quienes encontraron distancias interespecíficas entre *O. mimus* relacionados a *O. vulgaris*, *O. bimaculatus*, *O. bimaculoides*, *O. dofleini*, *O. rubescens*, *O. californicus* de 8%, 10.1%, 19.4%, 21%, 21% y 21.6% respectivamente.

La similitud morfológica entre ambas especies es alta y sus distancias genéticas son muy cercanas (Dominguez *et al.*, 2013). Sin embargo, en la actualidad *O. hubbsorum* Berry, 1953, es reconocido como un taxón válido (Quinteiro, 2016), por lo que, los especímenes capturados de la bahía El Ferrol han sido incluidos dentro de la unidad taxonómica de *O. hubbsorum* y mantienen una divergencia interespecífica de 0.7% con la de *O. mimus* según lo reportado por Marín *et al.* (2018). Esto demuestra que la identificación taxonómica realizada a las muestras extraídas de la bahía El Ferrol no fue la correcta (ANEXO I), Sin embargo autores como Pliego *et al.* (2014), Quinteiro (2016) y Domínguez *et al.* (2013) sugieren nuevos análisis comparativos en la taxonomía de ambas especies y la aplicación de análisis con otros genes que ayudarían a confirmar nuestros resultados.

Otros de los moluscos muy visibles en la zona litoral rocosa de la bahía El Ferrol son los poliplacóforos, con *A. echinata* como uno de los moluscos poliplacóforos más comunes y conspicuos de la fauna bentónica litoral de las costas del Pacífico sureste (Tobar e Ibáñez, 2013). Los especímenes capturados en la bahía fueron identificados taxonómicamente (ANEXO I) y molecularmente (ANEXO II), y cuyas secuencias de nucleótidos obtenidos se han emparejado en un 100% con los haplotipos reportados para *A. echinata* (MK016461) en la base de datos internacional BOLDSystems. La divergencia interespecífica del 28% con su vecino más cercano *B. ventricosa* reportadas para este trabajo (Tabla 6), refuerzan la taxonomía de esta especie.

DNA barcode es una técnica molecular eficaz para distinguir especies de moluscos poliplacóforos, así lo demuestra el trabajo realizado por García *et al.* (2014) quienes encontraron que la especie *Stenoplax purpurascens* del Caribe y *S. limaciformis* del Pacífico

oriental tropical, a pesar de la similitud fenotípica, cuentan con una divergencia de 11,4%. También se demostró que la especie *Acanthochitona rhodea* del sur del Caribe y *A. ferreirai* de las costas pacíficas de Panamá y Costa Rica, que en un principio han sido tratadas como especie única, pertenecían a un linaje distinto mostrando una divergencia de 10,4 - 10,5%.

La alta biodiversidad de organismos en la bahía El Ferrol, permitió además la captura de crustáceos, grupo conocido por tener un alto nivel de diversidad, y en donde la técnica código de barras de ADN es una herramienta muy útil para su identificación a nivel molecular (Radulovici *et al.*, 2009). Esto ha sido demostrado con los análisis obtenidos para nuestro trabajo, en el cual los crustáceos capturados han obtenido 100% de efectividad en su identificación, las cuales han mostrado un rango de similitud con los haplotipos reportados para *C. porteri* (MH194537) del 100%, *C. setosus* (FJ155371) del 99 % y *E. analoga* (KX077718) del 100%.

El uso de la secuencia del gen mitocondrial *citocromo oxidasa I (COI)*, ha demostrado ser 95% efectivo para discriminar especies dentro del subfilo crustáceo e inclusive, cuando éstas están estrechamente relacionadas o taxonómicamente sean tan idénticas (Costa y Carvalho, 2007). Costa *et al.* (2007) refieren la utilidad de esta técnica molecular para la identificación de especímenes de crustáceos, tanto de aguas marinas como para las de aguas continentales. Además, el autor antes mencionado ha identificado patrones de delimitación para crustáceos marinos, con distancias interespecífica que oscilan entre 19.2 - 48.3%, mucho mayor que la intraespecífica promedio de 0.46%. Estos rangos han sido encontrados en nuestro trabajo con divergencias intraespecíficas para *C. setosus* 0.27%, *C. porteri* 0.08% y *E. analoga* 0.17% respectivamente. En tanto la distancia intragenérica única reportada para este trabajo ha sido de 18.29% entre *C. porteri* - *C. setosus* (Tabla 5), y de 32% entre *C. porteri* - *E. analoga* (Tabla 6).

Otros trabajos reportan resultados similares, como el de Pardo *et al.* (2009) en el cual se recolectó larvas de crustáceos en la playa San Lorenzo-Chile, encontrando 4 especies de cangrejos, cuyas distancias interespecífica han sido *C. setosus* - *C. porteri* (25.09%), *C. porteri* - *C. coronatus* (19.50%), *C. porteri* - *C. edwardsii* (19.86%) y sus distancias

intraespecíficas para *C. edwardsii* de 0.36%, *C. coronatus* de 0.36%, *C. porteri* de 0% y *C. setosus* de 0.54%. Radulovici *et al.* (2009) manifiesta la eficacia de esta técnica molecular en crustáceos eufausiáceos en la cual discriminaron distancias entre especies hermanas de *Thysanopoda*, 7.8% de divergencia entre *T. aequalis* y *T. obtusifrons* y de 11.8% para especies hermanas de *Nematoscelis*, *N. microps* y *N. atlantica*; organismos con similitudes fenotípicas entre ellas y que han llevado a debates en la literatura taxonómica.

7. CONCLUSIONES

1. Se estableció la identidad molecular de 11 especies de invertebrados marinos de interés comercial de la bahía El Ferrol mediante la técnica *DNA barcode* para las especies: *T. chocolata*, *F. maxima*, *A. echinata*, *T. dombeii*, *S. solida*, *A. purpuratus*, *B. ventricosa*, *E. analoga*, *C. porteri*, *C. setosus* y *O. cf hubbsorum*.
2. Se logró la amplificación por PCR para las 11 especies de invertebrados de la bahía El Ferrol mediante los primers universales de folmert *et al.* (1994), siendo para el sentido *forward* LCO1490 y el sentido *reverse* HCO 2198.
3. La especie *F. maxima* es la única que a nivel molecular no presenta registro público en ninguna de las dos bases de datos más importantes en el mundo NCBI y BOLD, obteniéndose un nuevo registro para el proyecto internacional *Barcode of Life* (iBOL).
4. La complementariedad media de sus bases nitrogenadas para todas las secuencias consenso ha sido mayor en A-T con un 66.9% con respecto al G-C de 41.8%, dicha proporción forma parte en las secuencias de genomas mitocondriales.
5. El *barcoding gap* generado para las 11 especies de invertebrados de la bahía El Ferrol es de 8.2 x de diferencia que hay entre la distancia máxima intraespecífica de 2.24% con respecto a la distancia mínima interespecífica de 18.29%.
6. En los análisis filogenéticos, se ha establecido una monofilia para 11 especies con un fuerte soporte estadístico en los cuatro modelos de delimitación de MOTUs (GMYC, bPTP, ABGD y BINs).
7. La técnica molecular Código de Barras de ADN ha resultado eficaz para la identificación de invertebrados marinos comerciales de la bahía El Ferrol, por lo que se le considera una herramienta molecular útil y esencial para realizar estudios de biodiversidad en ecosistemas marinos.

8. RECOMENDACIONES

- Incluir mayor número de especímenes por especie, para obtener el mayor número de secuencias nucleotídicas. Esto ayudaría obtener resultados eficientes al hallar divergencia genética y poder observar posibles complejos de especies crípticas.
- Utilizar la información de divergencia intraespecífica e interespecífica encontrada en este trabajo para los diferentes grupos, como guía base para identificar especies y realizar estudios filogeográficos.
- Realizar un muestreo más exhaustivo para obtener la mayor cantidad de especies y acrecentar el catálogo a nivel molecular de la bahía El Ferrol, ayudando a conservar su biodiversidad.
- Incorporar otros puntos de muestreo y aumentar el número de especímenes para el caso de los pulpos, con la finalidad dar soporte a los resultados encontrados para la bahía El Ferrol en la coexistencia de dos especies *O. mimus* y *O. cf hubbsorum* y establecer su distancia genética interespecífica entre ambas especies.
- Realiza nuevos estudios taxonómicos entre la especie *O. mimus* y *O. cf hubbsorum*.
- Realizar un estudio ecológico en las estaciones muestreadas en este trabajo (E-2 y E-6) para la especie *T. chocolata* con el propósito de generar información acerca de la plasticidad fenotípica de esta especie con respecto al tipo de sustrato, la intensidad del oleaje y a la variabilidad de los depredadores.

9. REFERENCIAS

- Arquez, M., J. Uribe & L. Castro. 2012. Análisis comparativo del genoma mitocondrial en gasterópodos. *Acta biol. Colomb.* 2(17): 395-408.
- Álamo, V & V. Valdivieso. 1997. Lista sistemática de moluscos marinos del Perú. *Boletín del instituto del Mar (Perú- Callao)*. 183pp.
- Arguelles, J & E. Torres. 2016. Protocolo para muestreo Biológico y biométrico de gasterópodos marinos. *Informe -Instituto del Mar del Perú*, 43(4).
- Álamo, V. & V. Valdivieso. 1987. Lista sistemática de moluscos marinos del Perú. *Bol. Inst. Mar. Callao-Perú*. 205 pp.
- Andrade, C., J. González, J. Oliva, V. Barros, A. Olguín, C. León, M. Romero, M. Cortes & C. Cortes. 1997. Estudio del ciclo vital del recurso locote (*Thais chocolata*), en las Regiones I a IV. Informe Final, Proyecto FIP. 90: 94-34.
- Astorga, M. 2008. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. Puerto Montt, Chile. 12: 277-280.
- Avendaño, M., M. Cantillán, A. Olivares & M. Oliva. 1998. Indicadores de agregación reproductiva de *Thais chocolata* (Duclos, 1832) (Gasteropoda, Thaididae) en Caleta Punta Arenas (21°38'S- 70°09'W). *Invest. Mar. Valparaiso*. 26:15-20.
- Aranguren, J., M. Portillo, J. Ruiz & Y. Villasmil. 2009. Identificación de especies en productos de origen animal mediante PCR. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2(19): 159-164.
- Aldea, C & C. Valdovinos. 2005. Moluscos del intermareal rocoso del centro-sur de Chile (36° - 38°s): taxonomía y clave de identificación. *Gayana*. 69(2): 364-396.

- Blaxter, M. 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359 (1444): 669-679.
- Berrú, P., A. Tresierra & V. García. 2007. Población de la “concha de abanico” *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en el Litoral de la Región Áncash, Perú. Primavera 2006. *In Inst Mar Perú.* 34(2): 87-130.
- BOLDSystems. 2004. The Barcode of Life Data Systems. Recuperado el 21 de junio 2016. <http://www.boldsystems.org/>.
- Benkendorff, K. 2010. Molluscan biological and chemical diversity: Secondary metabolites and medicinal resources produced by marine mollusks. *Biol.Rev.* 85: 757-775.
- Brack, A & C. Mendiola. 2000. Enciclopedia virtual. “Ecología del Perú”. Recuperado el 16 de junio 2016. <http://www.peruecologico.com.pe/libro.htm>.
- Barcaccia, G, M. Lucchin & M. Cassandro. 2015. DNA Barcoding as a Molecular Tool to Track Down Mislabeling and Food Piracy. *Diversity.* 8(2): 1-16.
- Blanco, J & A. Arroyave. 2009. Daños por depredación y tamaño de concha del caracol diádromo *Neritina virginea* (Gastropoda: Neritidae) en el Río Mameyes, Puerto Rico. *Rev. Biol. Trop.* 57(4): 1069:1080.
- Boulding, E. 1990. Are the opposing selection pressures on exposed and protected shores sufficient to maintain genetic differentiation between gastropod populations with high intermigration rates?. *Hidrobiologia.* 193: 41-52.
- Biosfera. 2014. Laboratorio de genética de BIOSFERA, identificación de especies: genética molecular y marcadores. Recuperado el 26 de agosto del 2017. www.Biosfera.es.

- Borrero, G., M. Benavides & C. Díaz. 2012. Equinodermos del caribe colombiano II. Echinoidea y Holothuroidea. Serie de Publicaciones Especiales de Invemar N°30. Santa Marta. 250 pp.
- Bouckaert, R., T. Vaughan, J. Barido, S. Duchene, M. Fourment, A. Gavryushkina, J. Heed, G. Jonse, D. Kuhnert, N. De Maio, M. Matschiner, F. Mendes, N. Muller, H. Ogilvie, L. du Plessis, A. Poppinga, A. Rambaut, D. Rasmussen, I. Siveroni, M. Suchard, C. Ksi Wu, D. Xie, C. Zhang, T. Stadler & A. Drummond. 2018. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol.* 15(4): 1-28.
- Broderip W. 1833. Descriptions of new species of shells from the collection formed by Mr. Cuming on the western coast of South America, and among the islands of the southern Pacific Ocean. *Proceedings of the Committee of Science and Correspondence of the Zoological Society of London.* 1832(2): 173-179.
- Bretos M., I. Tesorieri & I. Alvarez. 1983. The biology of *Fissurella maxima* Sowerby (Mollusca: Archaeogastropoda) in Northern Chile. 2. Notes on its reproduction. *Biological Bulletin.* 165: 558-568.
- Castillo, Z. 2014. Biodiversidad de moluscos marinos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 85: 419-430.
- Cardoso, F., P. Villegas & C. Estrella. 2004. Observaciones sobre la biología de *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopoda) en la costa peruana. *Revista Peruana de Biología.* 11: 45-50.
- Ciprandi, A & L. Marinoni. 2010. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotrop.* 10(2): 339-346.

CONAM. 1998. Bahía “El Ferroll” diagnóstico ambiental. Lima-Perú. 71pp.

COMUMA. 2013. COMISIÓN MULTISECTORIAL PARA LA GESTION AMBIENTAL DEL MEDIO COSTERO. Lima-Perú. 35 pp.

Costa, F & G. Carvalho. 2007. The Barcode of Life Initiative: sinopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of fish. *Genomics, Society and Policy*. 3(2): 29-40.

Costa, F., J. deWaard, J. Boutillier, S. Ratnasingham, R. Dooh, M. Hajibabaei & P. Hebert. 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Can. J. Fish. Aquat Sci.* 64: 272-295.

Casiraghi, M., M. Labra, E. Ferri, A. Galimberti & F. De Mattia. 2010. DNA barcoding: a six-question aatour to improve users' awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics*. (4): 440-453.

Cerdenares, G., E. Ramírez, S. Ramos, G. González, V. Anislado, D. López & S. Karam. 2014. Impacto de la actividad pesquera sobre la diversidad biológica. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 1(1): 2334-2501.

Cifuentes, L., P. Torres & M. Frías. 1997. El océano y sus recursos. IV las ciencias del mar oceanografía biológica. México DF, México. FONDO DE CULTURA ECONOMICA. 109 pp.

Cortes. 1997. Estudio del ciclo vital del recurso locate (Thais chocolata), en las Regiones I a IV. Informe Final, *Proyecto FIP*. 94-34: 90.

Claremont, M., G. Vermeij, S. Williams & D. Reid. 2013. Global phylogeny and new classification of the Rapaninae (Gastropoda: Muricidae), dominant molluscan

- predators on tropical rocky seashores. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 66: 91–102.
- Davison, A., R. Blackie & G. Scothern. 2009. DNA barcoding of stylommatophoran land snails: a test of existing sequences. *Molecular Ecology Resources*. 9: 1092-1101.
- Darriba, D., L. Taboada, D. Doallo & D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. 9(8): 772
- De Zoysa, M. 2012. Medicinal Benefits of Marine Invertebrates: Sources for Discovering Natural Drug Candidates. *Advances in Food and Nutrition Research*. 65: 154–169.
- De Luca, D., G. Catanese, G. Procaccini & G. Fiorito. 2014. An integration of historical records and genetic data to the assessment of global distribution and population structure in *Octopus vulgaris*. *FRONTIERS IN ECOLOGY AND EVOLUTION*. 2:1-8.
- Domínguez, J., B. Ceballos, F. Hochberg & M. Arellano. 2013. A new record in a well-established population of *Octopus hubbsoum* (Cephalopoda: Octopodidae) expands its known geographic distribution range and maximum size. *American Malacological Bulletin*. 31(1): 95-99.
- Drummond, A., M. Suchard, D. Xie & A. Rambaut. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology And Evolution*. 29: 1969-1973.
- Duclos, P. 1832. Description de quelques espèces de pourpres, servant de type à six sections établies dans ce genre. *Annales des Sciences Naturelles*. 26: 103-112.
- Espoz, C., D. Lindberg, J. Castilla & B. Simison. 2004. Los patelogastrópodos intermareales de Chile y Perú. *Revista Chilena de Historia Natural*. 77: 257-283.

- FAO. 1996. La diversidad genética de los recursos pesqueros marinos Posibles repercusiones en la pesca. Roma, Italia. 48 pp.
- Fiser, Z & E. Buzan. 2013. 20 years since the introduction of DNA barcoding: from theory to application. *J Appl Genetics*. 11 pp.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. 3(5): 294-299.
- Freire, J & U. Labarta. 2003. El *Prestige*: Impactos sobre los recursos y ecosistemas marinos. Ed. Fundació Santiago Rey Fernández-Latorre (A Coruña) .104 -135 pp.
- González, M. 2012. Códigos de barras de ADN tras las huellas de las especies. *Hipotesis, Apuntes científicos uniandinos*. (12): 51-56.
- Giraldo, A & C. Gómez. 1999. Variación en la concha de *Siphonaria gigas* (Sowerby, 1825) como respuesta al efecto de la intensidad de las olas. *Ciencias Marinas*. 25(2): 213-224.
- Gopal, R., M. Vijayakumaran, R. Venkatesan & S. Kathirolu. 2008. Marine organisms in Indian medicine and their future prospects. *Nat. Prod. Rad.* 7(2): 139-145.
- García, C., N. Pérez, J. Fernández & F. Fuentes. 2014. Calibrating the chitons (Mollusca: Polyplacophora) molecular clock with the mitochondrial DNA cytochrome C oxidase I gene. 2014. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 49(2): 193-207.
- Guerra, A., T. Cortez, and F. Rocha. 1999. Redescrición del pulpo de los Changos, *Octopus mimus* Gould, 1852, del litoral chileno-peruano (Mollusca, Cephalopoda). *Iberus*. 17: 37-7.

- Ghiselin, M. 1988. The origin of molluscs in the light of molecular evidence. *Oxford Surveys Evol. Biol.* 5: 66-95.
- Guzman N., S. Saa, L. Ortlieb. 1998. Catalogo descriptivo de los moluscos litorales (Gastropoda y Pelecypoda) de la zona de Antofagasta, 23°S (Chile). *Estudios Oceanologicos*. 17: 17-86.
- Hamaguchi, M., M. Manabe, N. Kajihara, H. Shimabukuro, Y. Yamada & E. Nishi. 2017. DNA barcoding of flat oyster species reveals the presence of *Ostrea stentina* Payraudeau, 1826 (Bivalvia: Ostreidae) in Japan. *Marine Biodiversity Record*. 10(4): 1-10.
- Hajibabaei, M., G. Singer, E. Clare & P. Hebert. 2007. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology*. 5(1): 1-7
- Hebert, P., A. Cywinska, S. Ball & J. Waard. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 270: 313-321.
- Hebert, P., S. Ratnasingham & J. Waard. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London*. 270: 1-4.
- Hebert, P., E. Penton, J. Burns, D. Janzen & W. Hallwachs. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS*. 41(101): 14812-14817.
- Hernández C., R. Yáñez & A. Rudolph. 2000. Toxicity response of *Emerita analoga* (Stimpson, 1857) collected from beaches of South Central Chile. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65: 567-572.

- Holland, P., A. Hacker & A. Williams. 1991. A molecular analysis of the phylogenetic affinities of *Saccoglossus cambrensis* Brambell & Cole (Hemichordata). *Philos Trans R Soc Lond Biol.* 332: 185-189.
- Hopkins, A. 2009. Marine invertebrates as indicators of reef health. A thesis for the degree of Master of Science and the Diploma of Imperial College London. Londres, Inglaterra. 88 pp.
- IMARPE. 2009. Estudio de línea base en el ámbito marino del área Sur de la Bahía El Ferrol 6-17 noviembre 2008. Chimbote, Perú. 77pp.
- IMARPE. 2014. Diagnóstico de las poblaciones de los recursos pesqueros para el ordenamiento como base para su sostenibilidad y seguridad alimentaria. Callao, Perú. 235 pp.
- IMARPE. 2015. Diagnóstico de las poblaciones de los recursos pesqueros para el ordenamiento como base para su sostenibilidad y seguridad alimentaria. Callao, Perú. 239 pp.
- IMARPE. 2016. Guía ilustrada para reconocimiento de especies de moluscos bivalvos con valor comercial. 2(1): 1-88.
- IMARPE. 2017. Evaluación del POI de I, II, III y IV bimestre. Callao, Perú. Recuperado el 15 de agosto del 2017. www.imarpe.gob.pe.
- Jiménez, A. 2009. Inferencia filogenética vs soporte de máxima likelihood. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. 8 pp.
- Jacinto, M., J. Chávez, O. Morón, S. Sánchez & J. Córdova. 1997. Evaluación de la calidad del ambiente marino en la Bahía Ferrol, Chimbote (17-19 abril 1996). *Inf. Pro. Inst. Mar Perú.* 69: 15-39.

- Kumar, S. G. Steche & k. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 11 pp.
- Keen, A. 1971. Sea Shells of Tropical West America. Marine mollusks from Baja California to Peru. 15(2): 1064 pp.
- Kimura, M. 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120.
- Kaneko, N., T. Kubodera & A. Iguchis. 2011. Taxonomic Study of Shallow-Water Octopuses (Cephalopoda: Octopodidae) in Japan and Adjacent Water using Mitochondrial Genes with Perspectives on Octopus DNA Barcoding. *BioOne*. 54(2): 97-108.
- Kress, W & D Erickson. 2008. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *PNAS*. 8(105): 2761-2762.
- Kim, C., S. Moon, S. Gelder & W. Kim. 1996. Phylogenetic relationships of annelids, molluscs, and arthropods evidenced from molecules and morphology. *J mol Evol*. 43: 207-215.
- Lanteri, A. 2007. Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la entomología. *Rev. Soc. Entomol. Argent*. 66(3-4): 15-25.
- Larson, E., M. Catelin, W. Bronwyn, J. Olden & C. Abbott. 2016. Phylogenetic species delimitation for crayfishes of the genus *Pacifastacus*. *PeerJ*. 19 pp.
- Leticia, M. 2011. Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del Río de la Plata y efluentes. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata. 170 pp.

- Layton, K., A. Martel & P. 2014. Hebert. Patterns of DNA Barcode variation in Canadian Marine Molluscs. *Plos One*. 9(4): 1-9.
- Loayza, R. 1998. Génesis de la perturbación de la Bahía “El Ferrol”. Universidad Nacional del Santa. Chimbote, Perú. 104 pp.
- López, E., E. Ríos & M. Pérez. 2005. RANGE EXTENSION FOR *OCTOPUS HUBBSORUM* (MOLLUSCA: OCTOPODIDAE) IN THE MEXICAN PACIFIC. *BULLETIN MARINE SCIENCE*. 77(2): 171-175.
- Lara, A. 2008. Código de barras de ADN de las especies cubanas de peces dulceacuícolas. Tesis de maestría. Universidad de la Habana. 66 pp.
- Marín, A., J. Serna, C. Robles, B. Ramírez, L. Reyes, E. Zelada, G. Sotil & R. Alfaro. 2018. A glimpse into the genetic diversity of the Peruvian seafood sector: Unveiling species substitution, mislabeling and trade of threatened species. *PLoS ONE*. 13(11): 1-34.
- Mangum, C. 1985. Oxygen transport in invertebrates. *Am J Physiol*. 248: 505-514.
- MINAM. 2010. Cuarto informe nacional sobre la aplicación del convenio de diversidad biológica años 2006-2009. Lima, Perú. 184 pp.
- MINAM. 2012. Plan de recuperación ambiental de la Bahía “El Ferrol” (Chimbote, Perú). Lima, Perú. 116 pp.
- MINAM. 2014. Quinto informe nacional ante el convenio sobre la diversidad biológica: PERÚ. Lima, Perú. 271 pp.
- Muniz, P., P. Lana, N. Venturini, R. Elias, E. Valarino, C. Bremec, C. Martins & L. Sandrini. 2013. Un manual de protocolos para evaluar la contaminación marina por efluentes domésticos. Edit. UdelaR. Montevideo, Uruguay. 1(1): 129.

- Meyer, C & G. Paulay. 2005. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *Plos Biology*. 3(12):2229-2238.
- Medina, A., M. Romero, C. Bidan, M. Navarte. 2015. Análisis demográfico de tres poblaciones de *Zidona dufresnei* localizadas en el Atlántico sudoccidental. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 43(3): 446-456.
- Moscoso, V. 2012. Catálogo de crustáceos decápodos y estomatópodos del Perú. *Bol. Inst. Mar Perú*. 27(1,2): 1-209.
- Mujica, A., M. Nava & E. Flores. 2015. Descripción del estado de megalopa de *Emerita analoga* (Stimpson, 1857) (Decapoda, Anomura, Hippidae). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 43(1): 262-266.
- Olivares, A., J. Quinteiro & M. Rey. 2006. Autenticación de lapas del género *Fissurella* (Mollusca: Vetigastropoda) en la costa chilena, mediante PCR-RFLP. *Invest. Mar. Valparaíso*. 34(1): 113-118.
- Olivares, A. 2007. Sistemática molecular del género *Fissurella* en el pacífico sudoriental. Tesis doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, España. 285 pp.
- Osorio, E., M. Ramírez, W. López, L. Mambuscay. 2009. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 1(7): 125-131.
- Osorio C., N, Bahamonde & M.T López. 1967. El Limanche *Emerita analoga* (Stimpson) en Chile. (Crustacea, Decapoda, Anomura). *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural*. 29: 62-116.

- ONU & COP20. 2014. *Proyectogef-pnud humboldt: hacia un manejo con enfoque ecosistémico del gran ecosistema marino de la corriente de humboldt*. Lima, Perú. 12pp.
- Paredes, C., F. Cardoso, J. Santamaría, J. Esplana & L. Llaja. 2016. Lista anotada de los bivalvos marinos del Perú. *Revista Peruana de Biología*, 23(2), 127-150.
- Pardo, L., D. Ampuero & D. Véliz. 2009. Using morphological and molecular tools to identify megalopae larvae collected in the field: the case of sympatric *Cancer crabs*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 89(3): 481-490.
- Páiz, L. & J. Huete. 2008. DNA Barcode, una alternativa para identificar especies del Complejo Midas Cichlidae en Nicaragua. *Encuentro 2008/ Año XL*. 81: 99-111.
- Paredes, C., V. Vera & F. Cardoso. 1999. Estado actual del conocimiento de los moluscos acuáticos en el Perú. *Revista Peruana de Biología*. 6(1): 5-47.
- Paz, A., M. Gonzalez & A. Crawford. 2011. Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta biol. Colomb*. 16(3): 161-176.
- Páiz, L. & J. Huete. 2008. DNA Barcode, una alternativa para identificar especies del Complejo Midas Cichlidae en Nicaragua. *Encuentro 2008/ Año XL*. (81): 99-111.
- Páiz, L. 2009. Informe de participación en la Third International Barcode of life Conference, México DF, del 7 al 13 de noviembre de 2009. *Encuentro 2008/ Año XLI*. (84):102-104.
- PNUMA. 1999. Diagnóstico Regional sobre las actividades y fuentes terrestres de contaminación que afectan los ambientes marinos, costeros y dulceacuícolas en el Pacífico Sudeste. Quito, Ecuador. 106 pp.

- PeBol. 2014. Estrategía Colaborativa Para Aplicar el Código de Barras de ADN en el Perú. Recuperado el 21 de junio 2016. <http://pebol.org/proyecto/estrategia-colaborativa/>
- Peña. C. 2011. Métodos de inferencia filogenética. *Rev peru. Biol.* 18(2): 265-267.
- Pierre. J. 2001. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity?. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268(2002): 121-145.
- Pliego, R., L. Flores, U. Markaida, I. Barriga, E. Mora & E. Arias. 2016. Genetic evidence of the presence of *Octopus mimus* in the artisanal fisheries of octopus in Santa Elena Peninsula, Ecuador. 2016. *Amer. Malac. Bull.* 34(1): 1-5.
- Pliego, R., F. Hochberg, F. Garcia & I. Barriga. 2014. Close genetic relationships between two American Octopuses: *Octopus hubbsorum* Berry, 1953, and *Octopus mimus* Gould, 1852. *Journal of Shellfish Research.* 1(33): 293-303.
- Pons. J., T. Barraclough, J. Gomez, A. Cardoso, D. Duran, S. Hazell, S. Kamoun, W. Sumlin & A. Vogler. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. 4(55): 595-609.
- Puillandre, N., A. Lambert, S. Brouillet & G. Achaz. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology.* 21: 1864-1877.
- Quinteiro, J., J. Melena, R. Santander, N. González & M. Méndez. 2016. Etiquetado genético (DNA-barcoding) de especímenes de pulpo, *Octopus spp.*, de la costa de Ecuador. 2016. *Foro Rec. Mar. AC. Rías Gal.* 18: 225-232.
- Quiroz. M & E. Barriga. 1998. Prospección del caracol *Thais chocolata* en el litoral de Moquegua y Tacna, Julio 1997. *Informe Progresivo-Instituto del Mar del Perú*, 90: 3-16.

- Ramirez, J., J. Birindelli, D. Carvalho, P. Affonso, P. Venere, H. Orega, M. Carillo, J. Rodríguez & P. Galetti. 2017. Revealing Hidden Diversity of the Underestimated Neotropical Ichthyofauna: DNA Barcoding in the Recently Described Genus *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae). *Frontiers in Genetics*. 149(8): 1-11.
- Romero, P & R. Ramírez. 2011. Divergencia intraespecífica y código de barras de ADN en *Systrophia Helicycloides* (Gastropoda, Scolodontidae). *Rev. Peru. Biol.* 18(2): 201-208.
- Radulovici, A., B. Sainte & F. Dufresne. 2009. DNA barcoding of marine crustaceans from the Estuary and Gulf of St Lawrence: a regional-scale approach. *Molecular Ecology Resources*. 1(9): 181-187.
- Ramírez, R., C. Paredes & J. Arenas. 2003. Moluscos del Perú. *Rev. Biol. Trop.* 51 (3): 225-284.
- Rey, I. 2012. Identificación forense de especies silvestre. SEBBM DIVULGACION. <http://www.sebbm.es>
- Rehman, A., S. Jafar, N. Raja, J. Mahar. 2015. Use of DNA Barcoding to Control Illegal Wildlife Trade: ACITES Case Report from Pakistan. *Journal of Bioresource Management*. 2(2): 18-22.
- Ratnasingham, S & P. Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*. 7:355-364.
- Ratnasingham, S & P. Hebert. 2013. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE*. 8(7): 1-16.

- Rodriguez, S., F. Ojeda & N. Inostrosa. 1992. Inductores químicos del asentamiento de invertebrado marinos bentónicos: importancia y necesidad de su estudio en Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*. 65: 297 – 310.
- Stanatakis, A. 2014. RAxMLversión 8: a fast phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 1(30): 1312-1313.
- Saitou, N & M. Nei .1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406-425.
- Salinas, H. 2010. Divergencia morfológica de la concha entre tres poblaciones de caracoles acuáticos del género *Biomphalaria*, tesis para optar el título de Médico Veterinario. Universidad de Chile. 52 pp.
- Stein, E., B. White, R. Mazor, P. Miller & E. Pilgrim. 2013. Evaluating ethanol-based sample preservation to facilitate use of DNA barcoding in routine freshwater biomonitoring programs using benthic macroinvertebrates. *PLoS ONE*. 8(1): 1-7.
- Serrato. A., R. Cornejo & O. Amilpa. 2013. La biodiversidad y evolución en ambientes acuáticos analizadas con herramientas moleculares. *Hidrobiológica*. 23(3): 275-286.
- Stoeckle, M. 2003. Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *BioScience*. 53(9): 796-797.
- Sotil. G. 2008. Variabilidad morfológica y de la aloenzima Malato deshidrogenasa en poblaciones peruanas del gasterópodo intermareal *Stramonita Haemastoma*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Mayor De San Marcos. 129 pp.
- Solís, F., A., Laguarda & M. Honey. 2014. Biodiversidad de equinodermos (*Echinodermata*) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 441–449.

- Söller, R., K. Warnke, U. Saint & D. Blohm. 2000. Sequence divergence of mitochondrial DNA indicates cryptic biodiversity in *Octopus vulgaris* and supports the taxonomic distinctiveness of *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopodidae). *Marine Biology*. 136: 29-35.
- Sun, S., Q. Li, L. Kong, H. Yu, X. Zheng, R. Yu, L. Dai, Y. Sun, J. Chen, J. Liu, L. Ni, Y. Feng, Z. Yu, S. Zou & J. Lin. 2016. DNA barcoding reveal patterns of species diversity among southwestern Pacific molluscs. *SCIENTIFIC REPORTS*. 17 pp.
- Taggart, J., R. Hynes, P. Prodohl & A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology*. 40: 963-965.
- Tresierra, A., A. García, M. Huerto, P. Berrú, D. Reyes & C. Cervantes. 2007. Bahía El Ferrol, Chimbote, Perú: una visión integral de sus recursos vivos y su ambiente. 2001-2005. *Inf Inst Mar Perú*. 34(1):25-68 pp.
- Trivedi, S., A. Aloufi, A. Ansari & S. Ghosh. 2016. Role of DNA Barcoding in Marine Biodiversity Assessment and Conservation: An update. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23: 161-171.
- Trussell, G. 2000. Phenotypic clines, plasticity, and morphological trade-offs in an intertidal snail. *Evolution*. 54 (1): 151-166.
- Tobar, C & C. Ibáñez. 2013. *Acaothopleura echinata* (Barnes, 1824): antecedentes de la especie. *Amici Molluscarum*. 21(2): 23-28.
- Uribe, R., R. Juan, P. Carbajal & P. Berrú. 2013. Invertebrados marinos bentónicos del litoral de la región Áncash, Perú. *Bol Inst Mar Perú*. 28(1-2): 136-259.

- Villalobos, G., J. Mendoza. 2010. La Biodiversidad en Campeche: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (conabio), Gobierno del Estado de Campeche, Universidad Autónoma de Campeche, El Colegio de la Frontera Sur. México DF, México. 730 pp.
- Vera, S., P. Jiménez & L. Franco. 2012. USO DE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS EN LA EVALUACION DE SECUENCIAS "DNA BARCODE" PARA LA IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE. *FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS*. 8(2):196-209.
- Vinuesa, J., G. Lovrich, F. Tapella & A. Pettovello. 2015. Crustáceos de interés comercial. Editorial Universitaria de la Patagonia. Comodoro Rivadavia. 2 (1): 67-117.
- von May, R., A. Catenazzi, A. Angulo, P. Venegas & C. Aguilar. 2012. Investigación y conservación de la biodiversidad en Perú: importancia del uso de técnicas modernas y procedimientos administrativos eficientes. *Rev. Peru. Biol.* 19(3): 351-358.
- Ward, R., T. Zemlak, B. Innes, P. Last, & P. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360(1462): 1847-1857.
- Wei, X., B. McCune, H. Thorsten, H. Li, S. Leavitt, Y. Yamamoto, S. Tchabanenko, & J. Wei. 2016. *PLoS ONE*. 11(11): 1-20.
- WoRMS. 2017. World Register of Marine Species. <http://www.marinespecies.org>
- Yu, N., H. Gu, Y. Wei, N. Zhu, Y. Wang, H. Zhang, Y. Zhu, X. Zhang, C. Ma & A. Sun. 2016. Suitable DNA Barcoding for Identification and Supervision of Piper Kadsura in Chinese Medicine Markets. *Molecules*. 21(1221): 1-10.

- Zhang, J., P. Kapli, P. Pavlidis & A. Stamatakis. 2013. A general species delimitation method with application to phylogenetic placements. *Phylogenetics*. 22(29): 2869-2876.
- Zhi-Qiang, Z. 2011. Animal biodiversity: an introduction to higher-level classification and taxonomic richness. *Zootaxa*. 3148: 7-12.
- Zou, S & Q. Lingfeng. 2012. Multigene Barcoding and Phylogeny of Geographically Widespread Muricids (Gastropoda: Neogastropoda) Along the Coast of China. *Mar Biotechnol*. 14: 21-34.

10. ANEXOS

ANEXO 1. Descripción taxonómica de: *Acanthopleura echinata*, *Emerita analoga*, *Thaisella chocolata*, *Fisurella maxima*, *Bursa ventricosa*, *Tagelus dombeii*, *Argopecten purpuratus*, *Semele solida*, *Octopus mimus*, *Cancer porteri*, *Cancer setosus*.

1. *Acanthopleura echinata* (Barnes, 1824)

Quitón, apretador, quirquincho, barquillo, barbudo y chitón espinoso



Figura 7. Ejemplar de *A. echinata*, colectado en la bahía El Ferrol.

Sistemática

Según WORMS (2017):

Phylum: Mollusca Clase: Polyplacophora Orden: Chitonida Familia: Chitonidae

Sinonimia

Chiton echinatus: Barnes, 1824

Descripción y diagnóstico de la especie

Cuerpo alargado y ovalado. Perinoto cubierto por espinas calcáreas oscuras y blancas. Valvas de coloración blanquecina en la parte central.

Biología de la especie

Forma grupos pequeños de dos o tres individuos rodeado de cirripedos y lapas.

Hábitat

Especie fue encontrada sobre sustrato rocoso. Suelen presentarse en el intermareal medio e inferior y en el submareal somero

Distribución

De Bahía Ferrol. Ancash – Perú. Se reporta en Paita (Perú); Islas Galápagos (Ecuador) hasta Estrecho de Magallanes (Chile).

Referencia: Uribe *et al.* (2013) / Álamo y Valdivieso (1987)

Responsable de la identificación: Luis Quipuzcoa

CODIGO DE BARRAS



II. *Emerita analoga* (Stimpson, 1857)

Muy muy blanco

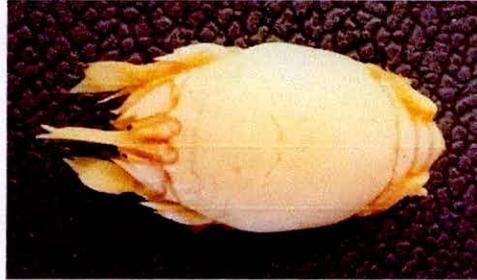


Figura 8. Ejemplar de *E. analoga* colectado en la bahía El Ferrol.

Sistemática

Según WORMS (2018):

Phylum: Arthropoda **Clase:** Malacostraca **Orden:** Decapoda **Familia:** Hippidae

Sinonimia

Hippa analoga: Stimpson, 1857

Descripción y diagnosis de la especie

Cefalotórax ovalado y la mitad anterior con líneas transversales a manera de finas hendiduras. Rostro con tres espinas. Abdomen reducido y replegado. Dactilos encorvados y aplanados. Primer par de apéndice sin pinza ni pseudopinza.

Biología

Viven en enterrados en la arena. Se alimentan de detritus y plancton que filtran con sus antenas. Las hembras llevan los huevos que eclosionan en larva zoea. Las hembras alcanzan mayor tamaño que los machos.

Hábitat

Intermareal arenoso, formando agregaciones.

Distribución

Isla Kodiak, Alaska a Baja California, México, Paíta, Perú al Estrecho de Magallanes, Chile.

Referencia: Hernández *et al.* (2000) / Moscoso (2012) / Mujica *et al.* (2015) / Osorio *et al.* (1967)

Responsable de la identificación: Lesly Llaja

CODIGO DE BARRAS



III. (a) *Thaisella chocolata* (Duclos, 1832)

Caracol, Caracol negro



Figura 9. Ejemplar de *T. chocolata* colectado en la bahía El Ferrol.

Sistemática

Según WORMS (2017):

Phylum: Mollusca Clase: Gastropoda Orden: Neogastropoda Familia: Muricidae

Sinonimia

Stramonita chocolata: Duclos, 1832

Descripción y diagnóstico de la especie

Concha grande y gruesa con tonalidades verde oliva oscuro y grisáceo. Espira baja, formada por anfractos angulares con nódulos conspicuos en forma regular, en algunas ocasiones no se observan. El último cubre casi todo el organismo y no siempre presenta nódulos. Abertura oval, amplia y ocupa casi dos tercios de la longitud total de la concha, su parte interna es blanca nacarada y la columela con coloraciones anaranjada y parda. Labio externo de la apertura es cortante y presenta una banda marginal oscura. Canal sifonal corto y ancho. Opérculo grande.

Biología de la especie

Depredadores carnívoros, toman su alimento principalmente de bivalvos, carroña y otros organismos. De hábitos gregarios, forma grandes grupos en aguas someras como parte de su comportamiento reproductivo y agregaciones menos densas para alimentarse.

Hábitat

Intermareal inferior, submareal sobre sustratos rocosos, en bajeríos y submareal de arena gruesa y arenofangoso. Profundidad: 2-40 m

Distribución

De Puerto Huarmey. Desde Ecuador, Paita (Perú) a Valparaíso (Chile). Localidades en la Región Áncash: Isla Santa, Bahía Ferrol, Bahía Samanco, Casma, Huarmey.

Observaciones

De interés comercial para consumo humano. Forma parte de los recursos que sustentan la pesquería artesanal en los principales puertos y caletas a lo largo de toda su distribución.

Referencia: Álamo y Valdivieso (1987) / Claremont *et al.* (2013) / Duclos (1832) / Ramírez *et al.* (2003)

Responsable de la identificación: Luis Quipuzcoa

CODIGO DE BARRAS



III. (b) *Thaisella chocolata* (Duclos, 1832)

Caracol, Caracol negro



Figura 10. Ejemplar de *T. chocolata* colectado en la bahía El Ferrol.

Sistemática

Según WORMS (2017):

Phylum: Mollusca Clase: Gatropoda Orden: Neogastropoda Familia: Muricidae

Sinonimia

Stramonita chocolata: Duclos, 1832

Descripción y diagnosis de la especie

Concha gruesa, de abertura ovada que ocupa los 2/3 de la longitud total, con espira corta. Las vueltas presentan tubérculos pronunciados en la parte superior. Opérculo de color marrón. Sutura notable.

Biología de la especie

Caracol carnívoro y carroñero, dioico y sin dimorfismo sexual externo.

Hábitat

Mesolitoral e infralitoral rocoso o arenoso, incluyendo conchuela y arena gruesa, se distribuye hasta 20 m de profundidad.

Distribución

Ecuador hasta Valparaíso, Chile.

Observaciones

Reportado por Álamo y Valdivieso (1997) como *Thais (Stramonita) chocolata*. Es un recurso de valor comercial en la pesquería artesanal, por el que se determinó un protocolo de muestreo para el mejor manejo.

Referencia: Arguelles *et al.* (2016) / Álamo y Valdivieso (1997) / Andrade *et al.* (1997) / Cortes (1997) / Avendaño *et al.* (1998) / Quiroz-Ruiz y Barriga-Rivera (1998).

Responsable de la identificación: Luis Quipuzcoa

CODIGO DE BARRAS



IV. *Bursa ventricosa* (Broderip, 1832)

Caracol rosado

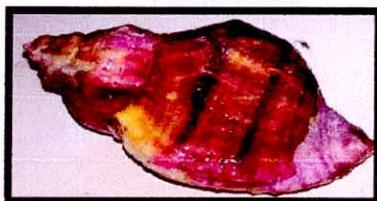


Figura 11. Ejemplar de *B. ventricosa* colectado en la bahía El Ferrol.

Sistemática

Según WORMS (2017):

Phylum: Mollusca

Clase: Gastropoda

Orden: Littorinimorpha

Familia: Bursidae

Sinonimia

Crossata ventricosa (Broderip, 1833)

Descripción y diagnóstico de la especie

Concha robusta de coloración rosácea, formada por cuatro a cinco anfractos, cada uno con un cordón de nódulos prominentes y puntiagudos, ubicados casi a la altura del hombro. Cada anfracto separado por suturas poco pronunciadas. Espira puntiaguda relativamente alta. Escultura externa formada por delgadas y ondeadas estrías espirales, mientras que las axiales son por lo general gruesas, elevadas y coinciden con los nódulos del hombro. El último anfracto es grande y se estrecha hacia el extremo inferior. Abertura ovalada y muestra el canal sifonal posterior bien desarrollado corto, ancho y profundo.

Biología de la especie

Carnívoros, depredadores de bivalvos y pequeños moluscos. Suelen estar epifitados por algas costrosas, cirripedos y pequeños poliplacóforos.

Hábitat

Submareal arenoso y rocoso hasta 15 m de profundidad

Distribución

De Puerto Huarmey. Desde Nicaragua a Antofagasta (Chile). Localidades en la Región Áncash: Isla Santa, El Dorado, bahía Samanco, Los Chimus, bahía Tortugas. Otras localidades en el Perú: Caleta La Cruz, Máncora, Punta Aguja, Colán, Islas Foca, Lobos de Tierra y Lobos de Afuera, Pimentel, Eten, Islas Macabí y Don Martín, Callao, Paracas, Bahía Independencia.

Observaciones

Estructura sólida de composición calcárea. Tienen importancia comercial ocasional o para consumo humano local. En la zona norte de Perú su consumo es más apreciado. De frecuencia moderada y baja abundancia.

Referencia: Álamo y Valdivieso (1987) / Broderip (1833) / Guzman y Ortlieb (1998) / Keen (1971) / Uribe *et al.* (2013)

Responsable de la identificación: Luis Quipuzcoa

CODIGO DE BARRAS



V. *Fissurella maxima* (G. B. Sowerby I, 1834)
Lapa

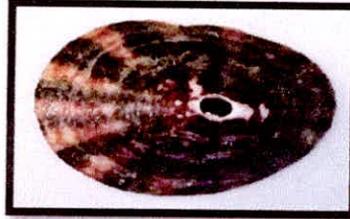


Figura 12. Ejemplar de *F. maxima* colectado en la bahía El Ferrol.

Sistemática

Según WORMS (2018):

Phylum: Mollusca **Clase:** Gastropoda **Orden:** Lepetellida **Familia:** Fissurellidae

Sinonimia

Fissurella hondurasensis: Reeve, 1849

Descripción y diagnosis de la especie

Concha gruesa, relativamente larga, medianamente alta, oval alargada, con orificio apical oval – circular. Lados de la concha elevados. Costillas primarias radiales prominentes, bajas y redondeadas con aspecto crenulado. Color amarillo grisáceo con 13 radios púrpura ininterrumpidos. Costillas primarias en cada radio de claro y oscuro. Pie no completamente retráctil en la concha, de color marrón y tubérculos fuertemente desarrollados. Tentáculos cefálicos marrones con las puntas amarillas. Lóbulo del manto amplio y con bandas marrones-púrpura que encajan con las rayas de la concha. Las papilas del manto bulbosas finamente ramificadas.

Biología

Herbívora generalista. La especie presenta dos periodos de desove en noviembre-diciembre y en julio-agosto. Longevidad probable hasta los 10 años.

Hábitat

Mediolitoral en ambiente semiexpuesto y submareal hasta los 4 m. En sustrato rocoso. Libres o asociados a algas.

Distribución

Huarmey, Perú a Lirquén, Chile.

Nombres sinónimos

Fissurella concinna Philippi, 1845; *Fissurella hondurasensis* Reeve, 1849; *Fissurella solida* Philippi, 1845.

Referencia: Álamo y Valdivieso (1997) / Aldea y Valdovinos (2005) / Bretos *et al.* (1983) / Olivares (2007)

Responsable de la identificación: Lesly Llaja

CODIGO DE BARRAS



VI. *Tagelus dombeii* (Lamarck, 1818)
Navajuela y lapicero

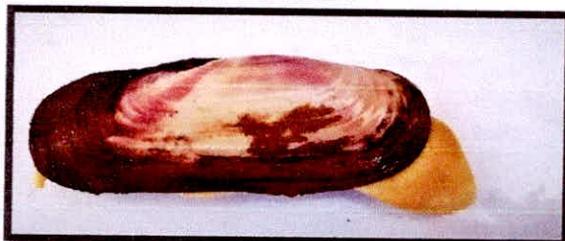


Figura 13. Ejemplar de *T. dombeii* colectado en la bahía El Ferrol.

Sistemática

Según WORMS (2018):

Phylum: Mollusca **Clase:** Bivalvia **Orden:** Cardiida **Familia:** Solecurtidae

Descripción y diagnosis de la especie

Dos valvas lisas alargadas e iguales con bordes redondeados y aberturas entre ellas. Líneas de crecimiento concéntricas suaves. Umbo subcentral. Pie excavador fuerte y ancho.

Biología de la especie

Filtradores de plancton y de detritus en suspensión. Forman densas agregaciones a poca profundidad e inclusive en zonas con bajo contenido de oxígeno disuelto.

Hábitat

Viven enterrados en fondos areno fangosos en áreas protegidas.

Distribución

De Bahía Tortugas. Ancash – Perú. En el Dorado y Samanco. Otras localidades Punta Telégrafo, Negritos, Bayovar, Paita, Pimentel, Puémape, La Punta, Callao, Pucusana y Bahía Independencia. Desde Panamá hasta Corcovado (Chile).

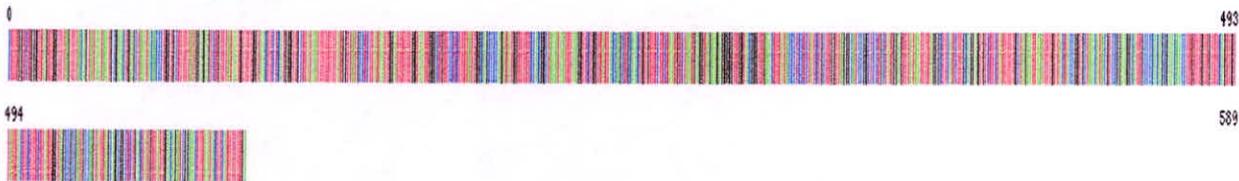
Observaciones

De importancia comercial para consumo humano. Con alta frecuencia y abundancia.

Referencia: Álamo y Valdivieso (1997) / Paredes *et al.* (2016) / IMARPE, 2016/ Uribe *et al.* (2013)

Responsable de la identificación: Luis Quipuzcoa

CODIGO DE BARRAS



VII. *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)

Concha de abanico



Figura 14. Ejemplar de *A. purpuratus* colectado en la bahía El Ferrol.

Sistemática

Según WORMS (2018):

Phylum: Mollusca **Clase:** Bivalvia **Orden:** Pectinida **Familia:** Pectinidae

Sinonimia

Pecten purpuratus: Lamarck, 1819

Descripción y diagnosis de la especie

Valvas grandes, convexas, gruesas y ligeramente aplanadas a los bordes. Con forma de abanico. Se observa costillas radiales profundamente marcadas hacia los bordes que son aserrados debido a su prolongación. Al interior de color blanco nacarado

Biología de la especie

Filtradores, hermafroditas funcionales con fecundación externa. La parte femenina de la gónada presenta una coloración anaranjada intensa, parte masculina es blanco cremoso. Sus principales depredadores son gasterópodos grandes, equinodermos y pulpos. Eventos El Niño afectan positivamente en el crecimiento de las poblaciones naturales.

Hábitat

Viven enterrados en fondos areno fangosos en áreas protegidas.

Distribución

De Bahía Tortugas. Ancash – Perú. Islas Santa y Blanca, Agua Fría, Bahías Ferrol, Samanco, Los Chimus y Casma. Otras localidades desde Paita (Perú) hasta Coquimbo (Chile).

Observaciones

De importancia comercial para consumo humano. Recurso explotado para la industria acuícola en diversas localidades de Perú y Chile. Con alta frecuencia y abundancia.

Referencia: Álamo y Valdivieso (1997) / Paredes *et al.* (2016) / IMARPE, 2016 / Uribe *et al.* (2013) / Paredes *et al.* (2016)

Responsable de la identificación: Luis Quipuzcoa

CODIGO DE BARRAS



VIII. *Semele solida* (Gray, 1828)

Almeja y concha blanca

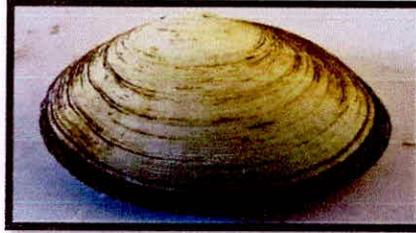


Figura 15. Ejemplar de *S. solida* colectado en la bahía El Ferrol.

Sistemática

Según WORMS (2018):

Phylum: Mollusca Clase: Bivalvia Orden: Cardiida Familia: Semelidae

Sinonimia

Amphidesma solida: J.E. Gray, 1828

Descripción y diagnóstico de la especie

Valvas subcirculares u ovaladas, delgadas a sólidas ligeramente comprimidas, diferentes entre sí. Borde anterior redondeado, superficie blanca, con estrías concéntricas finas, internamente con coloración blanca un poco amarillenta, en el centro con seno paleal conspicuo. Condróforo con dos dientes laterales en cada valva.

Biología de la especie

Son filtradores que viven semienterrados exponiendo los sifones para su alimentación.

Hábitat

Submareal arenoso con conchuela.

Distribución

De Bahía Ferrol. Ancash – Perú. Isla Santa, Casma y Huarmey. Otras localidades en Callao, Pucusana, Paracas, Islas Chincha, Bahía Independencia, Atico, Matarani e Ilo. Desde Chimbote (Perú) al Archipiélago de Chonos (Chile).

Observaciones

Recurso de importancia comercial para consumo humano. De moderada abundancia y baja frecuencia.

Referencia: Álamo y Valdivieso (1997) / Paredes *et al.* (2016) / IMARPE, 2016/ Uribe *et al.* (2013) / Paredes *et al.* (2016)

Responsable de la identificación: Luis Quipuzcoa

CODIGO DE BARRAS



IX. *Octopus mimus* Gould, 1852

Pulpo

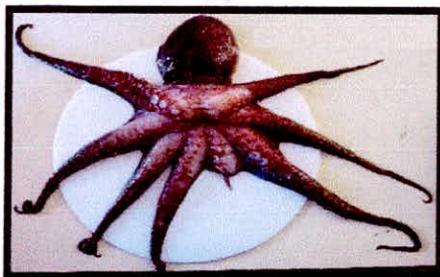


Figura 16. Ejemplar de *O. mimus* colectado en la bahía El Ferrol.

Sistemática

Según WORMS (2018):

Phylum: Mollusca Clase: Cephalopoda Orden: Octopoda Familia: Octopodidae

Descripción y diagnóstico de la especie

De tamaño relativamente grande y manto grueso, ovalado o redondeado posteriormente. Cabeza pequeña. Brazos moderadamente largos, unas cuatro veces la longitud del manto, los brazos laterales son los más largos. Ventosas de tamaño medio, con amplia separación entre ellas.

Biología de la especie

Se afirma que *O. mimus* es un depredador oportunista que utiliza como alimento presas de cinco grupos zoológicos (peces, crustáceos, moluscos, equinodermos y poliquetos)

Hábitat

Infralitoral rocoso

Distribución

De Bahía Ferrol. Ancash – Perú. En el Pacífico sudeste desde el norte del Perú (Tumbes) a Chile central (Bahía San Vicente).

Observaciones

Es un recurso bentónico muy importante en la pesquería artesanal y de gran demanda en el mercado internacional.

Referencia: Álamo y Valdivieso (1997) / Cardoso *et al.* (2004)

Responsable de la identificación: Luis Quipuzcoa

CODIGO DE BARRAS



X. *Cancer porteri* (Rathbun, 1930)

Jaiva, cangrejo violado, cangrejo limón

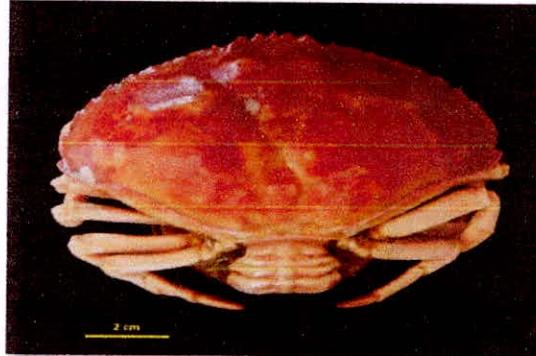


Figura 17. Ejemplar de *C. porteri* colectado en la bahía El Ferrol.

Sistemática

Según WORMS (2018):

Phylum: Arthropoda Clase: Malacostraca Orden: Decapodo Familia: Cancridae

Descripción y diagnosis de la especie

Caparazón ovalado, convexo y ancho con las regiones branquiales que casi se unen en la línea media. Margen antero lateral crenulado. Caparazón y pereiópodos desprovistos de pelos.

Biología de la especie

Comparte hábitat con pequeños caracoles y poliquetos tubícolas onúfidios. Sin embargo en bancos naturales de *Ensis macha* suelen ser errantes y en algunos casos estar semienterrados.

Hábitat

De fondos arenosos y de arena con conchuela

Distribución

De Bahía Ferrol. Ancash – Perú. Se reporta también Bahía Samanco y Casma, Islas Guañape, Huacho, Callao y Bahía Independencia. De amplia distribución desde México a Panamá y desde Perú hasta Chile.

Referencia: Uribe *et al.* (2013) / Moscoso (2012) / Moscoso (2013)

Responsable de la identificación: Luis Quipezcoa

CODIGO DE BARRAS



XI. *Cancer setosus* (Bell, 1835)

Cangrejo peludo, jaiva peluda.



Figura 18. Ejemplar de *C. setosus* colectado en la bahía El Ferrol.

Sistemática

Según WORMS (2018):

Phylum: Arthropoda Clase: Malacostraca Orden: Decapodo Familia: Cancridae

Sinonimia

Cancer polyodon : Molina, 1782

Cancer setosus : Molina, 1782

Romaleon setosum: Poeppig, 1836

Descripción y diagnosis de la especie

De color marrón rojizo. Caparazón finamente granulado y junto a los pereiópodos, cubiertos de pelos gruesos y cortos. Regiones branquiales separadas. Dientes ántero-laterales dentiformes, prominentes, con puntas agudas curvadas hacia adelante. Frente estrecha. Quelípedos robustos y simétricos. Cinco series de tubérculos longitudinales a lo largo de la superficie exterior de la palma y dos filas de tubérculos sobre la palma y mitad proximal del dactilo. Tres espinas marginales grandes en el carpo.

Biología

Las hembras que viven en aguas salobres retoman al agua de baja salinidad para permitir la incubación de los huevos. Fecundidad alta con 2 000 000 huevos por hembra. Carnívoro, detritívoro. Hábitos principalmente nocturnos.

Hábitat

Intermareal hasta los 45 m con mayor abundancia entre los 4 a 8 m. Sobre arena heterogénea o fondos arenos fangosos con refugios de rocas, conchas y macroalgas.

Distribución

Guayaquil, Ecuador (posiblemente de un intercambio comercial), Pacasmayo, Perú a la Península de Taitao, Chile.

Referencia: Uribe *et al.* (2013) / Moscoso (2012) / Moscoso (2013)

Responsable de la identificación: Luis Quipezcoa

CODIGO DE BARRAS



ANEXO 2. Secuencias de las especies: *A. echinata*, *E. analoga*, *T. chocolata*, *F. maxima*, *B. ventricosa*, *T. dombeii*, *A. purpuratus*, *S. solida*, *O. cf hubbsorum*, *C. porteri*, *C. setosus*.

Especie	Secuencias
<i>F. maxima</i>	<p>GTGTGGGCCCGCCTGGCAGGTACAGGGCTAAGGTTGTTAATTTCGAGCTGAAT TAGGTCAACCGGGCGCCTTACTGGGGGACGATCAGCTATACAATGTAATTGT TACTGCTCATGCCTTTGTCATGATTTTTTTTTTTGGTTATGCCAATGATAATTGG GGGATTTGGA AATTGGCTGGTGCCTTTAATGTTAGGGGCTCCGGATATGGCA TTCCCTCGGTTGAATAATATAAGATTTTGACTGCTTCCGCCCTCTCTTGCTTT GCTGCTAATGTCAGCTGCTGTAAGAGGGGGGCCGGGACTGGCTGGACAGT GTACCCGCCTT TAGCGGGTAACCTAGCACATGCTGGGGCTTCAGTTGATTTA ACTATTTTTCTCTGCATTTGGCAGGTGTCTTCGATTCTTGGTGCTGTGAAT TTCATTACTACTATTATAATATACGGTGGGATGGAATGCATTTGGAGCGGA TTCCGTTGTTTGGTCTGTGAAGGTGACTGCTGTTTTGTTGCTGTTGTCTT TACCAGTTTTGGCTGGGGCTATTACGATGCTTTGACTGACCGTAATTTAAT ACTTCTTTTTTTGA</p>
<i>E. analoga</i>	<p>GCCTGAGCTGGGATAGTGGGCACCTTCCTTAAGACTTATTATTCGAGCAGAGT TAGGCCAACCGGAAGACTAATTGGGGATGACCAGATTTATAATGTCATTGT TACTGCCACGCGTTTGTATAATTTCTTTATAGTTATACCGATCATAATCG GGGGATTTGGTAATTGGCTAGTACCTCTTATACTGGGTGCCCCAGACATGGC TTTTCCACGAATAAACAATATAAGATTCTGACTTTTACCCCTCCCTGACAC TTCTTCTCATGAGTGGAATAGTAGAAAGAGGAGTTGGTACGGGATGGACAGT TTATCCTCCCTGTCCGCAGCAATCGCCACGCGGGGGCTTCAGTAGACCTT GGTATTTTACAGCTTACCTGGCCGGGGTCTCATCCATTCTAGGAGCAGTGA ATTTTATAACTACAGTTATTAATATACGCCCAATGGAATAACAATGGACCG TATACCCCTATTTGTGTGATCAGTGTTTATTACAGCGATTTTACTTTACTATC ACTACCAGTTTTAGCGGGAGCTATTACCATGCTTTTGACCGATCGTAATTTAA ACACCTTTTTTTTTGA</p>
<i>A. purpuratus</i>	<p>AATGTTGGGAATGTGGTCTGGGTTCCGGTGGGCTGAATCTTAGATGAATAATG CGTTTAGAGTTGAGGCGTCCGGGAATATGGCTTCTAGTTCTGAAGTCTATA ATGGAATTGTCACTCTTACGCTATCATGATAATTTCTTTTTTGTGATGCCT GTTTTAATTGGTGGGTTTGGTAATTGGCTTTTACCAATAATGTTAGGTGCTAT TGACATGAGGTTTCCCTCGACTAAATACATTTAGTTTTTGGGTGCTGCCTCCTG CTCTTTATTTGGTCATTGTTTCTTGTTTTATTGATTACGGTAGGGGAAGTGGG TGGACTATGTACCCACCGCTATCAAGGACTCCTTATTCTGGGGGGATGAGAA CAGATTTAATAATCTTAGGTCTCCACTTAGCGGGAATTAGGTCTTCAGCTGCT TCAATCAACTACTTAGTTACTTTTTTAAATGTTTCGAAGAAAGGCTTTTAAAGGC TGAATACTGTCCCCCTTTGTTTGGGCTCTTCTGTTACGAGGTTTTTGTGTT GGTATCTCTCCAGTTCTAGCCGGTGGGTTGACAATGTTGATTATAGACCGCC ACTTTAACTGTAGGTTCTTTGATCCTTCCGGGGGGGGG</p>
<i>B. ventricosa</i>	<p>ATGTGATCAGGCTTAGTAGGAACTGCTTTAAGTTTATTAATTTCGAGCTGAATT AGGTCAACCTGGAGCTTTATTAGGTGATGATCAATTATATAATGTTATTGTA ACTGCACATGCTTTTGAATAATTTTTTTTTCTGGTTATGCCAATGATAATTGG</p>

	<p>AGGTTTTGGAAACTGACTGGTTCCTTTAATATTAGGGGCTCCAGATATAGCTT TCCCTCGTCTAAATAATATAAGATTCTGATTGTTACCTCCTTCCCTTCTTTTAC TACTTTCTTCTGCCGCTGTAGAGAGAGGGTGTAGGAACTGGATGAACAGTATA TCCTCCATTATCGGGTAATCTAGCCCATGCTGGTGGTTCAGTTGACTTAGCTA TTTTTTCATTACATCTTGGCGGGTGCTTCTTCTATTTTAGGTGCCGTTAATTTTA TTACAACTATTATTAATATACGATGACGAGGTATACAGTTTGAGCGTTTACCT TTATTTGTATGATCTGTAAAAATTACAGCTGTTCTTTTACTTTTATCTCTTCCA GTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTTTTAAACGGATCGAAATTTAATACGGC CTTCTTTGA</p>
<i>C. porteri</i>	<p>GCATGAGCAGGAATAGTTGGAACCTCCCTCAGATTAATTATTTGAGCACAAT TAGGACAACCCGGGACTCTTATTAGAAACGATCAAATTTACAATGTCGTTGT CACTGCCATGCTTTTGTATAATTTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATCGG GGGATTTGGTAATTGATTAGTCCCTCTTATATTAGGAGCACCTGATATAGCTT TTCCACGTATAAACAACATAAGATTTTGATTACTACCCCTTCTCTAACCTA CTTCTTATAAGAGGAATAGTAGAAAGAGGTGTCGGAACAGGTTGGACTGTCT ACCCTCCTCTAGCAGGCGCTATTGCCATGCAGGCGCCTCAGTAGATATGGG GATCTTTTCGCTTCACTTAGCAGGAGTTTCTTCAATCTTAGGAGCTGTAACCTT TTATAACAACCTGTAATTAATATACGGTCATTTGGAATAACTTTGGATCAAAT ACCCTTTTTGTGTTGAGCGTATTTATTACTGCTATCCTTTTGTCTTTGTCTCT CCCAGTGTTAGCAGGAGCTATTACTATACTCCTCACTGACCGAAATCTTAAT ACTTCTTTCTTCGA</p>
<i>C. setosus</i>	<p>GCATGAGCTGGAATAGTTGGAACCTCTCTAAGATTAATTATCCGTGCTGAAC TAGGCCAACCTGGCACCTTATTAGAAATGATCAAATTTATAACGTTGTCGT TACTGCTCACGCTTTTGTAAATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTATAATTGG AGGATTTGGTAATTGACTAGTCCATTAATACTCGGAGCTCCCGATATAGCT TTCCCCGTATAAATAATATAAGATTCTGACTACTTCTCCTTCTTAACTCT TCTTCTTATAAGAGGAATAGTAGAAAGAGGAGTGGGAACCGGATGGACAGT TTACCCCTCTAGCAGGGGCCATTGCCACGCTGGAGCTTCAGTTGACATA GGGATTTTCTCTTACACTTAGCAGGAGTCTCCTCATTCTAGGAGCCGTGAA TTTTATGACAACCTGTAATTAATATACGATCTTTCGGGATAACTTTAGATCAA TACCTCTCTTCGTTTGGGCTGTATTTATTACTGCTATCCTCTTGCTTTTGTCTC TTCTGTCCTAGCAGGTGCAATTACTATATTATTAACCTGACCGTAATCTTAAT ACTTCTTTCTTTGA</p>
<i>T. chocolata</i>	<p>ATGTGATCGGGCCTAGTAGGAACTGCTTTGAGTTTACTTATCCGAGCTGAAT TAGGTCAGCCGGGTGCCCTATTAGGAGACGATCAGTTATATAACGTGATTGT AACAGCACATGCCTTTGTAAATAATTTTTTTCTTAGTTATGCCTATGATAATTG GTGGATTTGGTAATTGATTAGTACCTCTTATATTAGGGGCTCCTGACATGGCT TTCCACGGCTAAATAACATAAGTTTTTTGATTATTACCTCCTGCTCTACTTCTT CTTCTCTCTCAGCCGCTGTTGAAAGAGGGGTTGGAACGGGGTGAACAGTTT ACCCTCATTATCTGGTAACTTGGCTCATGCAGGGGGTCTGTTGATCTCGCA ATTTTCTCTCTACACCTAGCCGGGGTTTCTTCTATTTTAGGTGCTGTTAATTTT ATTACAACCTATTATTAATATGCGTTGACGTGGTATGCAGTTTGAGCGGCTTCC TCTGTTTGTGTTGATCTGTTAAGATCACAGCAATTCTTCTCTCCTTTCTTTACC TGTTTTGGCAGGGGCTATTACTATGTTGTTAACTGATCGGAATTTCAATACGG CATTCTTTGA</p>

<p><i>S. solida</i></p>	<p>TTATGGTCGGGGTTGGTTGGGTTGATTTACAGGGTTATAATACGGACGGAGT TAATACATCCGGGCTCATTTTATGGTGAGTCTATTTACAATGTGTTAGTGACT TCCCACGGGTTGTTGATGATTTTTTTTTATGGTTATACCGTTAATGATCGGGTT TTTTGGGAATTGGGCTGTGCCTTTATTATTAGCTGCGCCAGATATAGTTTTTG CGCGTTTAAATAATTTAAGGTTTTGATTACTCCCTGCTGCTACTGTTTTATTAT TGATGTCGAATGAGGTTGAAGATGGGGTGGGGACTGGTTGGACACTATACCC GCCTTTATCTGCTTGGTTAGGACATCCTGCTCCTGCTATGGAATTTTAAATTT AGGTCTACATATTGCGGGGATGTCTTCTATTTTTGCAAGGATTAATTTTGTTA CTACTGGGGTGAATATACGGCCCAGGGGATTAGCCCTCAGCGTAGTACATT ATTCGTCTGATCTGTGATTACTTTCGTTTTTATTAGTTGCTGCTATGCCTGT ATTAGCAGCCGGGCTAACGATATTGTTAACTGATCGAAATTTTAAACTTTCG TTTTTTGA</p>
<p><i>O. cf hubbsorum</i></p>	<p>ATTTGATCAGGACTTTTAGGTACCTCTCTAAGTTTAAATAATTCGAACAGAATT AGGTCAACCAGGATCTCTCCTAAATGATGATCAACTATATAACGTAATTGTT ACAGCACATGCATTTGTAATAATTTTTTTTTCTTGTATAACCTGTTATAATTGG AGGATTTGGTAATTGATTAGTTCCTTAATACTAGGAGCTCCAGACATAGCA TTCCCACGAATAAACAATATAAGTTTTTTGACTTTTACCACCTTCTCTTACCCT ATTATTATCTTCAGCTGCAGTAGAAAGAGGTGCAGGTACTGGATGGACTGTA TATCCCCCTCTTCAAGAAATTTAGCTCATATAGGCCCTTCCGTTGATCTAGC TATTTTTTCTCTTCATTTAGCTGGTATTTTCATCTATTCTTGGAGCCATTAECTT CATTACAACATTATCAATATACGATGAGAAGGAATTAATAAGAACGACTT CCATTATTTGTATGATCAGTATTTATTACCGCAATTTTATTACTTCTTTCCTTA CCAGTCCTTGCTGGAGCAATTACAATACTCTTAACAGATCGAAATTTTAAATA CCACTTTTTTTGA</p>
<p><i>A. echinata</i></p>	<p>ATTTGATCAGGCCTTGTCGGTACCGCCTTAAGACTATTAATTCGGGCTGAATT AGGACAGCCCAGGGCCTTACTTGGAGATGATCAACTTTATAATGTCATTGTG ACAGCACATGCTTTTGTGATAATTTTTTTTTTTGGTAATACCAATAATGATTGG GGGGTTTGGGAAGTGGCTAGTCCCTCTGATGCTTGGGGCTCCTGATATAGCT TTTCTCGGCTTAATAACATAAGATTCTGACTACTTCTCCAGCCTTATGTTT ACTTTTGGCTTCAGCTGCCGTTGAAAGGGGAGTCGGAACAGGTTGAACAGTC TATCCTCCCTTAGCAAGCAACATTGCTCACGCAGGAGGCTCAGTAGATTTAG CTATCTTTTCTCTTCACTTAGCTGGAGTTTCTTCGATTTTAGGAGCTGTAACT TTATTACTACGGTCTTTAACATGCGGTGAGTAGGAATACAATTAGAACGGCT CCCGCTATTTGTCTGATCTGTAAAAATTACAGCTATTTTGTTACTTTTATCCCT CCCTGTCTTAGCTGGCGGAATTACAATGCTTTTAAACAGACCGAAATTTTAAAC ACGGCTTTCTTTGA</p>
<p><i>T. dombeii</i></p>	<p>CTTTGGTCTGGGTTAGTTGGTTTAGTTTACAGTATAATAATGCGAACTGAGTT AATACACCCTGGTGCTTTTTATGGAGAGTCTGTTTATAATGTTTTGGTAACTT CTCATGGGTTGCTTATAATTTTTTTTTATGGTTATGCCTCTTATAATTGGATTTT TTGGTAATTGGGCTGTTCTCTTTTATTGGCAGCCCCAGATATGGTTTTTCCA CGGCTAAATAATTTAAGGTTCTGGTTATTACCAGCTGCAACTGTGTTTCTTCT AATGTCTAATGAGGTAGAAGAGGGGGTTGGTACGGGTTGAACTTTATACCTT</p>

CCTCTATCTGCTTGGTTAGGGCATCCGGCTCCTGCTATGGAGTTTATAATTT AGGGCTTCATCTTGCAGGAGTGTCTTCTATTTTGTCTAGAATTAATTTTGTTA CTACCGGTGCTAACATACGTCCGGAAGGCATTGCCCCACAGCGAACAACTT GTTTGTTGTTTCAGTTGTTATTACTTCTTTCTTATTGGTAGCCGCGATGCCAGT ATTAGCAGCGGCTCTGACTATGTTATTGACAGATCGGAACTTTAATACTTCAT TTTTGA

ANEXO 3. Codificación PeMar de los especímenes de la bahía El Ferrol para su identificación en el Laboratorio de Genética Fisiología y Reproducción de la Universidad Nacional del Santa y código PMIN asignado por la base de datos internacional BOLDsystems como muestra voucher para su identificación en la página www.boldsystems.org.

Código PeMar	Código de Boldsystems	Género	Especie	Abreviatura utilizada en los árboles filogenéticos
I0003	PMINV003-18	<i>Fisurella</i>	<i>F. maxima</i>	F_max01
I0004	PMINV004-18	<i>Fisurella</i>	<i>F. maxima</i>	F_max02
I0005	PMINV005-18	<i>Fisurella</i>	<i>F. maxima</i>	F_max03
I0006	PMINV006-18	<i>Fisurella</i>	<i>F. maxima</i>	F_max04
I0007	PMINV007-18	<i>Fisurella</i>	<i>F. maxima</i>	F_max05
I0008	PMINV008-18	<i>Thaisella</i>	<i>T. Chocolata</i>	T_ChoF101
I0009	PMINV009-18	<i>Thaisella</i>	<i>T. Chocolata</i>	T_ChoF102
I0010	PMINV010-18	<i>Thaisella</i>	<i>T. Chocolata</i>	T_ChoF103
I0013	PMINV013-18	<i>Thaisella</i>	<i>T. Chocolata</i>	T_ChoF104
I0014	PMINV014-18	<i>Thaisella</i>	<i>T. Chocolata</i>	T_ChoF105
I0044	PMINV044-18	<i>Thaisella</i>	<i>T. Chocolata</i>	T_ChoF201
I0045	PMINV045-18	<i>Thaisella</i>	<i>T. Chocolata</i>	T_ChoF202
I0047	PMINV047-18	<i>Thaisella</i>	<i>T. Chocolata</i>	T_ChoF203
I0048	PMINV048-18	<i>Thaisella</i>	<i>T. Chocolata</i>	T_ChoF204
I0049	PMINV049-18	<i>Thaisella</i>	<i>T. Chocolata</i>	T_ChoF205
I0015	PMINV015-18	<i>Argopecten</i>	<i>A. purpuratus</i>	A_Pur01
I0019	PMINV019-18	<i>Argopecten</i>	<i>A. purpuratus</i>	A_Pur02
I0020	PMINV020-18	<i>Argopecten</i>	<i>A. purpuratus</i>	A_Pur03
I0021	PMINV021-18	<i>Argopecten</i>	<i>A. purpuratus</i>	A_Pur04
I0022	PMINV022-18	<i>Argopecten</i>	<i>A. purpuratus</i>	A_Pur05
I0028	PMINV028-18	<i>Acanthopleura</i>	<i>A. echinata</i>	A_echi01
I0029	PMINV029-18	<i>Acanthopleura</i>	<i>A. echinata</i>	A_echi02
I0031	PMINV031-18	<i>Tagellus</i>	<i>T. dombeii</i>	T_dom01
I0032	PMINV032-18	<i>Tagellus</i>	<i>T. dombeii</i>	T_dom02
I0033	PMINV033-18	<i>Tagellus</i>	<i>T. dombeii</i>	T_dom03
I0035	PMINV035-18	<i>Tagellus</i>	<i>T. dombeii</i>	T_dom04
I0036	PMINV036-18	<i>Tagellus</i>	<i>T. dombeii</i>	T_dom05
I0037	PMINV037-18	<i>Bursa</i>	<i>B. ventricosa</i>	B_ven01
I0039	PMINV039-18	<i>Bursa</i>	<i>B. ventricosa</i>	B_ven02
I0040	PMINV040-18	<i>Bursa</i>	<i>B. ventricosa</i>	B_ven03
I0041	PMINV041-18	<i>Bursa</i>	<i>B. ventricosa</i>	B_ven04
I0042	PMINV042-18	<i>Bursa</i>	<i>B. ventricosa</i>	B_ven05
I0051	PMINV051-18	<i>Octopus</i>	<i>O. cf hubbsorum</i>	O_hubb01

I0052	PMINV052-18	<i>Octopus</i>	<i>O. cf hubbsorum</i>	O_hubb02
I0053	PMINV053-18	<i>Octopus</i>	<i>O. cf hubbsorum</i>	O_hubb03
I0054	PMINV054-18	<i>Octopus</i>	<i>O. mimus</i>	
I0055	PMINV055-18	<i>Octopus</i>	<i>O. cf hubbsorum</i>	O_hubb04
I0056	PMINV056-18	<i>Octopus</i>	<i>O. cf hubbsorum</i>	O_hubb05
I0057	PMINV057-18	<i>Semele</i>	<i>S. solida</i>	S_sol01
I0058	PMINV058-18	<i>Semele</i>	<i>S. solida</i>	S_sol02
I0059	PMINV059-18	<i>Semele</i>	<i>S. solida</i>	S_sol03
I0060	PMINV060-18	<i>Semele</i>	<i>S. solida</i>	S_sol04
I0062	PMINV062-18	<i>Semele</i>	<i>S. solida</i>	S_sol05
I0064	PMINV064-18	<i>Cancer</i>	<i>C. porteri</i>	C_por01
I0065	PMINV065-18	<i>Cancer</i>	<i>C. porteri</i>	C_por02
I0066	PMINV066-18	<i>Cancer</i>	<i>C. porteri</i>	C_por03
I0067	PMINV067-18	<i>Cancer</i>	<i>C. porteri</i>	C_por04
I0074	PMINV074-18	<i>Emerita</i>	<i>E. analoga</i>	E_ana01
I0075	PMINV075-18	<i>Emerita</i>	<i>E. analoga</i>	E_ana02
I0077	PMINV077-18	<i>Cancer</i>	<i>C. setosus</i>	C_seto01
I0078	PMINV078-18	<i>Cancer</i>	<i>C. setosus</i>	C_seto02
I0079	PMINV079-18	<i>Cancer</i>	<i>C. setosus</i>	C_seto03
I0080	PMINV080-18	<i>Cancer</i>	<i>C. setosus</i>	C_seto04
I0081	PMINV081-18	<i>Cancer</i>	<i>C. setosus</i>	C_seto05

Identificación molecular de invertebrados marinos de interés comercial de la bahía El Ferrol, Chimbote, Perú, a través de la técnica de Código de Barras de ADN

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

INDICE DE SIMILITUD

16%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

7%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.oceandocs.org Fuente de Internet	2%
2	www.revistas.unal.edu.co Fuente de Internet	1%
3	docslide.us Fuente de Internet	1%
4	www.scielo.org.ar Fuente de Internet	1%
5	www.chm-cbd.net Fuente de Internet	1%
6	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	1%
8	sebbm.es Fuente de Internet	<1%

9	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	<1%
10	Submitted to Universidad Tecnologica de Honduras Trabajo del estudiante	<1%
11	www.umar.mx Fuente de Internet	<1%
12	docplayer.es Fuente de Internet	<1%
13	www.redalyc.org Fuente de Internet	<1%
14	saberesciencias.com.mx Fuente de Internet	<1%
15	www.gaianicaragua.org Fuente de Internet	<1%
16	es.wikipedia.org Fuente de Internet	<1%
17	www2.produce.gob.pe Fuente de Internet	<1%
18	Submitted to Universidad San Ignacio de Loyola Trabajo del estudiante	<1%
19	issuu.com Fuente de Internet	<1%

eprints.ucm.es

20	Fuente de Internet	<1%
21	Submitted to Universidad Del Magdalena Trabajo del estudiante	<1%
22	www.biodiversidad.gob.mx Fuente de Internet	<1%
23	biologiaguanenta.blogspot.com Fuente de Internet	<1%
24	pebol.org Fuente de Internet	<1%
25	journals.plos.org Fuente de Internet	<1%
26	www.isamx.org Fuente de Internet	<1%
27	Submitted to Institución Tecnológica Metropolitana de Medellín Trabajo del estudiante	<1%
28	agricola-www.redalyc.org Fuente de Internet	<1%
29	appswl.elsevier.es Fuente de Internet	<1%
30	Submitted to Agrupación Marista Ecuatoriana Trabajo del estudiante	<1%

www.minam.gob.pe

31

Fuente de Internet

<1%

32

Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia

Trabajo del estudiante

<1%

33

Carlos Paredes, Pedro Huamán, Franz Cardoso, Ronald Vivar, Víctor Vera. "Estado actual del conocimiento de los moluscos acuáticos en el Perú", Revista Peruana de Biología, 2014

Publicación

<1%

34

Pablo S Reineri, María S. Coria, María G. Barrionuevo, Olegario Hernández, Santiago Callejas, Gustavo A. Palma. "Gene expression of growth factor BMP15, GDF9, FGF2 and their receptors in bovine follicular cells", Revista MVZ Córdoba, 2018

Publicación

<1%

35

www.imarpe.gob.pe

Fuente de Internet

<1%

36

Submitted to Universidad Católica de Oriente

Trabajo del estudiante

<1%

37

Submitted to Universidad Nacional del Santa

Trabajo del estudiante

<1%

38

Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León

<1%

Trabajo del estudiante

39

sisbib.unmsm.edu.pe

Fuente de Internet

<1%

40

Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD
AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA

Trabajo del estudiante

<1%

41

rua.ua.es

Fuente de Internet

<1%

42

www.leucemiaylinfoma.com

Fuente de Internet

<1%

43

bdigital.unal.edu.co

Fuente de Internet

<1%

44

anh.invemar.org.co

Fuente de Internet

<1%

45

www.sabiia.cnptia.embrapa.br

Fuente de Internet

<1%

46

diposit.ub.edu

Fuente de Internet

<1%

47

www.invemar.org.co

Fuente de Internet

<1%

48

Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS

Trabajo del estudiante

<1%

49

Páiz-Medina, Lucía, and Jorge Huete-Pérez.
"Filogenética Molecular de Peces del Complejo

<1%

Midas Cichlidae que habitan lagos y lagunas de Nicaragua, utilizando el gen COI", Encuentro, 2012.

Publicación

50	www.jotefa.com.ar Fuente de Internet	<1%
51	Submitted to Universidad de Alcalá Trabajo del estudiante	<1%
52	Submitted to Universidad Catolica Los Angeles de Chimbote Trabajo del estudiante	<1%
53	Submitted to CONACYT Trabajo del estudiante	<1%
54	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1%
55	www.imod.org.pe Fuente de Internet	<1%

Excluir citas Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía Activo