# EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE PIANGUA (*Anadara tuberculosa*) EN CINCO ZONAS DE LA ENSENADA DE TUMACO, NARIÑO UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES MITOCONDRIALES

ESMERALDA CHAMORRO LEGARDA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
SAN JUAN DE PASTO - COLOMBIA
2013

# EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE PIANGUA (*Anadara tuberculosa*) EN CINCO ZONAS DE LA ENSENADA DE TUMACO, NARIÑO UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES MITOCONDRIALES

ESMERALDA CHAMORRO LEGARDA

Informe final de trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Producción Acuícola

Presidente
CAROL YOVANNA ROSERO GALINDO
Biol. M.Sc. Dr.Sc.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
SAN JUAN DE PASTO - COLOMBIA
2013

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1° del acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

_____
_____
_____
_____
_____
_____

_____
**CAROL YOVANNA ROSERO GALINDO Biol. M.Sc., Dr.Sc.**
**Directora**

_____
**RUTH DAYANA LUCERO SALCEDO Ing. Prod. Ac. M.Sc.**
**Jurado Delegado**

_____
**CARLOS SOLARTE PORTILLA Zoot. M.Sc., Dr.Sc.**
**Jurado**

San Juan de Pasto, mayo de 2013

## DEDICATORIA

*A mi mamá Lourdes Legarda por todo el apoyo incondicional en el transcurso de mi vida, por sus consejos y su amor sincero; y a mi papá porque desde el cielo me ha acompañado.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Posgrados y Relaciones Internacionales VIPRI, por financiar esta investigación.

Al programa de Mejoramiento Genético Animal de la Universidad de Nariño liderado por el Dr. Carlos Solarte Portilla, por haber permitido la ejecución del presente proyecto en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Animal.

A mi directora de tesis Dra. Carol Yovanna Rosero Galindo, por su dedicación, compromiso y por enriquecerme con sus valiosos conocimientos.

A Benoit Diringer de Concepto Azul por su asesoría.

A la Asociación de Concheros de Nariño ASCONAR por su orientación en los manglares.

**CONTENIDO**


1. INTRODUCCIÓN 17

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 19

3. OBJETIVOS 20

3.1. GENERAL 20

3.2. ESPECÍFICOS 20

4. MARCO REFERENCIAL 21

4.1. GENERALIDADES DEL ORGANISMO DE ESTUDIO 21

4.1.1. Taxonomía. 21

4.1.2. Distribución geográfica. 21

4.1.3. Ciclo de vida. 21

4.1.4. Importancia económica de *A. tuberculosa* en Colombia. 23

4.1.5. Extracción y recolección de moluscos. 24

4.1.6. Factores que han afectado el ecosistema de manglar a través del tiempo. 26

4.2. GENERALIDADES DE LOS MARCADORES MOLECULARES 27

4.2.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). 28

4.2.2. Aplicación de marcadores moleculares en estudios acuícolas. 31

4.2.3. Importancia del uso de marcadores moleculares en la estimación de diversidad genética. 31

4.2.4. Uso de ADN mitocondrial como marcador molecular. 33

4.3. GENERALIDADES DEL CITOCROMO OXIDASA I 33

4.3.1. Características del COI. 33

4.3.2. Estudios genéticos en moluscos. 36

4.4. FACTORES DE EVOLUCIÓN 37

4.4.1. Mutación. 37

4.4.2. Deriva génica. 38

4.4.3. Migración. 38

4.4.4. Selección natural. 38

4.5. PARÁMETROS DE DIVERSIDAD GENÉTICA 39

4.5.1. Diversidad haplotípica (h). 39

4.5.2. Diversidad nucleotídica (π). 39

4.5.3. Estadístico D de Tajima. 39

4.5.4. Análisis de distribución de pares de secuencias (*Mismatch distribution*). 40

4.5.5. Análisis Molecular de Varianza y estructura poblacional (AMOVA). 40

4.5.6. Estadísticos F o índices de Fijación. 40

4.5.7. Equilibrio Hardy-Weinber (H-W). 41

4.5.8. Distancia genética. 42

5. MATERIALES Y MÉTODOS 43

5.1. LOCALIZACIÓN 43

5.2. MATERIALES Y EQUIPOS 44

5.3. MÉTODOS 46
5.3.1. Toma de muestras. 46
5.3.2. Extracción de ADN. 48
5.3.3. Amplificación por PCR. 49
5.3.4. Electroforesis. 51
5.3.5. Cuantificación y preparación de muestras para secuenciación. 52

5.4. ANALISIS ESTADÍSTICO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA 52
5.4.1. Secuenciación. 52
5.4.2. Diversidad y estructura genética. 52
5.4.3. Construcción de árboles filogenéticos. 53

6. RESULTADOS 54

6.1. EXTRACCIÓN DE ADN 54

6.2. AMPLIFICACIÓN POR PCR 56

6.3. SECUENCIACIÓN 57

6.4. DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA 58

6.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO 62

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS 65

7.1. DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA Y NUCLEOTÍDICA EN *A. tuberculosa* 65

7.2. ESTRUCTURA GENÉTICA EN *Anadara tuberculosa* 67

7.3. ESTRUCTURA FILOGENÉTICA EN *A. tuberculosa* 68

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 70

8.1. CONCLUSIONES 70

8.2. RECOMENDACIONES 71

BIBLIOGRAFÍA 73

ANEXOS 80

## LISTA DE TABLAS

pág.

**Tabla 1.** Codificación o nomenclatura dada a cada individuo muestreado en el laboratorio 48

**Tabla 2.** Componentes de PCR y volumen utilizado con Kit Concepto Azul 50

**Tabla 3**. Resultados de la cuantificación por espectrofotometría de los productos de PCR. 57

**Tabla 4.** Estadística descriptiva de los valores de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) para las poblaciones evaluadas 58

**Tabla 5**. Diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π) para las poblaciones evaluadas 58

**Tabla 6**. Transiciones y transversiones de los 21 haplotipos encontrados en población de *A. tuberculosa.* Calculado con Mega4. 59

**Tabla 7**. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) según Arlequín versión 2006. Grados de libertad (G.L.), Suma de cuadrados (S.C.). $P<0.05$ 61

**Tabla 8**. Valores del índice de fijación ($F_{ST}$) entre pares de poblaciones, según Arlequín versión 2006 61

## LISTA DE FIGURAS

pág.

**Figura 1.** Ciclo de vida de Piangüa (*Anadara tuberculosa*) 22

**Figura 2.** Características de los diferentes tipos de marcadores moleculares 28

**Figura 3.** Desnaturalización del ADN. Los puentes se rompen dejando al ADN en forma de cadena sencilla, permitiendo así exponer las diferentes bases nitrogenadas para la hibridación con los oligonucleótidos cebadores 30

**Figura 4**. Alineamiento del ADN. Inicio de la reacción de la PCR. Los cebadores complementarios que flanquean el sitio a amplificar se enlazan formando puentes de hidrógeno. De esta manera la polimerasa puede comenzar a extenderlos para copiar ambas hebras molde. 30

**Figura 5**. Etapa de elongación. Progreso de la reacción de la PCR. A la temperatura óptima de la ADN Polimerasa Taq (72°C), la enzima agrega los dNTPs a partir del 5' hacia el extremo 3'. 31

**Figura 6.** Genoma mitocondrial con aproximadamente 17 Kb. La flecha indica la posición del gen del citocromo oxidasa subunidad I (COI). 34

**Figura 7.** Equilibrio Hardy-Weinberg considerando un *locus* con dos alelos 42

**Figura 8**. Ubicación geográfica de Tumaco, Colombia 43

**Figura 9.** Localización del laboratorio de Mejoramiento Genético Animal 44

**Figura 10.** Mapa de zonas muestreadas 47

**Figura 11.** Mujer excavando para extraer piangüa en Tumaco 47

**Figura 12.** Toma de muestra de tejido de *Anadara tuberculosa* 48

**Figura 13.** Esquema de extracción de ADN con kit Concepto Azul 49

**Figura 14.** Esquema general del proceso de PCR con Kit Concepto Azul 50

**Figura 15.** Programación del termociclador para amplificar el gen mitocondrial COI para *A. tuberculosa* 51

**Figura 16**. Resultados de la extracción de ADN con Kit de Concepto Azul 54

**Figura 17**. ADN con Tratamiento de RNAsa y diluciones 55

**Figura 18**. Resultados de la extracción de ADN estandarizada 55

**Figura 19**. Foto de Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR obtenidos con kit de Concepto Azul. A) Zona 1, B) Zona 2, C) Zona 3, D) Zona 4 y E) Zona 5. 56

**Figura 20**. Foto de Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR obtenidos con técnica de PCR estandarizada en laboratorio. 57

**Figura 21**. Distribución de frecuencias del número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias del gen COI de *Anadara tuberculosa* para todas las secuencias en conjunto. 60

**Figura 22**. Distribución de frecuencias del número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias del gen COI de *Anadara tuberculosa* en las cinco poblaciones 60

**Figura 23**. Visualización del árbol filogenético para la especie *Anadara tuberculosa*, encontrado a partir del programa Mega4 63

**Figura 24**. Visualización del árbol filogenético consenso para la especie *A. tuberculosa*, sin considerar un grupo externo 64

## LISTA DE ANEXOS

pág.

**Anexo A**. Protocolo de extracción de ADN de bivalvos. Concepto Azul 80

**Anexo B.** Protocolo estandarizado de extracción de ADN a partir de tejido de *A. tuberculosa* 81

**Anexo C.** Protocolo de amplificación de un gen de bivalvos mediante simple PCR. Concepto Azul 82

**Anexo D.** Protocolo estandarizado de amplificación del gen mitocondrial COI por PCR. 83

**Anexo E**. BlastN para cada muestra 84

**Anexo F.** Secuencias utilizadas para el análisis estadístico 89

## GLOSARIO

ADN: ácido desoxirribonucleico, ácido nucleico formado por nucleótidos en los que el azúcar es desoxirribosa y las bases nitrogenadas son adenina, tiamina, citosina y guanina. Excepto en los retrovirus que tienen ARN, el ADN codifica la información para la reproducción y funcionamiento de las células y para la replicación de la propia molécula de ADN. Representa la copia de seguridad o depósito de la información genética primaria, que en las células eucariotas está confinada en el núcleo.

ALELOS: cada uno de los genes presentes en el mismo lugar (locus) del par de cromosomas homólogos. En general, uno de los diferentes estados alternativos del mismo gen.

AMINOÁCIDO: molécula orgánica que contiene los grupos amino y carboxilo. Son los monómeros de las proteínas. De su diversidad como del enorme número de combinaciones y longitudes resulta la enorme variedad de proteínas existentes.

BIOLOGÍA MOLECULAR: parte de la biología que trata de los fenómenos biológicos a nivel molecular. En sentido restringido comprende la interpretación de dichos fenómenos sobre la base de la participación de las biomoléculas, proteínas y ácidos nucleicos.

COI: citocromo oxidasa subunidad 1.

CEBADOR: iniciador o primer, es una cadena de ácido nucleico o de una molécula que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3’ hidroxilo libre que forma pares de bases con una hebra molde complementaria y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

CUELLO DE BOTELLA: breve reducción del tamaño de una población que ocasiona, generalmente, deriva genética aleatoria.

DENDOGRAMA: diagrama ramificado que muestra mediante líneas en forma de U una jerarquía de categorías u objetos basada en el grado de semejanza o en número de caracteres compartidos. La longitud de cada rama en U representa, a veces, la distancia que separa los dos objetos conectados.

ELECTROFORESIS: técnica para separar en un gel, mediante un campo eléctrico, las moléculas de acuerdo con el tamaño y la carga neta que poseen.

GEN: unidad básica, tanto física como funcional de la herencia, que transmite información de una generación a la siguiente. Es un segmento de ADN que incluye una sección transcrita y un elemento regulador que permite su transcripción.

GENOMA: conjunto de todos los genes de un organismo, de todo el patrimonio genético almacenado en el conjunto de su ADN o de sus cromosomas.

MARCADOR: ubicación física identificable en un cromosoma cuya herencia puede rastrearse.

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la diversidad genética de *Anadara tuberculosa* en cinco zonas de La Ensenada de Tumaco utilizando como marcador molecular mitocondrial el Citocromo Oxidasa subunidad I (COI). En total se utilizaron 50 individuos de las islas de manglar San Jorge, La Tiburonera, El Pajal, La Playa y Bajito Vaquería, se tomaron 10 ejemplares al azar de cada zona. La muestra de tejido se fijó en tubos con alcohol absoluto. Se extrajo ADN con kit para extracción de ADN de bivalvos. Posterior a ello se amplificó el ADN mitocondrial mediante la técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) con kit de caracterización de bivalvos. Paralelamente se estandarizó la extracción de ADN a partir de tejido con protocolo de alcoholes y luego se estandarizó el protocolo de PCR para *A. tuberculosa*. Los productos de PCR amplificados y cuantificados se enviaron a Macrogen Corea donde se secuenció por ambos lados cada muestra. Una vez se obtuvo las secuencias, se editó cada una con el programa BioEdit y luego de hacer el complemento del reverso se alinearon con el programa Mega4.

Posteriormente, se midió los parámetros de la diversidad genética, diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica, desviación estándar y varianza con el programa DnaSp. Con el mismo programa se elaboró el análisis de distribución entre pares de frecuencias (*Mistmach distribution)* y se estimó el estadístico $F_s$ de Fu. Finalmente se efectuó el análisis de variación nucleotídica y la estructura poblacional mediante un AMOVA con el programa ARLEQUIN.

Los resultados indican que la diversidad haplotípica reportada para todas las poblaciones fue alta (0.683 ± 0.060) y para cada población estudiada iguales a; San Jorge 0.943 ± 0.040, La Tiburonera 0.859 ± 0.063, El Pajal 0.879 ± 0.058, La Playa 0.882 ± 0.052 y Bajito Vaqueria 0.962 ± 0.040. Por otro lado, la diversidad nucleotídica reportada fue baja para todas las poblaciones (0.03999 ± 0.01954) y para cada población estudiada San Jorge 0.0127 ± 0.0033, La Tiburonera 0.0142 ± 0.0026, El Pajal 0.0956 ± 0.0662, La Playa 0.0078 ± 0.0010 y Bajito Vaqueria 0.1029 ± 0.0621.

Los resultados del análisis molecular de varianza (AMOVA) indican que la varianza entre poblaciones es baja (4.20) y la varianza dentro de las poblaciones es alta (95.80). El índice de fijación Fst fue de 0.04201, valor que permite concluir que las poblaciones estudiadas no se encuentran estructuradas.

## ABSTRACT

The present study aimed to study the genetic diversity of *Anadara tuberculosa* in five areas of La Ensenada de Tumaco using molecular marker mitochondrial Cytochrome Oxidase subunit I (COI). In total 50 individuals were used mangrove islands San Jorge, La Tiburonera, The Pajal, La Playa and Shorty Vaquería, 10 specimens were taken randomly from each area. The tissue sample was fixed in absolute alcohol tubes. Genomic DNA was extracted with DNA extraction kit bivalves. Subsequent to this mitochondrial DNA was amplified by PCR (polymerase chain reaction) with bivalve characterization kit. Was standardized parallel DNA extraction from tissue alcohols protocol, then standardized PCR protocol for *A. tuberculosa*. PCR products were amplified and quantified sent Macrogen Korea where sequenced on both sides each sample. Once obtained sequences were edited with the program BioEdit and then do the reverse complement, were aligned with the program MEGA4.

Subsequently measured parameters genetic diversity, haplotype, nucleotide diversity, standard deviation and variance DnaSP program. With the same analysis was performed program distribution between pairs of frequencies (*Mistmach distribution*) and estimated Fu Fs statistic. Finally, we performed the analysis of nucleotide variation and population structure by AMOVA in ARLEQUIN program.

The results indicate that reported haplotype diversity for all populations was high (0.683 ± 0.060) and for each study population equal to: San Jorge 0.943 ± 0.040, 0.859 ± 0.063 La Tiburonera, El Pajal 0.879 ± 0.058, La Playa 0.882 ± 0.052 and Bajito Vaquería 0.962 ± 0.040. Moreover, the reported nucleotide diversity was low for all populations (0.03999 ± 0.01954) and for each population studied San Jorge 0.0127 ± 0.0033, La Tiburonera 0.0142 ± 0.0026, El Pajal 0.0956 ± 0.0662, La Playa 0.0078 ± 0.0010 and Bajito Vaqueria 0.1029 ± 0.0621.

The results of molecular analysis of variance (AMOVA) indicate that the variance between populations is lower (4.20) and the variance within the population is high (95.80). The fixation index Fst was 0.04201, a value that allows us to conclude that the populations studied are not structured.

# 1. INTRODUCCIÓN

Según Piñero[1], la diversidad genética o variabilidad genética es el componente básico de la biodiversidad comprendiendo las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre poblaciones dentro de una especie. Asimismo, su conocimiento y comprensión es de vital importancia tanto para la conservación y el avance de la genética evolutiva, como para la salud pública, la sustentabilidad y la productividad agrícola, pecuaria, pesquera y forestal.

De este modo, evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies ante los cambios ambientales naturales o provocados por actividades humanas; así como evaluar los riesgos de la pérdida de especies, poblaciones y recursos genéticos; y conocer las causas de la pérdida de la diversidad genética; permite que la diversidad genética se convierta en una herramienta indispensable para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad.

Por otro lado, las personas que sobreviven de la extracción de *A. tuberculosa* han notado una preocupante disminución de la población de esta especie, la causa principal es la alta demanda del mercado internacional y la falta de conciencia al respetar la talla comercial. Diferentes estudios han sido encaminados a la instalación de encierros en los manglares, otras investigaciones a la producción en cautiverio, demostrando que esta especie tiene un bajo crecimiento y baja sobrevivencia de larvas en sistemas confinados.

Por otra parte, según Sperling, *et al*.[2], el ADN mitocondrial ha sido ampliamente utilizado como marcador molecular, su condición haploide, herencia matrilineal, altas tasas de evolución y la presencia de regiones conservadas y variables, facilitan la tipificación molecular de individuos y su uso para diferenciación de los mismos a diferentes escalas taxonómicas.

---

[1] PIÑERO, Daniel. La diversidad genética como instrumento para la conservación y aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. En: Capital natural de México [online], 2008. vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México. [citado 4 de febrero de 2013] p. 438. Disponible en internet: < http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/biblioteca/ArtsLab/Pinero-etal_2008_EstudioPais2.pdf>

[2] SPERLING, Felix; GAIL, Anderson and HICKEY, Donald. A DNA-Based Approach to the Identification of Insect Species Used for Postmorten Interval Estimation [online]. In: JOURNAL OF FORENSIC SCIENCES. ASTM International. 1994. vol. 39 no. 2 [cited 10 February 2013]. p 419. Available from internet: <http://library-resources.cqu.edu.au/JFS/PDF/vol_39/iss_2/JFS392940418.pdf>

En vista de lo anterior, para estimar la diversidad genética de *A. tuberculosa* en el presente estudio se utilizó como marcador molecular el COI. A continuación se indica detalladamente el procedimiento que se llevó a cabo para obtener ADN de esta especie, la amplificación por PCR, el análisis de las secuencias obtenidas y los resultados a partir de ellas.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las estadísticas de pesca indican una notable disminución en la densidad de *A. tuberculosa* en los manglares, asociada principalmente a la oferta natural y a la extracción por parte del hombre tanto para el sustento alimentario como para satisfacer la demanda del mercado nacional e internacional, principalmente por parte de Ecuador. Lo anterior sumado a fenómenos naturales y antrópicos como el régimen hidrológico, el incremento de las temperaturas del agua, la contaminación por hidrocarburos, la disminución de la salinidad por sobre lavado y la descarga de grandes volúmenes de desechos; han desencadenado una problemática de importancia nacional dada la significancia ambiental y económica de este recurso en la zona.

Este individuo ha sido reportado en el libro rojo de invertebrados de Colombia como una especie vulnerable, principalmente por la alta extracción. Actualmente existe desconocimiento de la diversidad genética de la especie *A. tuberculosa* en la Ensenada de Tumaco y se ve la necesidad de evaluarla, como herramienta indispensable para la conservación y aprovechamiento de la biodiversidad.

# 3. OBJETIVOS

## 3.1. GENERAL

Evaluar la diversidad genética en cinco zonas de muestreo de Piangüa (*Anadara tuberculosa*) en la Ensenada de Tumaco, Colombia.

## 3.2. ESPECÍFICOS

**3.2.1.** Estandarizar el protocolo de extracción de ADN a partir de una muestra de tejido muscular.

**3.2.2.** Caracterizar genéticamente las poblaciones usando el gen Citocromo Oxidasa 1 (COI).

**3.2.3.** Estimar las medidas de diversidad y estructura genética, considerando los parámetros de diversidad haplotípica, nucleotídica, desviación estándar y varianza en las poblaciones de estudio.

# 4. MARCO REFERENCIAL

## 4.1. GENERALIDADES DEL ORGANISMO DE ESTUDIO

**4.1.1. Taxonomía.** Según Turgeon, *et al.* [3], la especie de estudio pertenece al reino *Animal*, filo *Moluscos*, clase *Bivalvos* (Linnaeus, 1758), subclase *Pteriomorphia* (Beurlen, 1944), orden *Arcoida* (Stoliczka, 1871), familia *Arcidae* (Lamarck, 1809), género *Anadara* (Gray, 1847) y especie *Anadara tuberculosa* (Sowerby GBI, 1833).

**4.1.2. Distribución geográfica.** *A. tuberculosa* se distribuye en el pacifico oriental, en américa del norte y en el océano atlántico occidental[4]. En el Pacífico colombiano se encuentra en las regiones Pacífico Norte, Baudó, Buenaventura, Naya, Sanquianga y Tumaco[5,6]. Vive casi completamente enterrado en el fango, desde la zona inter-mareal hasta unos 5 metros de profundidad y es abundante en pantanos de manglares.

**4.1.3. Ciclo de vida.** Los resultados obtenidos por Borda y Cruz[7], así como los aportados por otros autores sobre la biología del género y de otras especies, les permitió presentar un esquema del ciclo de vida de la piangüa (*A. tuberculosa*) como se indica en la Figura 1.

[3] TURGEON, D.; QUINN, J. F.;. BOGAN, A. E; COAN, E. V.; HOCHBERG, F. G.; LYONS, W. G. *et al.* Common and scientific names of aquatic invertebrates from the United States and Canada: Mollusks, 2nd ed. In: American Fisheries Society Special Publication 26 [online]. 1998. p. 526. Available from internet: <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=567221&print_version=PRT&source=to_print>

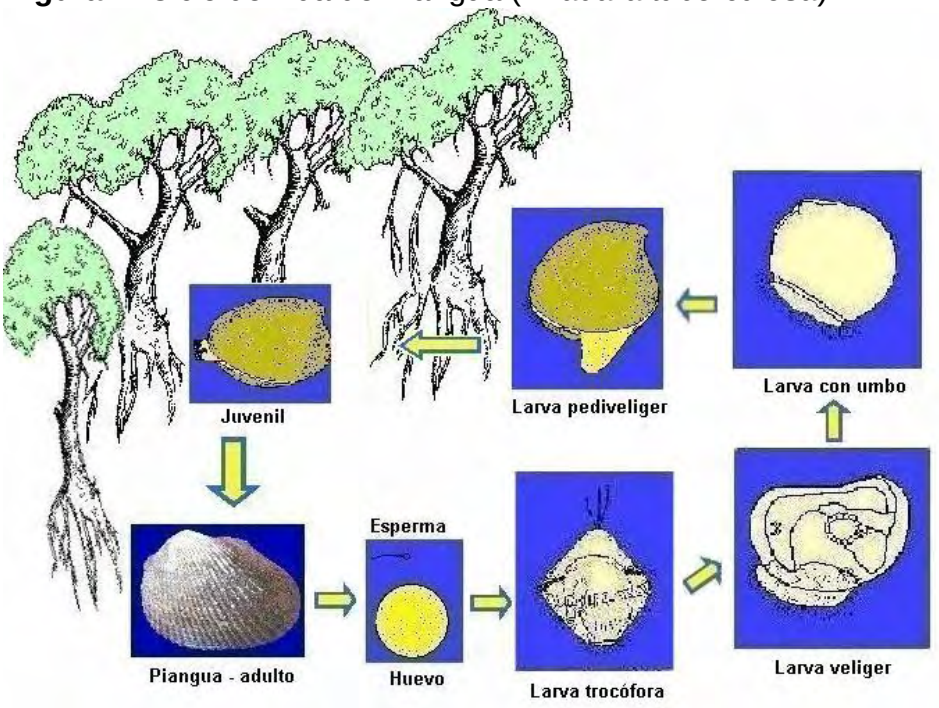
[4] Ibid., p. 526.

[5] OCAMPO, Patricia y CANTERA, Jaime. Moluscos asociados a los principales ecosistemas de la ensenada de Utría, Pacífico colombiano. En: Memorias VI Seminario Nacional de Ciencia y Tecnología Marina. Comisión colombiana de Oceanografía. Colombia [online]. 1988. 87-92 pp.

[6] ÁLVAREZ LEÓN, Ricardo y BRAVO PAZMIÑO, Hernando. Moluscos y crustáceos asociados a los manglares del Pacífico colombiano y aprovechados por las comunidades negras. Proyecto Conservación y manejo para el uso múltiple y el desarrollo de los manglares en Colombia. Informe técnico No 29. Ministerio del Medio Ambiente ACOFORE-OIMT. Bogotá. 1998.

[7] BORDA, Carlos y CRUZ, Raúl. Pesca artesanal de bivalvos (*Anadara tuberculosa* y *A. similis*) y su relación con eventos ambientales del Pacífico colombiano. En: Revista de Investigación Marina [online]. 2004. vol. 25 no 3. p. 198.

**Figura 1.** Ciclo de vida de Piangüa (*Anadara tuberculosa*).




Fuente: BORDA y CRUZ, 2004.

La hembra y el macho liberan los productos sexuales al agua donde ocurre la fertilización. Luego el óvulo inicia la división celular, pasadas seis horas se forman los cilios comenzando a dar movimiento en la columna de agua, estadio conocido como larva trocófora, fase que dura aproximadamente un día.

El desarrollo continua con la fase llamada larva “D” o veliger de charnela recta, la cual dura entre 7 y 10 días. Luego sigue la fase de larva con umbo que dura de 3 a 5 días. La siguiente fase es la larva oculada o pediveliger donde permanece en la columna de agua de 13 a 15 días. Las larvas son planctónicas y su desarrollo transcurre entre 23 y 31 días en aguas oceánicas.

La larva pediveliger inicia el asentamiento en las áreas de manglar, con ayuda de las corrientes y de los cambios de marea. Después del asentamiento la post-larva presenta una talla de 5.5 mm, dura entre 4 y 11 días. En esta fase se presenta un pequeño lapso en el cual se fijan a un sustrato, para luego liberarse y vivir aisladamente. Los juveniles presentan tallas entre 16 y 30 mm, se calcula que esta fase dura 6 meses. Cuando llegan a la talla de la primera reproducción (44 mm de longitud) se consideran adultos.

**4.1.4. Importancia económica de *A. tuberculosa* en Colombia.** Como informa Espinoza, *et al*. [8],La piangüa sostiene una de las principales pesquerías artesanales de la zona costera en la región del pacífico nariñense constituyendo una importante fuente de proteína para las comunidades humanas del litoral y sus volúmenes de extracción han dependido tanto de las necesidades de abastecimiento familiar como del comercio local.

Según McKenzie[9], la deforestación del manglar y las altas tasas de explotación han llevado a las poblaciones naturales de piangüa a situaciones críticas en países como El Salvador, Honduras y Ecuador. La colecta no regulada constituye la principal amenaza a la especie en todos los países de la región donde es fuertemente explotada.

Espinosa, *et al*. [10], indican que "en el Pacífico colombiano, *A. tuberculosa* está ligada al consumo tradicional de las comunidades afro-descendientes que se asientan en las márgenes de los bosques de manglar y es el principal recurso de la pesquería de moluscos, una actividad de extracción exclusivamente artesanal efectuada principalmente por mujeres y niños, aunque en los últimos años se ha presentado una gradual incorporación de hombres que ven en la extracción de ese recurso una oportunidad para aumentar los ingresos familiares". Por otro lado, de acuerdo con la WWF[11], aproximadamente 30.000 familias de estratos económicos 1 y 2 se dedicaban a esta actividad económica en 2004.

"Si bien ha existido un aprovechamiento tradicional de la piangüa en la región basado principalmente en el autoconsumo, la demanda comercial del recurso ha aumentado en las últimas décadas, especialmente por parte del Ecuador. Esto ha provocado una mayor e incontrolada captura de *A. tuberculosa*, especialmente en la parte sur del país, estimándose que anualmente se extraen más de 300 millones de unidades solamente en los siete municipios costeros de Nariño"[12].

[8] ESPINOSA, Silvana; DELGADO, Maria Fernanda; OROBIO, Bernardo; MEJÍA, Luz Marina y GIL-AGUDELO, Diego. Estado de la población y valoración de algunas estrategias de conservación del recurso piangüa *Anadara tuberculosa* (Sowerby) en sectores de Bazán y Nerete, costa pacífica nariñense de Colombia. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras 2010 [online]. vol. 39 no 1. p 161. Disponible en internet: < http://www.scielo.org.co/pdf/mar/v39n1/v39n1a09.pdf>

[9] MacKENZIE, Clyde. The fisheries for mangrove cockles, *Anadara* spp., from Mexico to Peru, with descriptions of their habitats and biology, the fishermen's lives, and the effects of shrimp farming. In: Marine Fisheries Review 2001 [online]. vol. 62 no. 1. pp 1-39. Available from internet: < http://spo.nwr.noaa.gov/mfr631/mfr6311.pdf>

[10] ESPINOSA *et. al.* Op. Cit. p 162.

[11] World Wrestling Federation. Diagnostico socioeconómico del sector piangüero y estado actual del recurso hidrobiológico Piangüa *Anadara tuberculosa* en la costa pacífica de Nariño. Fondo Mundial para la Naturaleza WWF, Cali. 2005. p. 25.

[12] WWF. Ibid. p. 27.

Estadísticas de pesca puntuales indican que en la década de los años 70 del siglo pasado, las capturas eran de aproximadamente 100 ton/año[13], alcanzando en 2004 3.283 ton/año en el área de Tumaco[14]. Este importante aumento en la explotación plantea una problemática asociada a la oferta natural del recurso, a la pesquería y a las comunidades que obtienen el sustento diario de esa actividad[15].

González[16] en su estudió muestra una reducción en la captura de 800 individuos/persona/faena entre 1960 y 1970, a sólo 140 individuos/persona/ faena en 2005. Por éstos y otros indicios de disminución en sus poblaciones, *A. tuberculosa* fue incluida en el Libro Rojo de Invertebrados Marinos de Colombia como especie amenazada en la categoría Vulnerable en el libro rojo de invertebrados de Colombia[17].

**4.1.5. Extracción y recolección de moluscos.** En el Departamento de Nariño, los grupos de mujeres concheras, trabajando en sus núcleos familiares se desplazan a potrillo por los esteros aledaños a sus caseríos y obtienen día a día los recursos de su subsistencia. En general, desde la frontera con Ecuador hasta Buenaventura, las mujeres negras de los departamentos de Nariño, Cauca y Valle del Cauca han configurado una extensa red que, con intensidad, trabaja en la extracción de la Piangüa con destino al mercado ecuatoriano. "En el sur de la costa pacífica colombiana, son más evidentes los conflictos generados por el ingreso de mujeres ecuatorianas a territorio colombiano para la explotación de los manglares y por la competencia ocasionada por la venta de un recurso cada día más escaso"[18].

[13] ARTUNDUAGA, E. y MORA, O. Diagnóstico sobre la pesca industrial y artesanal en el Pacífico colombiano. En: Conservación y Uso sostenible de los manglares del pacífico colombiano 1998. Ministerio de Medio Ambiente, Revista Divulgación Pesquera 1975 vol. 5 no. 5. Colombia. p. 50.

[14] BORDA y CRUZ. Op. cit. p. 197.

[15] ESPINOSA, S., L. A. ZAPATA, C. CANDELO, M. X. ZORRILLA, ARTEAGA, G., DELGADO, M. F., OROBIO, B. y GIL-AGUDELO D. L. Diagnóstico de especies amenazadas: Estado actual de las poblaciones de piangüa *Anadara tuberculosa* en la costa pacífica colombiana. 261-268. En: Informe del Estado de los Ambientes Marinos y Costeros en Colombia: 2006. Serie de Publicaciones Periódicas No. 8, Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR, Santa Marta. 2007. p. 378.

[16] GONZÁLEZ, J. Reglas de manejo, percepciones y estado del recurso piangua (*Anadara tuberculosa*): caso ASCONAR. Informe técnico ASCONAR, Tumaco, Colombia. 2006. 89 p.

[17] ARDILA, Nestor y DÍAZ, Juan Manuel. *Anadara tuberculosa*, 96 - 98. En N. Ardila, G. R. Navas, y J. Reyes (Eds.). 2002. Libro rojo de los invertebrados marinos de Colombia. INVEMAR. Ministerio del Medio Ambiente. La serie Libros rojos de especies amenazadas de Colombia. Bogotá, Colombia. p 96.

[18] BRAVO PAZMIÑO, Hernando; SANCHEZ, Heliodoro; ALVAREZ-LEON, Ricardo; GUEVARA, Omar Ariel; ZAMORA, Alejandro y RUBIANO, Diego José. Diversidad cultural y manglares del Pacífico colombiano. Bogotá, Ministerio del Medio Ambiente, Asociación Colombiana de. 1998. p. 360.

Aunque no hay diversas artes de pesca, la faena de recolección de moluscos, sobre todo de los bivalvos conocidos como “piangüas”, exigen una alta especialización del recolector, por los hábitos de las especies y las condiciones de las zonas de pesca[19].

En la Ensenada de Tumaco se da una de las más importantes experiencias organizativas de distintos grupos de mujeres concheras pertenecientes a caseríos de la zona. La Asociación de Concheras de Nariño, ASCONAR, se constituyen en una organización pionera del trabajo de consolidación social y rehabilitación de la labor de las mujeres. Es preocupante en el momento, la sensible disminución de la producción obtenida por parte de cada una de las concheras y la dificultad para mantener un comercio continuado del producto. Conviene reconocer que la problemática de las concheras de la Ensenada de Tumaco se hace cada vez más compleja, mucho más cuando a su escenario de trabajo hacen presencia grupos más y más numerosos.

La ubicación de los bancos de piangüa determina el sitio de los asentamientos humanos y que al agotarse el recurso, el poblado recolector deberá cambiar su radicación y buscar nuevos bancos, generando así un patrón de asentamiento migratorio. Es preciso señalar que la apropiación existente de estas zonas de manglar pone en evidencia un manejo tradicional de las relaciones con el medio natural[20].

Las faenas de recolección de las concheras se realizan de manera rotativa en esteros como: La travesía, Chapilar, San Luís, Tap’e coco, El Bagrero, Del Medio, Guandarajo, Los Sábalos, en los alrededores de La Ensenada de Tumaco[21].

"Aunque es reconocida la sobre-explotación de este recurso, en el país es igualmente evidente la problemática de la piangüa en relación con su hábitat. En San Juan de la Costa (Departamento de Nariño) hay evidencias de la disminución de la piangüa y sus pobladores lo atribuyen a la llegada de gente foránea, especialmente del Ecuador, que causan un rápido deterioro del ambiente al extraer la Piangüa arrancando y sustrayendo las raíces de los mangles”[22].

[19] PRAHL, Henry; CANTERA, Jaime y CONTRERAS, Rafael. Manglares y hombres del Pacífico. Fondo FEN Colombia. Editorial Presencia, Bogotá, Colombia. En: Revista de Investigación Marina 1990. p. 198.
[20] PRAHL *et al.* Ibid. p. 111.
[21] BRAVO PAZMIÑO, *et al*. Op. cit. p. 126.
[22] ARDILA C. L. y CANTERA, R. Diagnóstico de la pesca artesanal de moluscos en algunas regiones del Pacífico Colombiano. En: Simposio Internacional de los Recursos Vivos y las Pesquerías en el Pacífico Sudeste, Viña del Mar. Chile, 1989. p. 397.

Por otra parte, en Salahonda, las concheras señalan que "los grupos de mujeres procedentes de distintos lugares de la Ensenada de Tumaco, vienen alterando los bosques de manglar y las condiciones para la reproducción del recurso. Estas llamadas concheras "maleteadas" están construyendo "picas" entre el bosque de manglar, que son senderos limpios de vegetación para facilitar su desplazamiento entre el bosque, con el agravante de provocar la disminución del hábitat disponible y por ende del recurso"[23].

**4.1.6. Factores que han afectado el ecosistema de manglar a través del tiempo.** En los bosques húmedos tropicales del Pacífico colombiano, la interacción de diferentes factores del medio ambiente, principalmente los climáticos y edáficos, contribuyen a que su composición, estructura y diversidad sea muy compleja y variada. Los ecosistemas de manglar de las costas colombianas han sufrido graves deterioros debidos a problemas relacionados con los cambios de su régimen hidrológico natural. Aspectos como el incremento de la temperatura en las aguas por factores antrópicos y la disposición directa de ellas a los manglares o a sus aguas de inundación, de residuos sólidos y líquidos de origen industrial y residencial, o por accidentes en su transporte, también han sido considerados como impactos directos sobre las áreas de estos ecosistemas, favoreciendo su degradación[24].

Prahl *et al.*[25], señalan que dentro de los tensores más letales se encuentra la contaminación por hidrocarburos, en especial el petróleo. Ejemplos de tales derrames en el pacífico han sido el hundimiento del buque petrolero "Saint Peter" en el municipio de Tumaco Nariño en 1978. En 1996, una pérdida de petróleo en el sistema de cargue de este mismo puerto, permitió la liberación de petróleo que afectó las áreas circunvecinas y principalmente a las especies que allí habitaban y finalmente otro de los ejemplos es el que sucedió en junio-julio de 1998 que se conoció como la contaminación de los manglares del departamento de Nariño, a causa de una mancha de petróleo proveniente de un derrame sucedido en el Ecuador. En la costa pacífica, una modificación, significativa del régimen fluvial en diversos sectores, afecta los manglares del departamento de Nariño. La construcción de un canal en el río Patía para la extracción de madera (canal Naranjo), ha provocado desde hace varios años el desbordamiento de las aguas del río Patía al río Sanquianga, causando sobre-lavado en los manglares y disminución de la salinidad de las aguas e inundaciones más frecuentes.

De igual forma, el cambio de uso del suelo, por la construcción de estanques para el cultivo de camarón y proyectos urbanísticos han afectado las aguas que llegan a los manglares, por la mezcla con aquellas de carácter residual.

[23] ARDILA y CANTERA. Ibid. p. 398.
[24] PRAHL *et al*. Op.Cit. p. 115.
[25] Ibid., p. 120.

En la ensenada de Tumaco, los mayores problemas de contaminación marina se presentan por la descarga de grandes volúmenes de desechos[26].

Los manglares sufren otros impactos de tipo antrópicos y naturales, entre los cuales se encuentra la tala para aprovechamiento forestal y la adecuación de canales de comunicación entre los esteros y áreas para el cultivo del camarón. La problemática de la piangüa y el manglar es un tema de prioridad para el país dada la significancia ambiental y económica de estos recursos en la zona. Sin embargo, siguen siendo insuficientes las iniciativas para aportar soluciones a esta problemática.

## 4.2. GENERALIDADES DE LOS MARCADORES MOLECULARES

De acuerdo con Astorga[27], los marcadores moleculares corresponden a un conjunto de técnicas que permiten visualizar o indicar la presencia de variantes alélicas, producto de algún tipo de mutación establecida en las poblaciones a través del tiempo evolutivo. Esta variación genética detectada es conocida como polimorfismo y es lo que nos permite separar grupos, poblaciones, cepas, especies o grupos taxonómicos mayores.

De acuerdo con la misma autora[28] el objetivo de la obtención de marcadores moleculares es establecer variantes polimórficas que nos permitan discriminar entre grupos de estudio al nivel que este sea necesario. Estas medidas nos permiten obtener una marca que diferencia un grupo de otro. Existen varios tipos de marcadores moleculares como lo son: RFLP (*Restriction fragment length polymorphic*); PCR-RFLP; RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*)*;* AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*)*;* Microsatélites SSR (*Simple sequence repeats*); Secuenciación, el ADN puede clasificarse como ADN nuclear o ADN mitocondrial; SNP (*Single nucleotide polymorphism)* y EST (*Expressed sequence tags*). En la Figura 2 se hace referencia a características de los tipos de marcadores moleculares.

[26] MOSQUERA, A. I. La contaminación orgánica, un posible precursor de la eutroficación en aguas de la Ensenada de Tumaco. Vol 2. PP. 1067-1083. En: VII seminario Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar. Santa Marta. Colombia. 1992. p. 1067.

[27] ASTORGA, Marcela. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. En: LOVATELLI, A., FARÍAS, A. y URIARTE, I. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. Puerto Montt, Chile. 2008. p. 277.

[28] Ibid., p. 278.

**Figura 2.** Características de los diferentes tipos de marcadores moleculares.

| Tipo | Variabilidad | Herencia | Genoma | Reproducibilidad | Costo |
|---|---|---|---|---|---|
| RFLP | Media | Codominante | Completo | Alta | Medio |
| PCR-RFLP | Media | Codominante | Parcial | Alta | Medio |
| RAPD | Alta | Dominante | Completo | Baja | Bajo |
| AFLP | Alta | Dominante | Completo | Media | Medio |
| Microsatélites | Alta | Codominante | Parcial | Alta | Medio |
| Secuenciación | Media | Codominante | Parcial | Alta | Alto |
| SNP | Alta | Codominante | Parcial | Alta | Alto |
| EST | Media | Codominante/Dominante | Parcial | Alta | Alto |

Fuente: Astorga, 2008.

**4.2.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).** De acuerdo con Rodríguez y Barrera[29], la PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores. La amplificación se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN.

**4.2.1.1. Componentes de la reacción de PCR.** Los mismos autores[30] señalan que para realizar una PCR se necesita mezclar en un tubo el ADN que contiene la secuencia a amplificar, dos cebadores que se alinearán a las cadenas simples del ADN, la mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) en cantidades suficientes, el tampón de reacción para la polimerasa, agua ultra pura para completar el volumen final de reacción (entre 20 y 100 µl), y como ingrediente final crucial para la reacción, la enzima ADN polimerasa termoestable. A continuación se describe cada componente.

La solución amortiguadora para la reacción se emplea por lo general a diez veces y por lo general incluye Tris-HCl (pH =8,4 a temperatura ambiente), KCl, gelatina y $MgCl_2$.

Tanto el ion magnesio como el manganeso tienen una función crítica en la reacción, requiriéndose a una concentración que oscila regularmente entre 0,5 y 2,5 mM. La concentración de magnesio debe optimizarse para cada ensayo en particular. Las concentraciones insuficientes de magnesio dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas.

Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP; distinguibles por sus bases nitrogenadas) son los ladrillos con los que se construyen las nuevas cadenas de ADN. Pueden captar iones de magnesio por lo que las concentraciones de

[29] RODRIGUEZ, Iram Y BARRERA, Hugo. La reacción en la cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. En: Ciencia UANL. Julio – Septiembre 2004. vol. 7, no. 3, p. 324.
[30] Ibid., p. 325

ambos componentes deben guardar siempre la misma relación, por lo general la concentración de magnesio es de 0,5 a 1 mM superior a la concentración de dNTPs. La variación en su concentración afecta la especificidad y fidelidad de la reacción. La concentración más utilizada es de 0,2 a 1 mM.

Los cebadores o iniciadores son el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo de PCR. Su longitud suele estar entre 18 y 30 nucleótidos y su contenido en G + C entre 40 y 75%. La concentración a la que suelen emplearse es de 0,1 – 0,5 µM. Ambos iniciadores deben tener una temperatura de fusión semejante en G + C, la fórmula más utilizada para calcular la Tm de un iniciador es: Tm = (2°C) (# de A + T) + (4°C) (# de G + C). Estos iniciadores no deben ser complementarios entre sí, para que no hibriden entre ellos. Y deben flanquear los extremos de la porción de ADN que se desea amplificar, debiendo de formar puentes de hidrógeno con dicho ADN a ambos lados de la región de interés.

En cuanto a la enzima, solo pueden utilizarse polimerasas que sean capaces de actuar a las altas temperaturas empleadas en la reacción. Dos enzimas de uso muy extendido son la ADN polimerasa *Taq,* proveniente de la bacteria termofílica *Thermus acuaticus* y la *Vent* de la bacteria *Thermococcus litoralis.* Sus temperaturas óptimas oscilan entre 72°c, temperatura a la cual incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, siendo estable a altas temperaturas, incluso por encima de 92°C.

La cantidad de ADN molde puede ser tan solo 1 ng en caso de material genético clonado (virus o plásmidos), o de un mínimo de 20 ng, cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas.

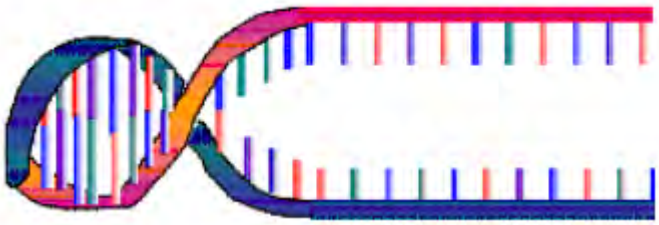
El agua se usa como solvente del resto de los ingredientes y se requiere al menos destilada.

**4.2.1.2. Etapas de un ciclo de reacción.** Según Rodríguez y Barrera[31], tres son los pasos a seguir y a repetir por cada ciclo de la PCR. A éstos comúnmente se les refiere como desnaturalización, alineamiento y extensión. Cuando se trabaja con ADN genómico se agrega una etapa previa de desnaturalización a 94°C, para relajar las posibles estructuras secundarias y de otros tipos. Después de concluida esta, se repiten los diferentes ciclos en los que tanto la temperatura como el tiempo serán específicos del producto a amplificar y del origen del ácido nucleico que servirá de molde a copiar por la polimerasa utilizada.

[31] Ibid., p. 227

La primera etapa es la desnaturalización consiste en la separación de las cadenas del ADN mediante un calentamiento a 94 °C como se observa en la Figura 3. Para asegurar que la desnaturalización se lleve a cabo en todo el ADN se incuba a 94 °C por cinco minutos.

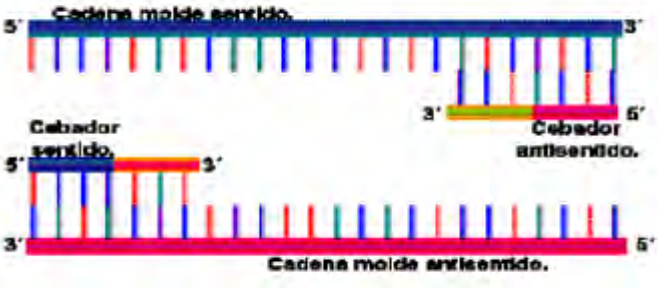
**Figura 3**. Desnaturalización del ADN. Los puentes se rompen dejando al ADN en forma de cadena sencilla, permitiendo así exponer las diferentes bases nitrogenadas para la hibridación con los oligonucleótidos cebadores.



Fuente: RODRIGUEZ y BARRERA, 2004.

La segunda etapa es el alineamiento o hibridación, en esta etapa los cebadores complementarios se enlazan formando puentes de hidrógeno. La enzima, como todas las ADN polimerasas, necesita del grupo $OH^-$ libre en el extremo 3' del iniciador ya apareado al sitio blanco de la amplificación, a partir de donde iniciar la síntesis. Este punto constituye el sitio de crecimiento de la cadena complementaria al molde. Mientras que un cebador (referido como 5' o sentido) es complementario a la secuencia del extremo 5' de la región del ADN molde a amplificar, al otro el extremo 3' de la misma, pero en la cadena opuesta como se observa en la Figura 4. El alineamiento específico de ambos cebadores se produce a una temperatura determinada por composición de bases y oscila entre 40 y 72 °C ambas cadenas originales del ADN sirven simultáneamente como moldes para sintetizar sus respectivas cadenas complementarias nuevas.

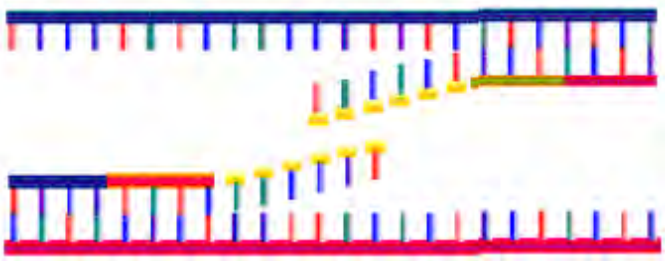
**Figura 4**. Alineamiento del ADN. Inicio de la reacción de la PCR. Los cebadores complementarios que flanquean el sitio a amplificar se enlazan formando puentes de hidrógeno. De esta manera la polimerasa puede comenzar a extenderlos para copiar ambas hebras molde.




Fuente: Adaptada RODRIGUEZ y BARRERA, 2004.

La tercera etapa es la extensión o elongación, con el ADN molde de la cadena sencilla, excepto en los sitios donde los iniciadores se aparean, la polimerasa empieza a copiar la hebra, incorporando desoxirribonucleótidos monofosfatos en dirección 5' → 3' como se observa en la figura 5. Esta etapa debe realizarse a una temperatura alta, que es la que coincide con la máxima actividad de la polimerasa (72 °C) para evitar alineamientos inespecíficos de los iniciadores. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación. Al finalizar todos los ciclos se realiza un último alargamiento por 5 minutos a 72 °C, para asegurarse que todos los productos de amplificación estén completamente terminados.

**Figura 5**. Etapa de elongación. Progreso de la reacción de la PCR. A la temperatura óptima de la ADN Polimerasa *Taq* (72°C), la enzima agrega los dNTPs a partir del 5' hacia el extremo 3'.



Fuente: Adaptada RODRIGUEZ y BARRERA, 2004.

**4.2.2. Aplicación de marcadores moleculares en estudios acuícolas.** De acuerdo con Astorga[32], la aplicación de los marcadores moleculares se puede entender en base a las siguientes problemáticas que permite resolver en acuicultura: medición de la variabilidad genética usando marcadores moleculares, asignación de paternidad, parentesco o procedencia, identificación de especies y cepas (*barcoding*), trazabilidad, identificación de loci de caracteres cuantitativos (QTL: *quantitative straits loci*), selección asistida por marcadores moleculares (MAS*: Marker assisted selection*) y expresión génica.

**4.2.3. Importancia del uso de marcadores moleculares en la estimación de diversidad genética.** Según Godoy[33], la presencia de la genética y los marcadores moleculares en la ecología y la biología evolutiva no ha dejado de crecer en las últimas décadas y la biología de la conservación no ha sido una excepción. Por un lado, estudios teóricos, experimentales y empíricos han documentado los cambios genéticos que las poblaciones sufren como consecuencia de la fragmentación y el declive, y han confirmado las

[32] ASTORGA. Op. Cit., p. 281.

[33] Godoy J.A. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. En: Ecosistemas, enero 2009 [online]. vol. 18 no.1. 2009. p. 22. Disponible en internet: <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=593> ISSN 1697-2473

consecuencias negativas que éstos pueden tener para la viabilidad poblacional y la evolución adaptativa.

La aplicación de marcadores moleculares y la rica teoría evolutiva aporta información sobre la historia evolutiva, la demografía, la ecología y el comportamiento de las especies que puede ayudar en la evaluación de riesgos, la asignación de prioridades, la delimitación de unidades y el diseño de estrategias de conservación eficaces. Además, las técnicas moleculares aportan métodos para la asignación de muestras a especies, poblaciones o individuos y para la identificación de sexo que, sobre todo cuando se combinan con materiales obtenidos de manera no invasiva, aportan herramientas eficientes para la conservación y la gestión de especies amenazadas.

Según la FAO[34], la información sobre la diversidad genética es esencial para optimizar las estrategias de conservación de los recursos. Las nuevas herramientas moleculares permitirán la identificación de genes implicados en un conjunto de caracteres, incluyendo los caracteres adaptativos. Los marcadores de ADN son útiles tanto en la investigación básica como en la aplicada. La diversidad entre organismos es consecuencia de las diferencias en las secuencias de ADN y de los efectos ambientales. Las variaciones en el ADN son mutaciones resultantes de la sustitución de un solo nucleótido (polimorfismos de un solo nucleótido − SNP), inserción o deleción de fragmentos de ADN de diversas longitudes (desde uno a varios miles de nucleótidos), o duplicación o inversión de fragmentos de ADN.

Evaluar la diversidad genética de las especies en peligro, sopesar los posibles riesgos de naturaleza genética y valorar la oportunidad de acciones de manejo que permitan maximizar la primera y minimizar los segundos son objetivos importantes y asumidos en la genética de la conservación. Los marcadores moleculares han sido utilizados ampliamente para estimar la diversidad genética de las poblaciones. Los datos empíricos revelan un patrón general de menor diversidad en especies amenazadas que en especies hermanas no amenazadas[35].

[34] FAO. Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. En: La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. p. 395. Disponible en internet: <http://www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s17.pdf>.

[35] SPIELMAN, Derek; BROOK, Barry and FRANKHAM, Richard. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004. vol 101, no. 52. p. 15261.

**4.2.4. Uso de ADN mitocondrial como marcador molecular.** Según Toscano *et al.*[36], el ADN mitocondrial es una molécula cuya estructura y contenido están muy conservados a lo largo de la evolución. Se trata de una molécula circular de aproximadamente 16,5 Kb que codifica para 13 polipéptidos, 22 ARN transferentes y 2 ARN ribosómicos. Contiene además 2 regiones no codificantes donde se localizan los orígenes de replicación: D-loop, para la cadena pesada y ori-L, para la cadena ligera. No obstante, existen organismos que muestran una distribución diferente y/o bien pérdida de algunos de estos genes. Para la mayoría de los organismos su herencia es clonal, generalmente a través de la línea materna y no suele experimentar procesos de recombinación. Igualmente existen excepciones a esta norma, como la doble herencia uniparental observada en diferentes moluscos. Su alta tasa de evolución, unas 10 veces superior a la mayor parte de los genes nucleares, le permite acumular gran variabilidad genética en intervalos de tiempo relativamente cortos. Todas estas características convierten al ADN mitocondrial en una molécula apropiada para su aplicación en estudios poblacionales y en filogenia.

Las reconstrucciones filogenéticas y los trabajos filogeográficos han estado dominados en el pasado por el uso exclusivo de marcadores mitocondriales, que presentan algunas ventajas como su haploidía y ausencia de recombinación, pero también inconvenientes manifiestos, como la presencia de copias nucleares y una posible influencia de la selección mayor de lo esperado**.**

## 4.3. GENERALIDADES DEL CITOCROMO OXIDASA I

**4.3.1. Características del COI.** Según Mortiz *et al.*[37], desde la década de 1970 el análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) se ha establecido como una poderosa herramienta para estudios evolutivos en animales. El genoma mitocondrial de los animales, es en la mayoría de los casos, construido por una molécula de ADN circular pequeña con contenido genético conservado (solo 37 genes) y estructura genética simple (no posee ADN repetitivo, transposones, intrones o pseudogenes). Esa extrema economía de contenido de la mayoría de los genomas mitocondriales animales es atribuida a una intensa selección a favor de un pequeño genoma.

---

[36] TOSCANO, Carlos; CATANESE, Gaetano; FUNES, Victoria; PEREZ, Laura y MANCHADO, Manuel. Marcadores moleculares mitocondriales, estudios poblacionales y filogenia. En: I Jornada científico-técnicas Andalucía-Marruecos [online]. Disponible en internet: <http://dldregister.uca.es/030-jornadas_y_conferencias/010-1jornadas-cientifico-tecnicas-andalucia-marruecos/resumenes/doc-en/InfanteC-ver.pdf >

[37] MORITZ, C.; DOWLING, T.E.; BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. In: Annual Review of Ecology and Systematics1987 [online]. vol. 18, p. 269. Available from internet: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.es.18.110187.001413?journalCode=ecolsys.1>

Según Morais y Marrelli[38], la subunidad 1 del Citocromo Oxidasa del ADN mitocondrial es parte de un complejo génico codante de proteínas transmembrana, involucradas en el transporte eléctrico y catálisis de la cadena respiratoria de organismos eucariotas. Este gen viene siendo motivo de estudios poblacionales de variabilidad genética por su universalidad e importancia evolutiva.

Por otro lado, según Brown, *et al*. [39], esta molécula presenta una alta tasa de evolución por mutación, cerca de cinco a diez veces más rápida que la tasa de mutación de un gen nuclear de copia única. Se estima que en primates, la evolución del ADNmt sea hasta diez veces mayor que la evolución de un gen nuclear de copia única. Sin embargo, Powel, *et al*. [40], dice que genes nucleares desarrollados en la biogénesis mitocondrial, evolucionan más rápidamente que los demás, teniendo la misma tasa de evolución del ADNmt. Además algunos organismos poseen la tasa de evolución del genoma mitocondrial igual a la de un gen nuclear de copia única, por ejemplo, en *Drosophila.*

De acuerdo con Harrison[41], la combinación de esas características hace que el ADNmt sea ampliamente utilizado en estudios de caracterización de poblaciones, subespecies y especies, además de estudios de carácter evolutivo y filogenético.

El ADNmt, como se observa en la Figura 6 "posee genes codificadores para dos subunidades ribosómicas (12S y 16S), 22 ARNt, tres subunidades 6 y 8 de ATP F0 sintetasa (ATP6 y ATP8) y siete subunidades de la NADH deshidrogenasa (ND1, ND6 y ND4L). Además de todos esos genes hay una región rica en A+T (en vertebrados, se llama D-loop), no codificadora y que parece contener el control de la replicación y transcripción de ADNmt"[42]. "El tamaño de esa región exhibe grande variación entre los organismos, al contrario de los genes, que se presentan similares en tamaño en una amplia gama de especies, entre invertebrados y vertebrados alunas veces se presenta polimorfismo de tamaño a nivel inter-específico"[43].

---

[38] MORAIS, SA y MARRELLI, MT. Citocromo c Oxidase I em subespécies do complexo *Culex pipiens* sul americano. Em: 55° Congresso Brasileiro de Genética, 30 de agosto a 2 de setembro de 2009 [online]. São Paulo, Brasil. 235 p. Disponível na internet: <http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs2009/GA235-28614.pdf >. ISBN 978-85-89109-06-2

[39] BROWN, Wesley; GEORGE, Matthew and WILSON, Allan. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. In: Proceedings of the National Academy of the U S A [online]. vol. 76 no. 4. 1979. p. 1967. Available from internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC383514/>

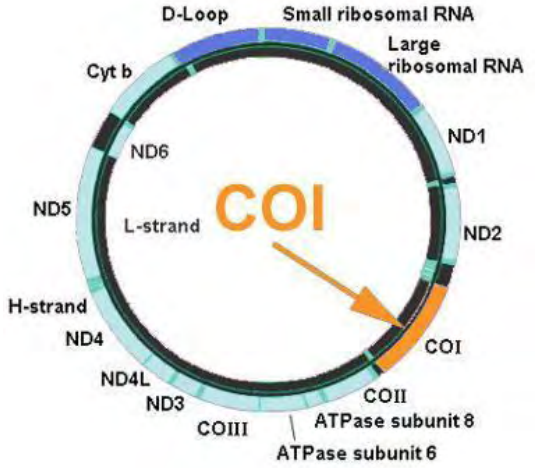
[40] POWELL, Jeffrey; CACCONE, Adalgisa; AMATO, George and YOON, Carol. Rates of nucleotide substitution in Drosophila mitochondrial DNA and nuclear DNA are similar. In: Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA1986. vol. 83. p.. 9090.

[41] HARRISON, Richard. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. In: Treend in ecology and evolution, January 1989. vol. 4 no. 1. p. 7.

[42] WOLSTENHOLME, D.R. Animal mitochondrial DNA: structure and evoluting. In: Mitochondrial Genomes1992 [online]. p. 173.

[43] Mortiz *et al.,* Op. Cit. p. 290.

**Figura 6.** Genoma mitocondrial con aproximadamente 17 Kb. La flecha indica la posición del gen del citocromo oxidasa subunidad I (COI).




Fuente: Barcodes of Life. Mitochondrial Genome. s.f.

De acuerdo con Haavie, et. al.[44], debido a que el ADNmt es de herencia materna, estudiar la diferenciación de esa molécula equivale a estudiar la población de hembras. Lo que combinado con el hecho de que el ADNmt es haploide, hace que el tamaño efectivo de la población estudiada sea cuatro veces menor que cuando se utiliza un marcador molecular diploide.

Sin embargo, Breton et. al.[45], afirman que el descubrimiento de la Doble Herencia Uniparental (DUI) del ADNmt en algunos bivalvos ha desafiado el paradigma de la estricta herencia materna. La DUI es un sistema peculiar de la herencia del ADN citoplásmico que involucra diferentes vías materna y paterna de transmisión del ADNmt. Se produce en Mejillones marinos del orden Mytiloida, mejillones de agua dulce de la superfamilia Unionoidea y almejas marinas del orden Veneroida.

Asimismo, Sahls & Nyblom[46], dicen que el gen mitocondrial de la enzima citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) ha sido usado con bastante frecuencia en estudios de las relaciones filogenéticas por presentar regiones variables suficientes para análisis de grupos taxonómicamente relacionados.

---

[44] HAAVIE, J.; SAETRE, G.-P.; POUM, T. Discrepant in population differentiation at microsatellites, mitochondrial DNA and plumagem colour in the pied flycatchet – inferring evolutionary processes. In: Molecular Ecology 2000 [online]. vol. 9, no. 8. p. 1138.

[45] BRETON, Sophie; DOUCET, Helene; STEWART, Donald T.; HOEH, Walter R. and BLIER, Pierre U. The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough?. TRENDS in Genetics Vol. 23, no.9. 2007. p. 467.

[46] SAHLS, G. and NYBLOM, K. Philogenetic analysis of the genus Cheilosia (*Diptera*, *Syrphidae*) using mitochondrial COI sequence data. In: Mol. Phylogen. Evol., 2000. vol.15, no. 2, p. 240.

**4.3.2. Estudios genéticos en moluscos.** Folmer, *et al.*[47], en su estudio de desarrollo de técnicas moleculares para estudios filogenéticos de diversos organismos invertebrados, se centraron en el citocromo oxidasa I (COI) de ADN mitocondrial, ya que parece ser entre los más conservadores de genes codificadores de proteínas en el genoma mitocondrial de los animales. Encontraron entonces que los cebadores de ADN universal LCO1490 y HCO2198, amplifican una región de 710 pb de la mitocondria citocromo oxidasa I (COI) de genes de una amplia gama de invertebrados metazoos, por lo cual infieren, a partir de comparaciones preliminares que estos cebadores COI generan secuencias informativas para los análisis filogenéticos en una especie y en un mayor nivel taxonómico.

Entre los procedimientos experimentales que Folmer, *et al.*[48], utilizaron, en la extracción de ADN, fue partiendo de células enteras con la extracción de tejido en fresco o tejidos congelados a -80°C donde inmediatamente después de tomada la muestra utilizaron un hexadecil-trimetil-amonio (CTAB). Tomaron 1 $mm^3$ de tejido y el ADN se resuspendió en 75 - 150 µl de agua destilada (dependió del tamaño de los botones de ADN) y finalmente se almacenó a -20 °C a esta temperatura infieren que es posible mantenerse intacta en por lo menos tres años.

Otra investigación filogenética de Chee, *et al*.[49], con *Tegillarca granosa,* usando el citocromo oxidasa I (COI), indagó a partir de los cebadores diseñados para los bivalvos de un mismo género y cuyo objetivo principal fue conocer la posición de la *T. granosa* en el árbol de la evolución con la utilización de aproximadamente 585 pb del gen mitocondrial COI. En este estudio, La secuencia COI de *T. granosa* se alineó con las secuencias de las especies relacionadas depositados en *GenBank*. Este estudio reveló que tenía un porcentaje moderado de similitud intra-genética con otras especies en América del Sur, el Caribe y Australia (77%), sin embargo, cuando la secuencia de *A. grandis* se analizó en Colombia con las secuencias de las otras especies, se encontró que está más relacionada con las especies de América del Sur, tales como *A. tuberculosa, A. similis* y *A. chemnitzii* de Costa Rica y Ecuador (88 a 100%). Lo anterior les permitió afirmar que las secuencias COI son muy adecuadas para dar una indicación de cambios en las tasas de la diversidad molecular, así como evidencia de la evolución molecular, pero que también es muy importante el uso de marcadores microsatélites.

---

[47] FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R. and VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. In: Molecular Marine Biology and Biotechnology 1994[online]. vol. 3, no. 5. p. 294.

[48] Ibid., p. 297.

[49] CHEE, S.Y.; DEVAKIE, M.N. and SITI AZIZAH, M.N.. Phylogenetic study and barcoding of the blood cockle, *Tegillarca granosa*, found on the west coast of peninsular Malaysia using the COI gene. In: Genetics and Molecular Research 2011. vol. 10, no. 2. p. 1239. Available from internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21732288>.

Yan-Wei *et al.*[50], hacen referencia al aislamiento y caracterización de 14 loci de microsatélites polimórficos en la especie *Scapharca subcrenata* (Bivalvia: Arcidae); *S. subcrenata* es un importante recurso pesquero, pero ha estado sufriendo una severa disminución de la población debido al deterioro del medio ambiente costero y la explotación excesiva. Para investigar la variación genética y la estructura de las poblaciones de *S. subcrenata*, estos autores desarrollaron 14 loci de microsatélites polimórficos. Estos microsatélites permiten avanzar en la investigación de la estructura genética de la población y la diversidad genética en esta especie.

Por otro lado, Marko[51], publicó un estudio de calibración fósil de relojes moleculares y los tiempos de divergencia de algunas especies separadas por el istmo de Panamá. A partir de este estudio reportó una secuencia parcial de 603 pb aislada del gen mitocondrial COI de *A. tuberculosa* en la base de datos de nucleótidos de NCBI (por sus siglas en ingles *National Center for Biotechnology Information*). Sin embargo, no se han reportado estudios de diversidad genética con esta especie.

## 4.4. FACTORES DE EVOLUCIÓN

De acuerdo con Derazo[52] los factores de evolución son los que se especifican a continuación.

**4.4.1. Mutación.** Es un cambio estable y heredable en el material genético. Las mutaciones alteran la secuencia de ADN y por tanto introducen nuevas variantes. Muchas de estas variantes suelen ser eliminadas, pero ocasionalmente algunas de estas variantes pueden tener éxito e incorporarse en todos los individuos de la especie. La mutación es un factor que aumenta la diversidad genética.

La tasa de mutación de un gen o una secuencia de ADN es la frecuencia en la que se producen nuevas mutaciones en ese gen o la secuencia en cada generación. Una alta tasa de mutación implica un mayor potencial de adaptación en el caso de un cambio ambiental, pues permite explorar más

[50] YAN WEI FENG; QILI LING and FENG KONG. Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci in the ark shell *Scapharca subcrenata* (Bivalvia:Arcidae). In: Conservation Genetics 2009. vol. 10, no. 4. p. 1125.

[51] MARKO, Peter. Fossil Calibration of Molecular Clocks and the Divergence Times of Geminate Species Pairs Separated by the Isthmus of Panama. Molecular Biology and Evolution vol. 19, no. 11. p. 2006.

[52] DERAZO, Janeth. Estudio de la variabilidad genética del matrinchá (*Brycon orthotaenia*), mediante marcadores moleculares microsatélites. Trabajo de grado de Ingeniero en Producción Acuícola. Pasto, Colombia. Universidad de Nariño. 2007. p. 57.

variantes genéticas, aumentando la probabilidad de obtener la variante adecuada necesaria para adaptarse al reto ambiental. A su vez, una alta tasa de mutación aumenta el número de mutaciones perjudiciales, haciéndolos menos adaptados y aumentando la probabilidad de extinción de la especie.

Cada especie tiene una tasa de mutación propia que ha sido modulada por la selección natural para que la especie pueda enfrentarse a los cambios ambientales.

**4.4.2. Deriva génica.** En cada generación se produce un sorteo de genes durante la transmisión de gametos de padres a hijos que se conoce como deriva génica. La mayoría de los organismos son diploides, es decir tienen dos ejemplares de cada gen. Los gametos de estos organismos portan solo uno de los dos alelos de cada gen. El que un gameto lleve un alelo u otro es una cuestión al azar, por lo que la formación de gametos y su consiguiente unión para formar los huevos de la siguiente generación solo puede describirse como un proceso probabilístico.

Cada generación se espera una fluctuación al azar de las frecuencias alélicas en las poblaciones. Si en algún momento uno de los alelos no se transmite, se habrá perdido para siempre.

El resultado de la deriva suele ser la perdida de variabilidad genética, siendo un proceso que contrarresta la entrada de variabilidad genética por mutaciones.

**4.4.3. Migración.** El intercambio de genes entre las poblaciones debido a la migración de los individuos entre poblaciones es otro factor importante de cambio genético en las poblaciones. Si dos poblaciones difieren en las frecuencias de los alelos de algunos de sus genes, entonces el intercambio de individuos entre las poblaciones producirá un cambio de las frecuencias de los genes en cada una de las poblaciones. Esta fuerza aumenta la variabilidad genética ya que es el intercambio de genes entre poblaciones diferentes.

**4.4.4. Selección natural.** Es la reproducción diferencial de unas variantes genéticas respecto a otras. Resulta del cumplimiento de las tres condiciones siguientes: (1) Variación fenotípica entre los individuos de una población, (2) supervivencia o reproducción diferencial asociada a la variación, y (3) herencia de la variación. Si en una población de organismos se dan estas tres condiciones, entonces, se sigue necesariamente un cambio en la composición genética de la población por selección natural.

## 4.5. PARÁMETROS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

Se refiere a la variación en el material genético de una población o especie e incluye los genomas nucleares, mitocondriales y ribosomales, además los genomas de otros organelos. La variabilidad genética nueva puede estar causada por mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo (número, forma, tamaño y ordenación interna de los cromosomas). Los procesos que eliminan variabilidad genética son la selección natural y la deriva génica[53]. A continuación se describen algunos estimadores de diversidad genética.

**4.5.1. Diversidad haplotípica (H).** Es la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar en la muestra sean distintos, se calcula mediante la siguiente fórmula.

$$\mathrm{H} = \frac{n}{n-1}\left(1 - \sum_{i-1}^{k} Pi^2\right)$$

Dónde**:** ***n*** corresponde al número de copias de haplotipos presentes en la muestra, ***k*** es el número de haplotipos distintos en la muestra y ***Pi*** es la frecuencia del haplotipo ***i***.

**4.5.2. Diversidad nucleotídica (π).** La diversidad nucleotídica se calcula mediante la fórmula.

$$\pi_n = \frac{\sum_{i=1}^{k}\sum_{j<i} p_i p_j d_{ij}}{L}$$

Dónde**:** $d_{ij}$ es el número de mutaciones por nucleótido estimadas desde la divergencia de los haplotipos *i* y *j*, ***k*** es el número de haplotipos y $p_i$ es la frecuencia del haplotipo i. ***L*** es el número de nucleótidos en la secuencia.

**4.5.3. Estadístico D de Tajima.** Evalúa la hipótesis nula de neutralidad en el proceso de evolución del marcador. Éste estadístico compara el número de sitios segregantes en la muestra y el promedio de diferencias pareadas y supone que los dos parámetros deberían obtener el mismo valor en un modelo sin recombinación. Las diferencias encontradas se le atribuyen a los efectos de

[53] DERAZO, Ibid. p. 56.

selección, circunstancias demográficas como un cuello de botella o una expansión demográfica. El índice se calcula por la siguiente fórmula.

$$D = \frac{\theta_\pi - \theta_s}{\sqrt{Var(\theta_\pi - \theta_s)}}$$

Dónde: $\theta_n = \pi$ , $\theta_s = S / \Sigma(1/i)$, dónde S es el número de sitios segregados.

**4.5.4. Análisis de distribución de pares de secuencias (*Mismatch distribution*).** Rogers & Harpending[54], lo definen como una frecuencia gráfica entre pares de alelos. Usualmente es multimodal en muestras elaboradas a partir de poblaciones en desequilibrio demográfico y se refleja en la forma altamente estocástica de los árboles de genes. Por otro lado, por lo general es unimodal en poblaciones que han pasado recientemente por una expansión demográfica o a través de un rango de expansión con altos niveles de migración entre los demos vecinos[55]. Schneider & Excoffier[56] dicen que este gráfico permite visualizar la firma de la expansión, si hay expansión de la población, entonces teóricamente, podemos calcular el tamaño de la población antes de la expansión, el tamaño de la población después de la expansión, y el tiempo que en la expansión sucedió.

**4.5.5. Análisis Molecular de Varianza y estructura poblacional (AMOVA).** Permite determinar la presencia de estructura genética entre los individuos de las diferentes poblaciones. Examina en mayor detalle la concordancia entre las distancias genéticas y las diferentes poblaciones.

**4.5.6. Estadísticos F o índices de Fijación.** Nayilaky[57] menciona que los estadísticos F fueron desarrollados por Sewall Wright en el año 1951 y se utilizan para cuantificar la diferenciación entre poblaciones a través de la reducción de la heterocogosis. De acuerdo con García[58], para definir los estadísticos F, en primer lugar se consideran las siguientes cantidades:

---

[54] ROGERS, Alan and HARPENDING, Henry. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. Mol. Bid. Evol. vol. 9, no. 3. 1992. p. 553.
[55] ROGERS, Alan and HARPENDING, Henry. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. Mol. Bid. Evol. vol. 9, no. 3. 1992. p. 553.
[56] SCHNEIDER, Stefan y EXCOFFIER, Laurent. Estimation of Past Demographic Parameters From the Distribution of Pairwise Differences When the Mutation Rates Vary Among Sites: Application to Human Mitochondrial DNA. Genetics Society of America vol. 152. 1999. p. 1080.
[57] NAGYLAKI, T. Fixation Indices in Subdivided Populations. In: Genetic Society of America 1998 [online]. Citado por Ibid., p. 50.
[58] GARCÍA. Citado por Ibid., p. 50.

$H_I$: Heterocigosis *observada* media por individuos dentro de poblaciones.
$H_S$: Heterocigosis *esperada* media dentro de poblaciones.
$H_T$: Heterocigosis *esperada* media en la población conjunta (calculada con frecuencias alélicas promediadas entre todas las poblaciones). Según la denominación de Wright los estadísticos F se denotan como:

**4.5.6.1. Coeficiente de endogamia $F_{IS}$ (f).** Mide la reducción media de heterocigosis de un individuo debido a apareamientos o aleatorios, es decir, mide el nivel de endogamia dentro de las subpoblaciones. Varía entre -1 (todos los individuos son heterocigotos) a 1 (ausencia de heterocigotos observados). Un valor de 1 indica igualdad de heterocigotos observados y esperados y por lo tanto una situación de equilibrio.

**4.5.6.2. Índice de Fijación $F_{ST}$ (Θ).** Mide la reducción media de heterocigosis en una sub-población con respecto a la población total debida a la deriva génica entre sub-poblaciones. Representa el porcentaje de la variación genética que es atribuible a las diferencias entre y dentro de poblaciones. Varía entre 0 (no existe diferenciación) a 1 (diferenciación completa).

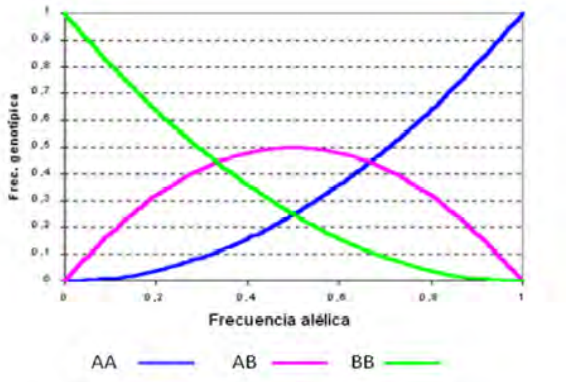
**4.5.6.3. Índice de fijación conjunto $F_{IT}$ (*F*).** Mide la endogamia total. Representa la reducción media en heterocigosis de un individuo relativa al total poblacional.

**4.5.7. Equilibrio Hardy-Weinber (H-W).** De acuerdo con Lorenzano[59] la Ley de Equilibrio de Hardy Weinberg, establece que si se considera un locus con dos alelos, se puede demostrar matemáticamente que las frecuencias génicas y genotípicas de estos alelos permanecerán constantes, generación tras generación, siempre y cuando se cumplan ciertas condiciones como: ser una población de tamaño grande (infinita), sujeta al régimen de apareamientos al azar y ausencia de selección, mutación y migración.

En la Figura 7 se puede observar el principio de Hardy-Weinberg para dos alelos, en el eje horizontal se muestran las dos frecuencias alélicas *p* y *q*, el eje vertical muestra la frecuencia de los tres posibles genotipos representados por las líneas de colores.

[59] LORENZANO, P. Bass Van Frassen y la Ley de Hardy-Weinber: una discusión y desarrollo de su diagnóstico. En: Universidad Nacional de Quilmes-CONICET 2008 [online]. vol. 12 no. 2. pp. 54 – 121. Disponible en internet: < http://www.cfh.ufsc.br/~principi/p122-1.pdf>, Citado por Ibid., p. 49.

**Figura 7.** Equilibrio Hardy-Weinberg considerando un *locus* con dos alelos.




Fuente: Barrera y Martinez, .2011.

**4.5.8. Distancia genética.** Según Nei[60] el índice de distancia genética, permite valorar la diversidad genética entre dos o más poblaciones. Cuando una unidad se separa en dos o más, éstas evolucionan a partir de ese momento en forma más o menos independiente. Las fuerzas que actúan sobre cada población (mutación, selección, deriva y migración) irán conformando la composición genética de cada una de ellas.

El índice de la distancia genética varía de cero a uno. Entre mayor sea la distancia entre dos poblaciones, mas distintas serán genotípica y fenotípicamente y mayor será la diversidad entre individuos. Si el valor es cero, significa que las poblaciones comparadas son idénticas genéticamente y por lo tanto no existen diferencias entre sus alelos.

[60] NEI, M. Genetic distances between populations. AM. Nat. vol. 106. 1972. p. 288.

# 5. MATERIALES Y MÉTODOS

## 5.1. LOCALIZACIÓN

El presente estudio comprendió dos etapas, la primera en la recolección de individuos en La Ensenada de Tumaco perteneciente al departamento de Nariño ubicado en las coordenadas 1°48′24″N 78°45′53″W (Figura 8). De acuerdo a la Organización Meteorológica Mundial[61], Tumaco presenta en promedio una temperatura mínima diaria de 23,44 °C y máxima de 28,98 °C, una precipitación total media de 233 mm con 19 días de lluvia al mes, en promedio.

**Figura 8.** Ubicación geográfica de Tumaco, Colombia.

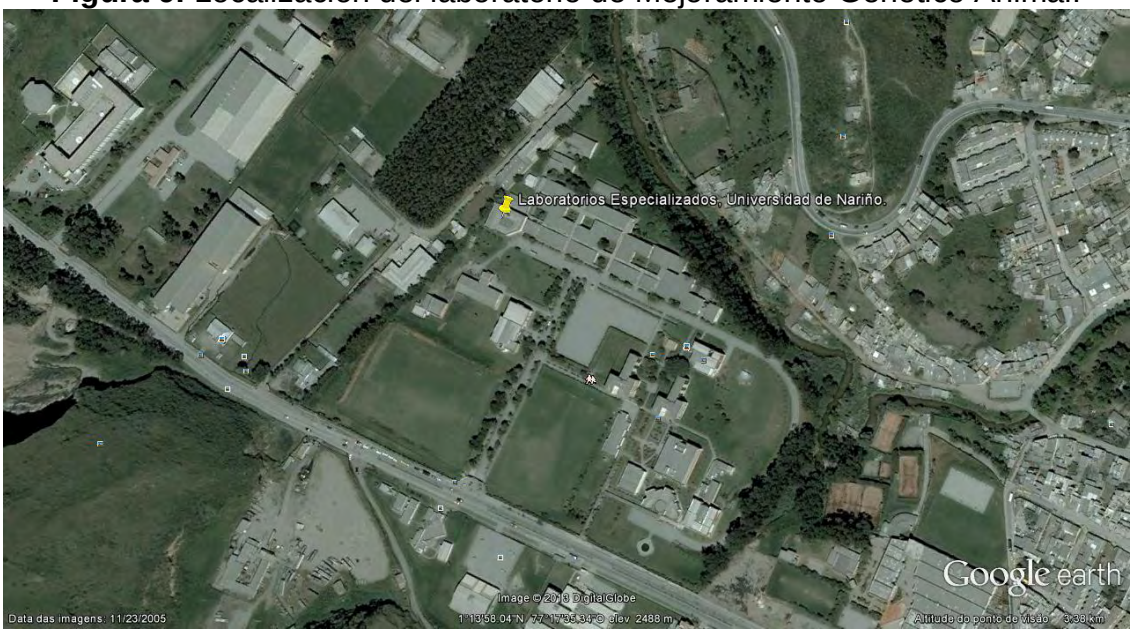



Fuente: Sección Cartográfica del Departamento de Mantenimiento de la Paz de Naciones Unidas, 2004. Disponible en internet: <http://wwis.aemet.es/057/c00888m.htm>

La segunda etapa comprendió el análisis molecular realizado en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Animal de la Universidad de Nariño ubicado en la ciudad San Juan de Pasto (Figura 9).

[61] Servicio de información Meteorológica Mundial. Información del tiempo para Tumaco. [Sistema de información]. Disponible en internet: < http://wwis.aemet.es/057/c00888.htm#climate>

**Figura 9.** Localización del laboratorio de Mejoramiento Genético Animal.




Fuente: Google Earth, 2013.

## 5.2. MATERIALES Y EQUIPOS

Los materiales, equipos y reactivos utilizados en el presente estudio se ordenaron de acuerdo al método a realizar, como se indica a continuación:

### 5.2.1. Muestreo

- 50 cuchillas descartables
- 50 microtubos de 1,5 ml (Axigen®)
- Alcohol 70°
- Alcohol absoluto
- Bata de laboratorio
- Bolsas Ziploc
- Botas
- Equipo de disección
- Gradillas de icopor
- Guantes descartables
- Lancha
- Papel Parafilm
- Tapabocas
- Toallas absorbentes

### 5.2.2. Extracción de ADN a partir de tejido.

- Kit de extracción de ADN para moluscos (Concepto Azul)
- Agua destilada
- Etanol 70%

- Isopropanol
- NaCl 5M
- Proteinasa K (20mg/ml)
- RNAsa (20mg/ml)
- SDS 20%
- Tampón Salino - NaCl 0,4M; Tris-HCl 100mM pH 8 y EDTA 2 mM pH 8.
- Buffer TE
- Baño maría (Labnet®)
- Bata de Laboratorio.
- Centrifuga refrigerada (Hermile®)
- Cronómetro
- Guantes de nitrilo
- Homogenizador Vortex (Labnet®)
- Juego de micropipetas (Transferpette®)
- Maceradores Kontex estériles
- Puntas estériles (Axigen®)
- Refrigerador - 4 °C
- Refrigerador - 20 °C
- Tapabocas
- Tubos de 1,5 mL estériles (Axigen®)

### 5.2.3. Amplificación por PCR.

- Kit de caracterización para moluscos (Concepto Azul)
- ADN polimerasa Taq (Promega)
- Agua ultra pura (IDT)
- Buffer 5X (Promega)
- Cebadores universales LCO1490 y HCO2198 (IDT)
- Cooler
- Desoxirribonucleótidos trifosfatados – dNTPs (Promega)
- Juego de Micropipetas (Transferpette®)
- Magnesio - $MgCl_2$ (Promega)
- Puntas estériles (Axigen®)
- Termociclador (Bio-rad MyCycler™).
- Tubos de PCR (Axigen®)

### 5.2.4. Electroforesis

- Agarosa (Bio-Rad)
- Balanza de precisión (Mettler Toledo)
- Bata de Laboratorio
- Bromuro de etidio (Promega)
- Buffer de Carga
- Cámara de electroforesis (Bio-Rad)
- Cámara fotográfica (Canon)
- Guantes de nitrilo
- Marcador de peso molecular 50pb (Promega)
- Microondas

- Micropipeta
- Puntas estériles(Axigen®)
- TAE 1X
- Tapabocas
- Transiluminador (Labnet)

### 5.2.5. Cuantificación

- Espectrofotómetro (Jenway Genova MK3)
- Agua ultra pura (IDT)
- Juego de micropipetas
- Puntas estériles (Axigen®)
- Guantes.
- Tapabocas.
- Bata de laboratorio

### 5.2.6. Secuenciación

- Agua ultra pura (IDT)
- Bata de laboratorio
- Guantes
- Juego de micropipetas
- Papel Parafilm
- Puntas estériles (Axigen®)
- Tapabocas
- Tijeras
- Tubos de 1,5 ml (Axigen®)
- Gradilla para el envío de muestras

## 5.3. MÉTODOS

**5.3.1. Toma de muestras.** Se tomó las muestras en cinco islas de manglar: San Jorge, La Tiburonera, El Pajal, La Playa o Resurrección y Bajito Vaquería (Figura 10), lugares explorados por ASCONAR y otros grupos de extracción. La faena de recolección se llevó a cabo en el horario de marea baja, momento en el cual los manglares se descubren y es el momento para comenzar la extracción. El tiempo es limitado para la recolección de ejemplares, dura de cuatro a seis horas aproximadamente.

**Figura 10.** Mapa de zonas muestreadas.




Fuente: Adaptado de Google Earth por información de ASCONAR.

*A. tuberculosa* se encuentra en las raíces de los manglares, siendo necesario excavar con las manos para encontrarla, como se observa en la Figura 11.

**Figura 11.** Mujer excavando para extraer piangüa en Tumaco.



En el momento que se terminó la faena se procedió a esterilizar un área y tomar una muestra de tejido del pie del molusco, como se observa en la Figura 12. Para cada individuo se utilizó un bisturí nuevo para evitar contaminación cruzada. La muestra de tejido se conservó en alcohol absoluto, previamente dispuesto en tubos de 1,5 ml y rotulados de acuerdo a la zona. Luego se selló cada tubo con papel Parafilm para evitar la apertura del tubo por cambio de presión en el transporte.

**Figura 12.** Toma de muestra de tejido de *Anadara tuberculosa*.



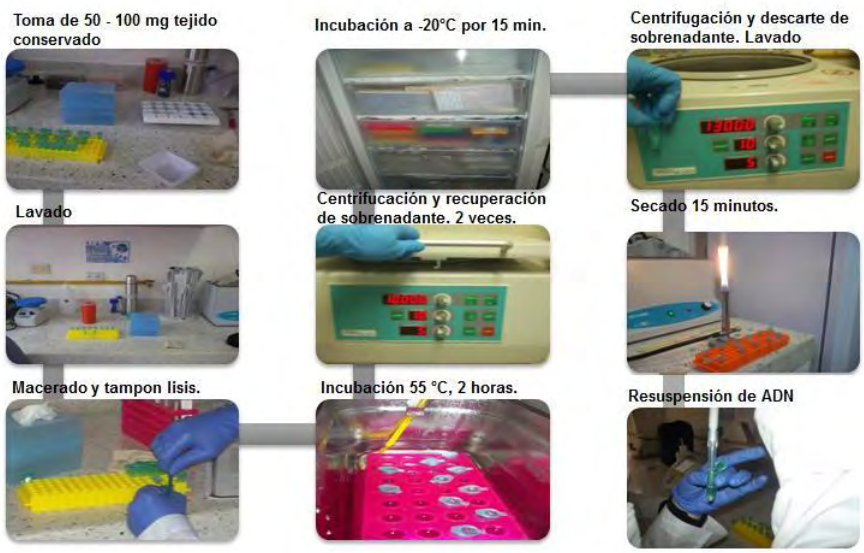

Se tomó 10 muestras de tejidos al azar en cada zona, del cual se obtuvo la codificación que se observa en la Tabla 1. Estas muestras fueron trasladadas al laboratorio de Mejoramiento Genético Animal de la Universidad de Nariño para poder hacer el análisis de laboratorio.

**Tabla 1.** Codificación o nomenclatura dada a cada individuo muestreado en el laboratorio.

| | **ZONA 1** | | **ZONA 2** | | **ZONA 3** | | **ZONA 4** | | **ZONA 5** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **San Jorge** | | **La Tiburonera** | | **El Pajal** | | **La Playa/ Resurrección** | | **Bajito Vaquería** |
| **1** | Z1 – 1 | **16** | Z2 – 1 | **31** | Z3 – 1 | **46** | Z4 – 1 | **61** | Z5 – 1 |
| **2** | Z1 – 2 | **17** | Z2 – 2 | **32** | Z3 – 2 | **47** | Z4 – 2 | **62** | Z5 – 2 |
| **3** | Z1 – 3 | **18** | Z2 – 3 | **33** | Z3 – 3 | **48** | Z4 – 3 | **63** | Z5 – 3 |
| **4** | Z1 – 4 | **19** | Z2 – 4 | **34** | Z3 – 4 | **49** | Z4 – 4 | **64** | Z5 – 4 |
| **5** | Z1 – 5 | **20** | Z2 – 5 | **35** | Z3 – 5 | **50** | Z4 – 5 | **65** | Z5 – 5 |
| **6** | Z1 – 6 | **21** | Z2 – 6 | **36** | Z3 – 6 | **51** | Z4 – 6 | **66** | Z5 – 6 |
| **7** | Z1 – 7 | **22** | Z2 – 7 | **37** | Z3 – 7 | **52** | Z4 – 7 | **67** | Z5 – 7 |
| **8** | Z1 – 8 | **23** | Z2 – 8 | **38** | Z3 – 8 | **53** | Z4 – 8 | **68** | Z5 – 8 |
| **9** | Z1 – 9 | **24** | Z2 – 9 | **39** | Z3 – 9 | **54** | Z4 – 9 | **69** | Z5 – 9 |
| **10** | Z1 - 10 | **25** | Z2 – 10 | **40** | Z3 – 10 | **55** | Z4 – 10 | **70** | Z5 – 10 |

**5.3.2. Extracción de ADN.** Para llevar a cabo la extracción de ADN del tejido conservado de *A. tuberculosa* se llevó a cabo el protocolo descrito en el Kit de Concepto Azul, que se describe en el Anexo A y en la Figura 13 se observa un esquema del procedimiento realizado en laboratorio.

**Figura 13.** Esquema de extracción de ADN con kit Concepto Azul.




Por otro lado, se estandarizó el protocolo de extracción de ADN de tejido de *A. tuberculosa* en base al protocolo descrito por Aljanabi y Martinez[62] con modificaciones realizadas por Derazo[63] y modificaciones propias, descritas en detalles en el Anexo B.

Para los dos casos, se llevó a cabo la purificación del ADN extraído adicionando 1 µL de RNAsa (25 mg/ml) a cada tubo e incubando a 37 °C por 1 hora.

La cuantificación y verificación de la calidad del ADN de las muestras se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% y por espectrofotometría con espectrofotómetro Jenway Genova MK3, utilizando una relación de longitud de onda de 260/280 para verificar la calidad de ADN obtenido.

**5.3.3. Amplificación por PCR.** La amplificación se realizó con el kit de Concepto Azul (Anexo C) en un área esterilizada y los componentes se trabajaron en frío para mantener las condiciones de la enzima polimerasa. De manera general, se colocó una alícuota de ADN en cada tubo de PCR previamente rotulado, luego se preparó el mix, se homogenizó, se sirvió el volumen especificado por el kit a cada tubo con ADN y se colocó en el termociclador como se observa en la Figura 14.

---

[62] ALJANABI, Salah and MARTINEZ, Iciar. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based tecniques. In: Nucleic Acids Research 1997. vol. 25 no. 22. pp. 4692 – 4693. Available from internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC147078/pdf/254692.pdf>.

[63] DERAZO. Op. Cit. p. 71.

**Figura 14.** Esquema general del proceso de PCR con Kit Concepto Azul.




Paralelamente a ello se llevó a cabo la estandarización del protocolo de amplificación del gen mitocondrial citocromo oxidasa 1, como se especifica en el Anexo D.

**5.3.3.1. Preparación del mix de PCR.** Para la preparación del Mix de PCR, se calculó el número de reacciones considerando el número de muestras a analizar más el control positivo, el control negativo y una reacción adicional. El número total de reacciones (N) se calculó con la siguiente fórmula:

$$N = \text{número de muestras} + \text{C}(+) + \text{C}(-) + 1$$, remplazando

$$N = 10 + \text{C}(+) + \text{C}(-) + 1 = 13$$ Reacciones

Se desarrolló este procedimiento cada diez muestras. En la Tabla 2 se indican los componentes utilizados por cada reacción y el volumen por tubo.

**Tabla 2.** Componentes de PCR y volumen utilizado con Kit Concepto Azul.

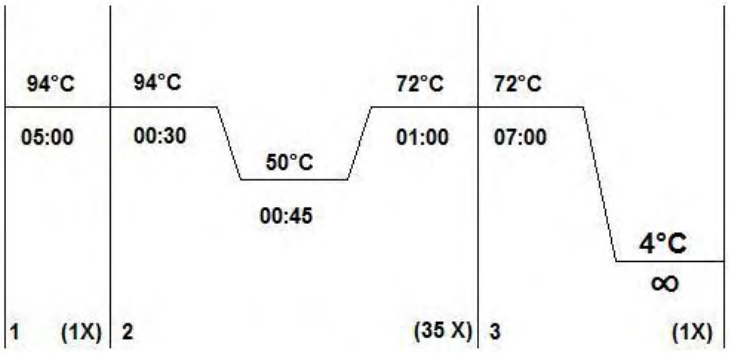
| **Reactivo** | **Volumen para una reacción µL** |
|---|---|
| Mastermix 2X | 25 |
| Solución 1 | 22 |
| Primer F | 1 |
| Primer R | 1 |
| **Volumen final** | **49** |

Una vez preparado el Mix se homogenizó en vortex por 5 segundos y se sirvió 49 µL en cada tubo, que previamente se dispuso una alícuota de 1 µL de ADN

extraído de la muestra. Se homogenizó y se colocó las muestras en el termociclador programado como sigue.

**5.3.3.2. Programación del termociclador.** Para programar el termociclador se tuvo en cuenta la programación especificada por Concepto Azul, como se indica en la Figura 15.

**Figura 15.** Programación del termociclador para amplificar el gen mitocondrial COI para *A. tuberculosa.*




**5.3.4. Electroforesis.** Para realizar la electroforesis en gel de agarosa al 2 % se siguió el siguiente procedimiento.

- Se pesó 0,8 g de agarosa.
- Se midió en una probeta 40 ml de TAE 1 X.
- Se colocó el TAE 1X en el recipiente de dilución y después se le adicionó la agarosa.
- Se llevó por 30 segundos al microondas dos veces, hasta que la agarosa se disuelva.
- Se midió con micropipeta 2 µL de Bromuro de etidio y se adicionó a la solución de agarosa.
- Se sirvió continuamente, evitando la formación de burbujas, en la bandeja de acrílico con peine, previamente dispuestos.
- Se dejó secar el gel de 30 – 45 minutos, hasta que endurezca.
- Mientras endurece el gel se colocó, en papel Parafilm, 5 µL de marcador de peso, también 3 - 5 µL de buffer de carga y 5 µL de ADN o producto de PCR, teniendo en cuenta el orden.
- Se retiró el peine con cuidado y se colocó el gel en la cámara de electroforesis
- Se llenó la cámara de electroforesis con TAE 1X hasta cubrir el gel.
- Se sirvió cada muestra en cada pozo, teniendo en cuenta el orden.
- Se tapó la cámara teniendo en cuenta que el flujo eléctrico.

- Se conectó y se programó el equipo a 110 V, 400 mA y 40 min.
- Al terminar la migración se desconectó el equipo y se trasladó el gel hacia el transiluminador, donde se observó los resultados y se tomó una foto como registro.

**5.3.5. Cuantificación y preparación de muestras para secuenciación.** Para cuantificar las muestras se corrió geles al 2 % con 2 µL de producto de PCR y las bandas que se observaron a simple vista se seleccionaron para el envío. Estas muestras seleccionadas se cuantificaron por espectrofotometría observando del mismo modo la calidad de los productos de PCR con la relación de longitud de onda (260/280) y se diluyeron a 50 ng/µl, un volumen de 20 µl en tubos de 1,5 ml.

Por otro lado se diluyeron los cebadores a 5 pmole/µl, teniendo en cuenta que 10 µl se utilizan para 5 reacciones. En total se envió 200 µL de cada cebador para las 100 reacciones y adicionalmente 20 µl como reserva. La secuenciación se desarrolló por ambos lados con la empresa Macrogen Inc. con un equipo *Sequencer*: ABI 3730 XL *Automated Sequencers*.

## 5.4. ANALISIS ESTADÍSTICO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

**5.4.1. Secuenciación.** El proceso de análisis se inició con la confirmación de similitud de las 82 secuencias obtenidas en este estudio con la secuencias de COI para *A. tuberculosa*, este paso se concluyó en el programa BlastN disponible en el sitio web de NCBI, por sus siglas en inglés, *National Center of Biotechnology Information*[64]. Una vez concluido este paso se editó las secuencias en el programa *BioEdit*[65], luego se realizó el complemento del reverso para las secuencias forward y se alineó las secuencias utilizando el programa Mega4[66].

**5.4.2. Diversidad y estructura genética.** Se estimó la diversidad genética con el programa DnaSP5[67], encontrando la diversidad haplotipica (h), diversidad nucleotídica (π), la desviación estándar y la varianza de cada una.

[64] Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". [Base de datos]. Nucleic Acids Res. vol. 25. 1997. p. 3389-3402.

[65] HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. [Software]. Nucl. Acids. Symp. Ser. vol. 41. 1999. 95-98 pp.

[66] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M & KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. [Software]. Molecular Biology and Evolution vol. 24. 2007. 1596-1599 pp. (Publication PDF at http://www.kumarlab.net/publications).

[67] LIBRADO P. and ROZAS J. DnaSP v5 a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. [Software]. Bioinformatics vol. 25. 2009. pp. 1451 – 1452.

Con el mismo programa se estimó el estadístico Fs (Fu, 1997) y se analizó la distribución entre pares de secuencias (*Mismatch distribution*).

Adicionalmente se ejecutó el análisis de variación nucleotídica y la estructura poblacional por medio del AMOVA (por sus siglas en inglés *Analysis of MOlecular VAriance*), ejecutando 10.000 permutaciones con el programa Arlequín versión 2006[68].

**5.4.3. Construcción de árboles filogenéticos**. Se elaboró un árbol filogenético alineando las 74 secuencias obtenidas para *A. tuberculosa* con secuencias de un grupo externo (*Outgroup)*. Se tomó como grupo externo secuencias de especies hermanas (*A. similis* y *A. grandis*), para el mismo gen, disponibles en Genbank y se construyó un árbol con el método UPGMA en el programa Mega4[69].

[68] EXCOFFIER, Laurent; LAVAL, Guillaume and SCHNEIDER, Stefan. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis Arlequin ver 3.1. 2006. [Software]. Disponible en la web < http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>

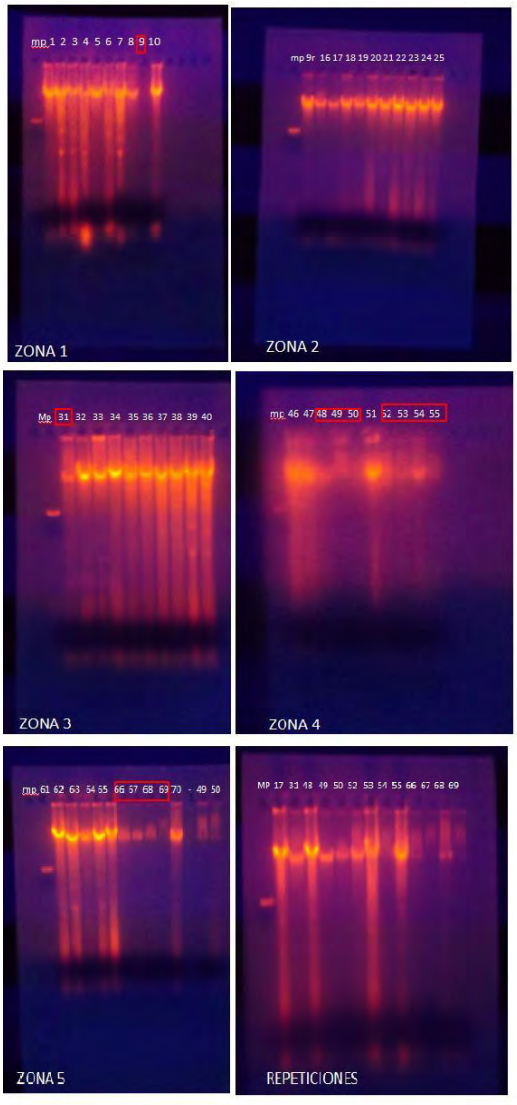
[69] TAMURA et al. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Op Cit.

# 6. RESULTADOS

## 6.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Como resultado de la extracción de ADN de *A. tuberculosa* con el kit de Concepto Azul se observó en gel de agarosa al 2% bandas que confirman la presencia de ADN, como se indica en la Figura16.

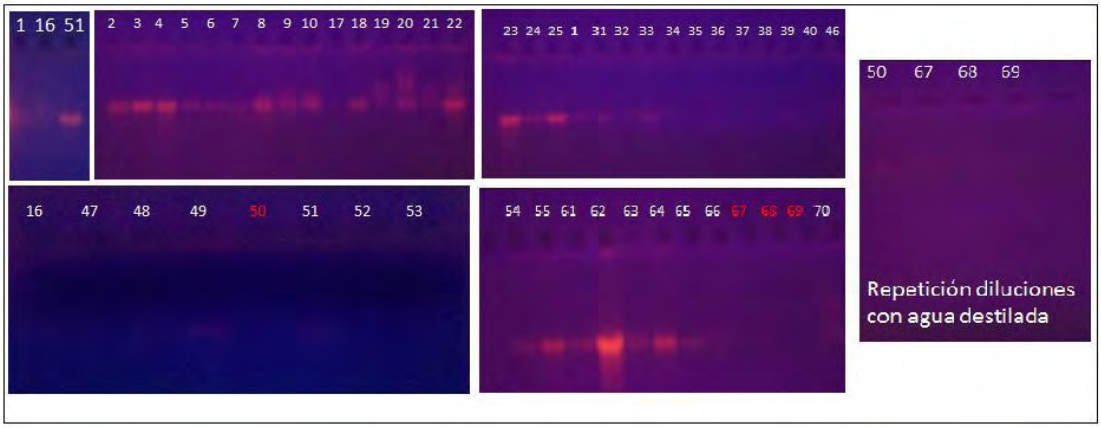
**Figura 16**. Resultados de la extracción de ADN con Kit de Concepto Azul.




La visualización de ADN en geles de agarosa permitió confirmar la presencia de material genético de *A. tuberculosa* y en algunos casos la presencia de RNasas, por lo que fue necesario aplicar un tratamiento con RNasa (Promega) como se especifica en métodos, para así lograr un ADN de buena calidad. Lo

anterior indica que el kit de extracción de la casa comercial Concepto Azul, permitió la extracción de ADN pero fue necesario en el laboratorio optimizar el protocolo con un protocolo final de purificación, es decir tratamiento con enzimas para bandas inespecíficas. Las diluciones realizadas fueron de 10:1 usando como diluyente la solución de re-suspensión del kit de Concepto Azul, los resultados del tratamiento con RNAsa y las diluciones se indican en la Figura 17.

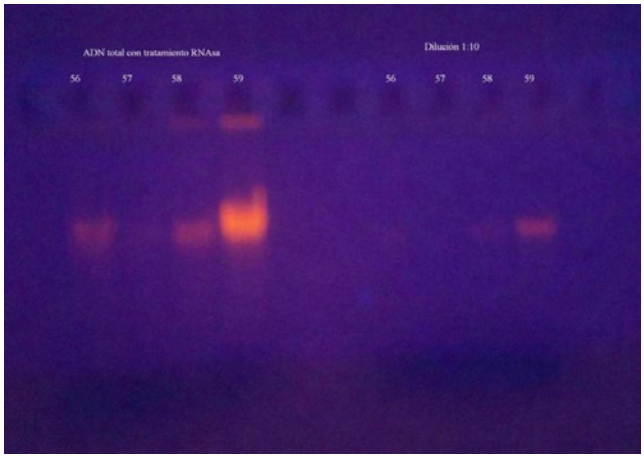
**Figura 17**. ADN con Tratamiento de RNAsa y diluciones.




Después de realizar el tratamiento con RNAsa se obtuvo ADN de buena calidad, observando bandas específicas y en menor cantidad, necesarias para la amplificación por PCR.

Por otro lado, el resultado de la estandarización del protocolo de extracción de ADN con alcoholes, se obtuvo ADN de buena calidad (Figura 18). El protocolo estandarizado se describe en el Anexo B.

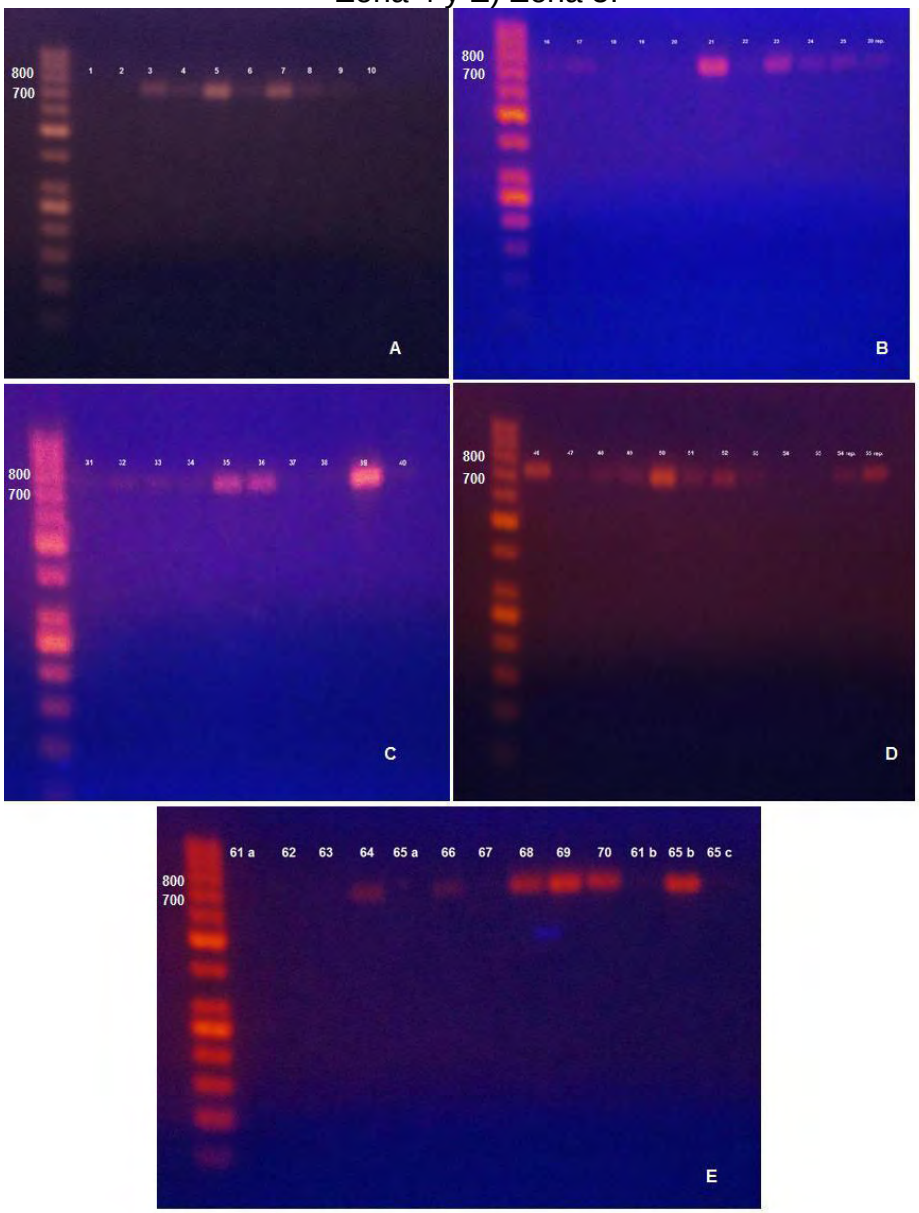
**Figura 18**. Resultados de la extracción de ADN estandarizada.



## 6.2. AMPLIFICACIÓN POR PCR

La amplificación del gen Citocromo Oxidasa Subunidad 1 con el kit de Concepto Azul arrojó buenos resultados observando bandas específicas de aproximadamente 710 pb visualizadas en geles de agarosa al 2%, como se indica en la Figura 19.

**Figura 19**. Foto de Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR obtenidos con kit de Concepto Azul. A) Zona 1, B) Zona 2, C) Zona 3, D) Zona 4 y E) Zona 5.



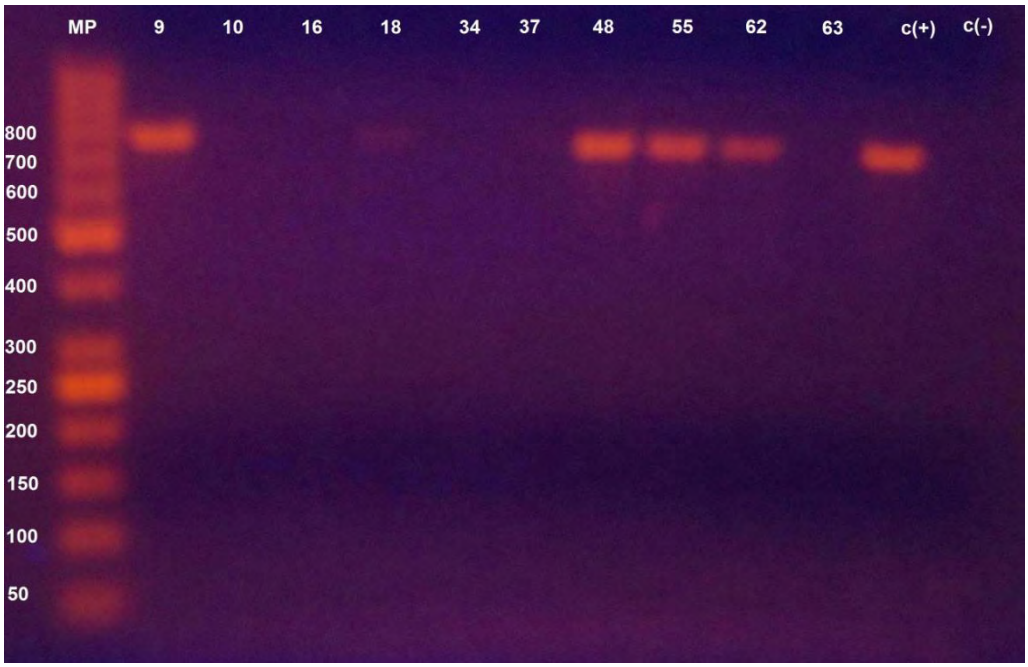
Los productos de PCR fueron cuantificados por espectrofotometría (Jenway Genova MK3 longitud de onda 260/280) y se verificó la calidad de estos. En la Tabla 3 se observa el promedio de cantidad y calidad.

**Tabla 3.** Resultados de la cuantificación por espectrofotometría de los productos de PCR.

| Concentración (µg/ml) | Relación λ 260/280 |
|---|---|
| 308,1 | 1,39 |

Paralelo a ello se llevó a cabo la estandarización de la técnica de PCR, que se describe en el Anexo D, de la cual se obtuvo amplificados en alta cantidad y calidad, como se observa en la Figura 20.

**Figura 20**. Foto de Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR obtenidos con técnica de PCR estandarizada en laboratorio.




## 6.3. SECUENCIACIÓN

Un total de 50 muestras de individuos del organismo de estudio fueron secuenciadas por ambos lados. Inicialmente se verificó, con ayuda del programa BlastN[70], que 82 secuencias de las obtenidas fueron similares, con diferentes porcentajes de identidad, a la secuencia parcial del gen COI de la

[70] Stephen F. et al., Op. Cit. [Base de datos].

especie *A. tuberculosa* (Anexo E). Finamente 74 secuencias con identidad mayor o igual a 95 % se editaron con el programa BioEdit[71] y alinearon con el programa Mega4[72]. En el Anexo F se indican las secuencias utilizadas para el análisis.

## 6.4. DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA

De las 74 secuencias pertenecientes a la especie *A. tuberculosa* se observaron 99 cambios, los cuales correspondieron a mutaciones que describen 21 haplotipos. A partir de las secuencias obtenidas se estimaron parámetros de la diversidad genética observada total y dentro de las cinco poblaciones consideradas en este estudio con el programa DnaSP[73], los valores resultantes del análisis se reportan en las tablas 4 y 5.

**Tabla 4**. Estadística descriptiva de los valores de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) para las poblaciones evaluadas según DnaSP

| Diversidad | Valor de diversidad | Varianza | Desviación estándar |
|---|---|---|---|
| **h** | 0,683 | 0,00355 | 0,06 |
| **π** | 0,03999 | 0,000382 | 0,01954 |

**Tabla 5**. Diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π) para las poblaciones evaluadas según DNAsp.

| Diversidad | Población | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
| **h ± DS** | 0,943 ± 0,040 | 0,859 ± 0,063 | 0,879 ± 0,058 | 0,882 ± 0,052 | 0,962 ± 0,040 |
| **π ± DS** | 0,0127±0,0033 | 0,0142±0,0026 | 0,0956±0,0662 | 0,0078±0,0010 | 0,1029±0,0621 |

**1**: San Jorge, **2**: La Tiburonera, **3**: El Pajal, **4**: La Playa y **5**: Bajito Vaquería.

Adicional al análisis de diversidad, se hizo el análisis de variación nucleotídica, con el programa Mega4[74], el cual mostró los siguientes porcentajes de composición de bases: 22,6 % para citosina (C), 23,5 % para timina (T), 38,7 % para adenina (A) y 15,2 % para guanina (G). El promedio de diferencia de nucleótidos (k) se calculó con DnaSP y fue 5,55868.

[71] HALL, T.A. BioEdit: Op. Cit. [Software].
[72] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M & KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. [Software]. Molecular Biology and Evolution vol. 24. 2007. 1596-1599 pp. (Publication PDF at http://www.kumarlab.net/publications).
[73] LIBRADO p. and ROZAS J. DnaSP v5 a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics vol. 25. 2009. 1451 – 1452 pp.
[74] TAMURA *et al*. Op Cit. [Software].

Se analizaron 640 bases, donde se encontró 541 sitios monomórficos y 99 sitios polimórficos, de los cuales 81 fueron sitios parsimoniosos que brindaron información para definir los haplotipos encontrados. Se identificó con el programa Mega4[75], en total 74.39 transiciones y 11.70 transversiones, descritas en la Tabla 6.

**Tabla 6**. Transiciones y transversiones de los 21 haplotipos encontrados en población de *A. tuberculosa.* Calculado con Mega4.

| Transiciones/ ***Transversiones*** | Cantidad |
|---|---|
| G --> A | 21,76 |
| T --> C | 26,79 |
| C --> T | 20,22 |
| A --> G | 5,62 |
| ***T --> A*** | ***3,79*** |
| ***C --> G*** | ***1,26*** |
| ***G --> T*** | ***3,79*** |
| ***C --> A*** | ***2,86*** |

La tendencia general de la transición / transversion es R = 1,857

Por otro lado, el análisis de la distribución entre pares de secuencias o *Mistmach distribution* realizado en las cinco poblaciones de estudio en conjunto, presentó una distribución Unimodal como se aprecia en la Figura 21. La línea continua (azul) representa la distribución esperada en el caso de una población estacionaria. La línea discontinua representa la distribución observada en la especie mencionada. Igualmente para cada población se indica en la Figura 22, donde se observa solamente para La Tiburonera una distribución unimodal, y para las demás poblaciones (San Jorge, El Pajal, La Playa y Bajito Vaquería) la distribución es multimodal.

[75] TAMURA, *et al.* Ibid.

**Figura 21**. Distribución de frecuencias del número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias del gen COI de *Anadara tuberculosa* para todas las secuencias en conjunto.

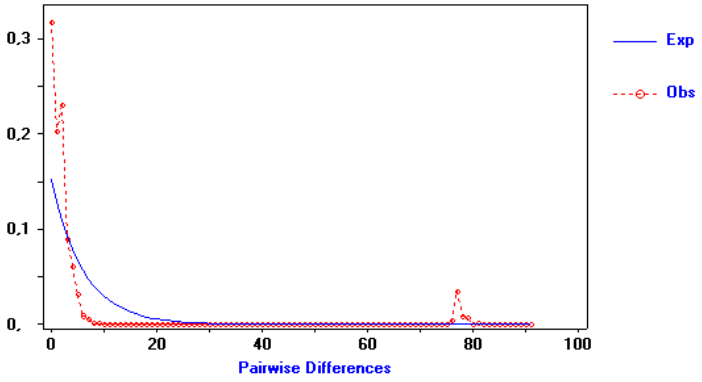
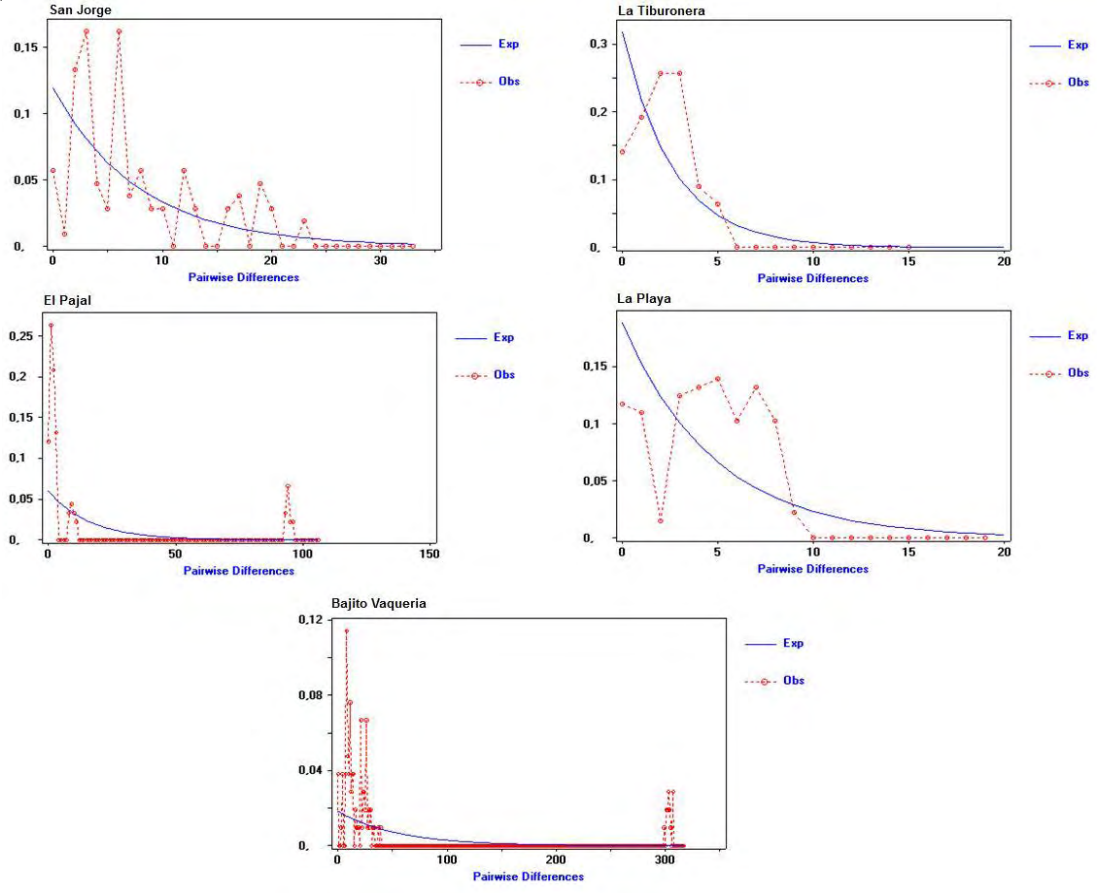



**Figura 22**. Distribución de frecuencias del número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias del gen COI de *Anadara tuberculosa* en las cinco poblaciones.




El valor del estadístico Fs de Fu resultó negativo y no significante (Fs = -2.956). Cuando fue estimado para cada población estudiada se encontró valor negativo

en tres poblaciones (San Jorge Fs = -0.870, La Tiburonera Fs = -0.943 y La Playa Fs = -0,201) y positivo para las poblaciones restantes (El Pajal Fs = 4.526 y Bajito Vaquería Fs = 2.571).

El análisis molecular de varianza y estructura genética realizado con el programa Arlequin[76], evidenció que no existe estructura poblacional para *A. tuberculosa* entre las cinco zonas estudiadas, con el gen de estudio (Tabla 7), encontrando solamente el 4.201 % de la variación total observada entre las poblaciones ($F_{ST}$ = 0.04201). Por lo anterior se puede asegurar que existe flujo génico entre los manglares muestreados.

**Tabla 7**. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) según Arlequín versión 2006. Grados de libertad (G.L.), Suma de cuadrados (S.C.). P<0.05

| Fuentes de variación | G.L. | S.C. | Componentes de varianza | Porcentaje de variación |
|---|---|---|---|---|
| **Entre poblaciones** | 4 | 201.695 | 1.34188 Va | 4.20 |
| **Dentro de poblaciones** | 69 | 2.111.657 | 30.60372 Vb | 95.80 |
| **Total** | 73 | 2.313.351 | 3.194.560 | |

Adicional al AMOVA, considerando una población total, se ejecutó un análisis entre los valores de $F_{ST}$ observados para cada población. Los valores del índice de fijación entre pares de poblaciones, análisis realizado en el programa Arlequín[77] con 10.000 permutaciones y P<0.050, no evidencio diferencias entre las localidades de San Jorge, La Tiburonera, El Pajal, La Playa y Bajito Vaquería (Ver tabla 8).

**Tabla 8**. Valores del índice de fijación ($F_{ST}$) entre pares de poblaciones, según Arlequín versión 2006.

| Población | Índice de Fijación (FST) | FST entre pares de poblaciones | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | SJ | LT | EP | LP | BV |
| Total | 0.04201 | | | | | |
| SJ | 0.09248 | 0.00000 | | | | |
| LT | 0.01677 | 0.08616 * | 0.00000 | | | |
| EP | -0.02837 | 0.02744 NS | -0.03460 NS | 0.00000 | | |
| LP | 0.10020 | 0.04404 NS | 0.18630 * | 0.07120 * | 0.00000 | |
| BV | 0.01314 | 0.07297 * | -0.01302 NS | -0.03103 NS | 0.14767 * | 0.00000 |

SJ: San Jorge; LT: La Tiburonera; EP: ElPajal; LP: La Playa y BV: Bajito Vaqueria
NS: no hay diferencias significativas; *: P<0.05

[76]EXCOFFIER *et al*. Op Cit. [Software].
[77] EXCOFFIER *et al*. Ibid. [Software].

## 6.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Como se mencionó en metodología para hacer el árbol filogenético se utilizó como grupo externo (*outgroup*) secuencias de *Anadara similis* y *Anadara grandis*, utilizando el método de agrupamiento UPGMA[78] (por sus siglas en inglés *Unweighted Pair-Groups Method with Arithmetic Averages*) con el programa Mega4. En el análisis se consideraron las 74 secuencias obtenidas con porcentajes de identidad mayores o iguales que 95 % con *A. tuberculosa* y como grupo externo una secuencia de *A. similis* y una secuencia de *A. grandis* para el mismo gen, disponibles en GenBank.

En la Figura 23 se muestra el árbol filogenético con la suma de la longitud del ramal = 1.61770907. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta[79]. Todas las posiciones que contienen lagunas y los datos que faltaron, fueron eliminadas del conjunto de datos. Hubo un total de 138 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis filogenéticos se realizaron en MEGA4[80].

Además, se generó un segundo árbol que representa la relación existente de las secuencias de este estudio y su relación cercana entre ellas mismas (Figura 24).

[78] Sneath PHA & Sokal RR. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco. 1973. p. 3.
[79] TAMURA K, NEI M & KUMAR S () Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (*USA*) vol. 101. 2004. 11030-11035 pp.
[80] TAMURA et al. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Op Cit.

**Figura 23**. Visualización del árbol filogenético para la especie *Anadara tuberculosa*, encontrado a partir del programa Mega4.

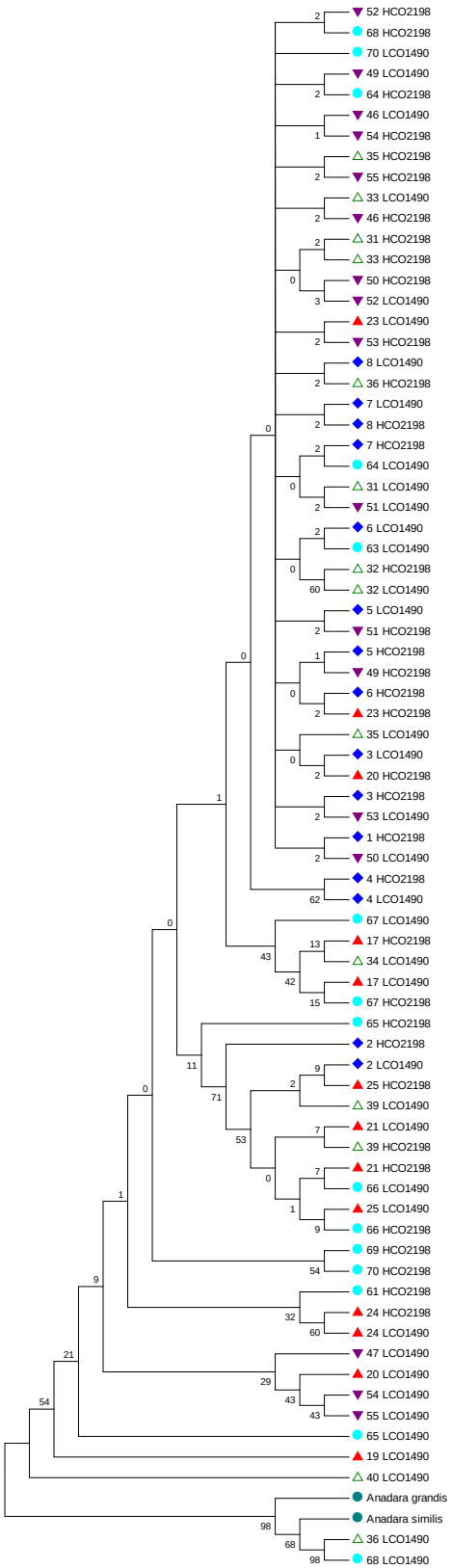
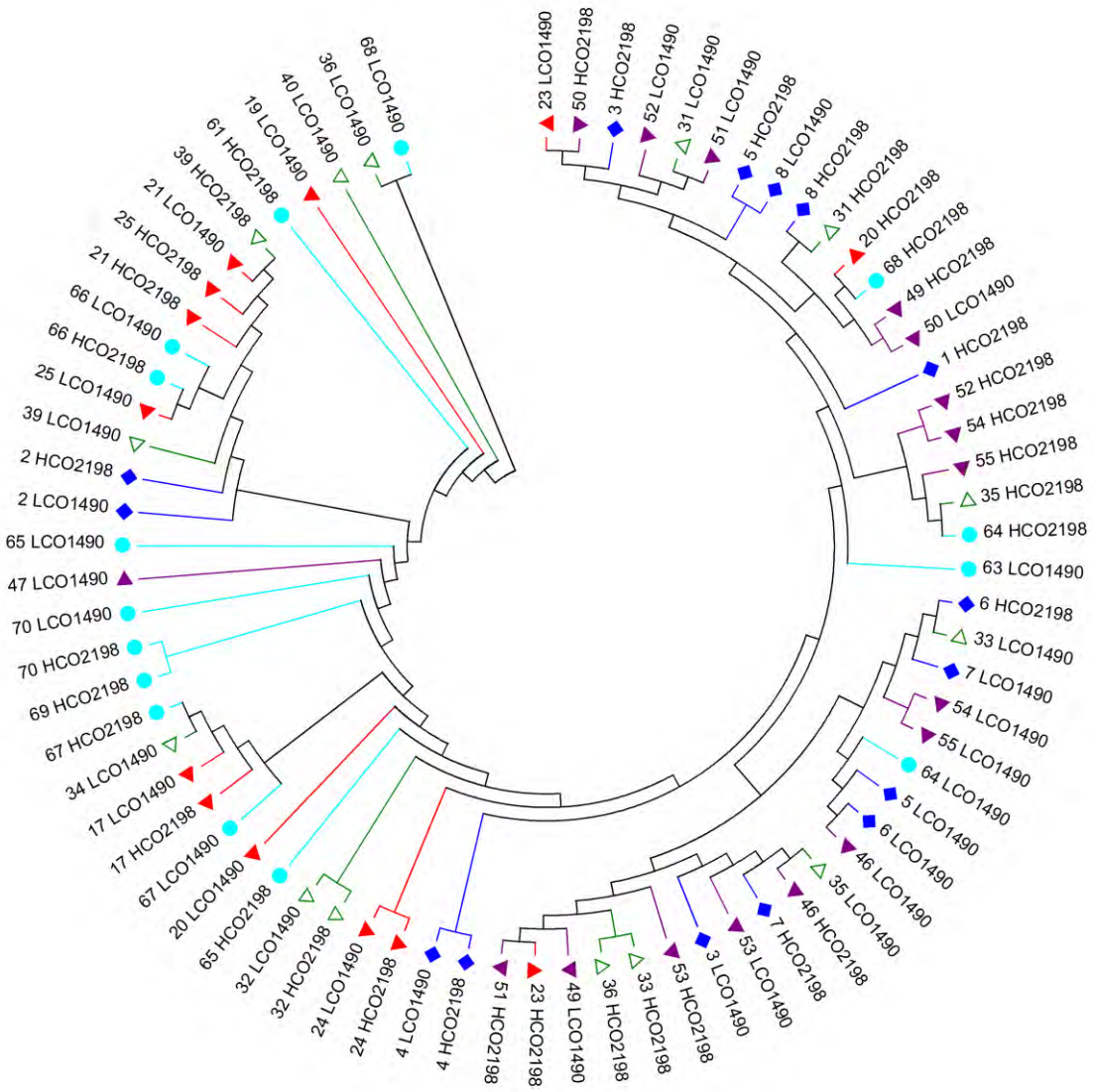


**Figura 24**. Visualización del árbol filogenético consenso para la especie *A. tuberculosa*, sin considerar un grupo externo.



# 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

## 7.1. DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA Y NUCLEOTÍDICA EN *A. tuberculosa*

De acuerdo con Fischer et. al. [81], la piangüa *A. tuberculosa* es un molusco bivalvo que se encuentra asociado a las raíces del mangle, especialmente *Rhizophora* spp., en el Pacífico americano. En Colombia son los bivalvos más explotados en el litoral Pacífico y de ellos se benefician las comunidades que habitan esta región. Actualmente este recurso se encuentra reportado en el libro rojo de invertebrados de Colombia por la alta probabilidad de explotación. De este modo es necesario encaminar estudios enfocados a la conservación de *A. tuberculosa*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, utilizando como marcador genético el gen COI, son los primeros reportes sobre la diversidad genética para *A. tuberculosa*, por lo tanto los resultados reportados fueron analizados en base a estudios realizados con otros bivalvos.

La diversidad genética reportada para todas las poblaciones fue similar, de acuerdo con De La Rosa[82] estos resultados sugieren que no existe una distribución geográfica diferencial de las variantes genéticas de las cinco poblaciones de estudio.

La diversidad haplotípica encontrada para *A. tuberculosa* en el presente estudio es menor y la diversidad nucleotídica es mayor a los encontrados para *Hiatella arctica* ($h = 0.884$ y $\pi = 0.0067$) y para *Macoma balthica* ($h = 0.857$ y $\pi = 0.0101$) por Layton[83]. Igualmente Cruzeiro[84] reporta para varias localidades diversidad haplotípica alta y diversidad nucleotídica baja, con el COI para el bivalvo *Scrobicularia plana*. Del mismo modo, un estudio realizado por Shen *et. al*.[85], para un mejillón domesticado *Mytilus coruscus,* obtiene una diversidad genética con la misma tendencia ($h = 0.895$ y $\pi = 0.00832$). Estos resultados de diversidad indican una expansión poblacional.

---

[81] FISCHER, W., F. KRUPP, W. SCHNEIDER, C. SOMMER, K. E. CARPENTER y V. NIEM. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca Pacífico centro-oriental: plantas e invertebrados. Volumen I, FAO, Roma. 1995. p. 646.

[82] DE LA ROSA, Leonardo Mario. Estructura genética y conectividad migratoria de las agregaciones invernantes de *Calidris mauri* (Charadiiformes: Scolopacidae) en Méxoco. Tesis de maestria en ciencias en Ecología molecular y Biotecnología: Ensenada, Baja California. Universidad autónoma de Baja California. 2012. p. 53.

[83] LAYTON, Kara. Examining patterns of genetic variation in Canadian marine molluscs through DNA barcodes. Tesis de maestria en ciencias. Guelph, Ontario, Canada. University of Guelph. 2012. p. 41.

[84] CRUZEIRO, Catarina. Population genetic structure of Scrobicularia plana along the Atlantic coast and comparison with Macoma balthica. Royal Netherlands Institute for Sea Research. 2009. p. 23.

[85] SHEN Yu-bang, LI Jia-le, FENG Bing-bing. Genetic Analysis of Cultured and Wild Populations of *Mytilus coruscus* Based on Mitochondrial DNA. ZOOLOGICAL RESEARCH vol. 10 no. 3. 2009. p. 240.

A pesar que los estudios reportan la misma relación entre diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica, informan valores mayores a los encontrados para *A. tuberculosa* en el presente estudio (h = 0.683), lo que probablemente se deba a la pérdida de variabilidad debido a encierros instalados en el manglar. Del mismo modo, esta tendencia de disminución de la diversidad genética puede estar relacionada con la alta extracción de este recurso[86], la disminución de la población[87], las descargas de grandes volúmenes de residuos en los manglares[88], las altas temperaturas del agua reportadas y la contaminación por hidrocarburos[89]. La diversidad genética observada es el resultado de la acción de las fuerzas de mutación y la selección natural, efecto de la respuesta de los individuos a cambios medioambientales naturales y antropológicos.

Por otro lado el valor del estadístico Fs de Fu (1997) reportado en el presente estudio (Fs = -2,956), representa un exceso en el número de alelos, como sería de esperar de una reciente expansión de la población o arrastre por ligamiento. Con respecto al análisis de la distribución entre pares de secuencias o *Mistmach distribution* realizado en las cinco poblaciones de estudio en conjunto, presentó una distribución unimodal, lo que significa que existe una expansión moderada y que la población se encuentra en crecimiento demográfico o ha sufrido una reciente expansión demográfica[90].

Realizando el análisis para cada población se observa solamente para La Tiburonera una distribución unimodal, y para las demás poblaciones (San Jorge, El Pajal, La Playa y Bajito Vaquería) la distribución es multimodal, representando que éstas poblaciones son desiguales y estacionarias[91], estas distribuciones multimodales también se pueden explicar porque puede haber reducido considerablemente el tamaño efectivo de la población y por lo tanto llevó a un desajuste multimodal[92], igualmente indica que las poblaciones están en equilibrio demográfico después de haber pasado por un cuello de botella[93].

[86] ARDILA C. L. y CANTERA, R. Op. Cit. p. 96.
[87] GONZÁLEZ, J. Op. Cit. p. 80.
[88] MOSQUERA, Op. Cit. p. 1069.
[89] Ibid., p. 120.
[90] SCHNEIDER, Stefan and EXCOFFIER, Laurent. Estimation of Past Demographic Parameters From the Distribution of Pairwise Differences When the Mutation Rates Vary Among Sites: Application to Human Mitochondrial DNA. Genetics Society of America.vol. 152.1999. p. 1079.
[91] HARPENDING, H.C., BATZER, M.A., GURVEN, M., JORDE, L., ROGERS, A.R., SHERRY, S.T. Genetic traces of ancient demography. Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol. 95. 1998. p. 1963.
[92] SCHNEIDER and EXCOFFIER. Op Cit. p. 1084.
[93] SCHNEIDER & EXOFFIER. Op. Cit. p. 1079

## 7.2. ESTRUCTURA GENÉTICA EN *A. tuberculosa*

El análisis molecular de varianza evidenció que el 4.201 % de la variación total observada ($F_{ST}$=0.04201, p<0.05) se explica porque no existe variación entre las poblaciones, lo que evidencia que no existe una estructura poblacional de esta especie para el gen COI en las cinco poblaciones estudiadas en La Ensenada de Tumaco.

El análisis de diferenciación por pares de poblaciones, indica que no existen diferencias significativas entre las poblaciones El Pajal y San Jorge, La Playa y San Jorge, El pajal y La Tiburonera, Bajito Vaquería y La Tiburonera, ni entre Bajito Vaquería y El Pajal. De este modo, se acepta la hipótesis nula y por lo tanto, existe igualdad entre las poblaciones mencionadas. Sin embargo, el análisis también evidencia que existe estructuración entre las poblaciones La Tiburonera y San Jorge, Bajito Vaquería y San Jorge, La Playa y La Tiburonera, La Playa y El Pajal, así como entre Bajito Vaquería y La Playa. El valor de $F_{ST}$ para estas poblaciones indica que tienen las frecuencias de los alelos casi idénticas ya que todas presentan valores cercanos a cero[94], este valor también indica que la mayoría de haplotipos están compartidos y tienen frecuencias similares[95].

Los valores de $F_{ST}$ reportados en el presente estudio fueron menores a los reportados en estudios para otros moluscos. Shen *et al*. [96], reportó índices de distancia genética de 1.735 a 0.099 en las poblaciones analizadas en su estudio para *Mytilus coruscus.* Otro estudio de Da Costa Pereira[97], realizado para el bivalvo *Ruditapes decussatus* utilizando como marcador molecular RAPD-PCR para estimar la diversidad genética encontró estructura poblacional $F_{ST}$ = 0.2393, siendo igualmente mayor a la encontrada en el presente estudio (0.04201).

De acuerdo con el ciclo de vida de *A. tuberculosa,* en la fase larvaria esta especie es planctónica ubicándose en aguas oceánicas y depende de varios factores el lugar donde cada individuo realice la fijación. Por lo anterior, la distribución del organismo de estudio en La Ensenada de Tumaco es aleatorio,

[94] McManus, Concepta; PAIVA, Samuel; SPOTO-CORREA, Patrícia; SEIXAS, Luiza; BARROS DE MELO, Cristiano. Estadísticas para descrever genética de populações. Serie técnica: Genética. Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira. 2011. 1 – 50 pp.
[95] LAYTON, Op. Cit. p. 27.
[96] SHEN et al., Op Cit. p. 243.
[97] DA COSTA PEREIRA, Jorge Cláudio. PERFIS DE RAPD-PCR EM POPULAÇÕES DE R. DECUSSATUS (LINNAEUS, 1758) DO SUL DE PORTUGAL: - AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA. Mestre em Genética em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica. UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO VILA REAL, 2008. p. 138.

evidenciando la existencia de flujo génico entre los manglares estudiados, efecto contrario de la deriva génica.

## 7.3. ESTRUCTURA FILOGENÉTICA EN *A. tuberculosa*

Todos los organismos que existen en la tierra son el resultado de la evolución. Si la historia evolutiva o filogenia de un organismo se reconstruye, este organismo se conecta con linajes de otros organismos a través de ancestros comunes. De acuerdo con el criterio de similitud por posición, existen caracteres que pueden ser homólogos basándose en la posición topográfica, geométrica y de relación con respecto a otras estructuras corporales del organismo, en el presente estudio existen caracteres que pueden ser homólogos debido al criterio de similitud por posición entre las secuencias de los individuos 36 y 68 de *A. tuberculosa* con las secuencias de grupo externo de *A. similis* y *A. grandis*, debido a que parten de la misma rama en el árbol construido.

Las secuencias alineadas del gen mitocondrial COI, permiten observar las relaciones filogenéticas para *A. tuberculosa* en las cinco zonas muestreadas, evidenciando flujo génico entre las poblaciones. De acuerdo con los resultados de la filogenia se puede observar la formación de grupos heterogéneos con individuos de diferentes manglares, afirmando que las poblaciones de piangüa no se distribuyen de acuerdo a la ubicación geográfica.

Un estudio realizado por Marko[98], para la familia arcidae evidenció la interrupción del flujo génico en algunas especies distribuidas en el caribe y el pacifico, atribuidas al cambio climático y efectos oceanográficos relacionados con el Istmo de Panamá. En el presente estudio se puede discutir la restricción del flujo génico debido a la instalación de encierros en algunos manglares, así como atribuirlo a la extracción de individuos antes que hayan transmitido su información genética, al no respetar la talla mínima de captura.

Sin embargo y de acuerdo con Zhaxybayeva y Gogarten[99], usando genes individuales como marcadores filogenéticos, es difícil trazar la filogenia de organismos en presencia de transferencia horizontal de genes. Todas las moléculas contemporáneas tienen su propia historia que se remonta a un ancestro molecular individual. Pero, es probable que estos ancestros moleculares estuvieran presentes en distintos organismos en tiempos distintos.

[98] MARKO. Op. Cit. p. 2009.
[99] ZHAXYBAYEVA Olga and GOGARTEN Peter. Cladogenesis, coalescence and the evolution of the three domains of life. TRENDS in Genetics vol.20 no..4. 2004. 186 p.

Las secuencias de COI nos permiten estimar parámetros genéticos en las poblaciones de bivalvos debido a que son altamente conservados, presentan alta tasa de mutación y son universales. Sin embargo, se podría utilizar otro tipo de marcador molecular, como los SNP o microsatélites que son codominantes.

Por último, el equilibrio Hardy-Weinberg sirve como hipótesis nula, planteando los supuestos de una población donde no actúan las fuerzas de evolución y las frecuencias alélicas se mantienen en las generaciones. Dicha hipótesis se prueba mediante prueba de chi cuadrado ($X^2$) o por el índice de fijación f. En el presente trabajo se realizó una prueba Fs de fu (- 2.956) indicando la influencia de selección, violando uno de los supuestos de equilibrio y permitiendo afirmar que existe evolución en la población analizada. Sin embargo, es necesario observar las frecuencias de homocigotos y heterocigotos, que en el presente estudio no fue observado debido a la herencia dominante del marcador.

Finalmente, los resultados obtenidos permiten concluir que las poblaciones de *A. tuberculosa* distribuidas en cinco islas de manglar en La Ensenada de Tumaco, no presentan estructura genética, debido a que no se encontró diferenciación entre las poblaciones estudiadas y los resultados de la estructura filogenética corroboran que las cinco zonas trabajadas son una sola población. No obstante, el uso de un solo gen, nuclear o mitocondrial, en algunos casos puede ser arriesgado, ya que implica un único locus, el cual puede estar ligado a selección, puede presentar introgresión o puede que no sea posible identificar su dispersión entre poblaciones como consecuencia de diferencias etológicas o ecológicas entre hembras y machos o entre especies[100]. Razón por la cual se recomienda ampliar este estudio a la caracterización molecular usando otros marcadores moleculares de herencia codominate.

[100] AVISE, John. Phylogeography: retrospect and prospect. Journal of Biogeography vol. 36. 2009. p. 7.

# 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 8.1. CONCLUSIONES

Se estandarizó el protocolo de extracción de ADN a partir de tejido conservado para *A. tuberculosa* modificado de Aljanabi y Martinez.

Se estandarizó la amplificación del gen Citocromo Oxidasa Subunidad I mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *A. tuberculosa*, con un volumen final de 25 µl que contiene 1.25 µl de ADN; 2 mM de dNTPs; 1 µM de cebador forward (LCO1490) y 1 µM de reverse (HCO2198); 2.5 mM de $MgCl_2$; 0.5 unidades de Taq polimerasa (Promega) y se completó el volumen con agua libre de nucleasas. Se utilizó 1 ciclo de denaturación 5 minutos a 94 °C; seguido de 35 ciclos de hibridación, compuestos por 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 50 °C y 1 minuto a 72 °C; finalmente un ciclo de extensión por 7 minutos a 72 °C.

Por primera vez se reporta para Colombia el uso del gen mitocondrial COI, como marcador en el estudio de la diversidad genética, en la especie *A. tuberculosa*. Deduciendo que el uso del gen mitocondrial es útil para estimar la diversidad y estructura genética en la especie de estudio.

Se obtuvo 74 secuencias de *A. tuberculosa* con porcentajes de identidad mayores al 95 %, en estas secuencias se encontraron 99 mutaciones que describen 21 haplotipos.

La diversidad haplotípica reportada para todas las poblaciones fue alta moderada (0.683 ± 0.060), así como la de cada población estudiada: San Jorge 0.943 ± 0.040, La Tiburonera 0.859 ± 0.063, El Pajal 0.879 ± 0.058, La Playa 0.882 ± 0.052 y Bajito Vaqueria 0.962 ± 0.040. Evidenciando que, a pesar que se ha observado una disminución en la densidad de la población de *A. tuberculosa* en los manglares, no existe una disminución en la variabilidad genética.

La diversidad nucleotídica reportada en general fue baja para todas las poblaciones de 0.03999 ± 0. 01954 y para cada población estudiada fue para San Jorge 0.0127 ± 0.0033, La Tiburonera 0.0142 ± 0.0026, El Pajal 0.0956 ± 0.0662, La Playa 0.0078 ± 0.0010 y Bajito Vaqueria 0.1029 ± 0.0621.

El análisis molecular de varianza no evidenció una estructura genética $F_{ST}$ = 0.04201 ($p<0.05$) entre poblaciones, por lo tanto, se considera una sola población, pero si existe estructura genética dentro de las poblaciones, hecho justificado por la variación entre individuos.

Los valores de $F_{ST}$, encontrados en el análisis por pares de poblaciones, permiten concluir que no existe estructura genética entre las poblaciones El Pajal y San Jorge, La Playa y San Jorge, El pajal y La Tiburonera, Bajito Vaquería y La Tiburonera, ni entre Bajito Vaquería y El Pajal. Pero, el análisis también evidencia que existe estructuración moderada entre las poblaciones La Tiburonera y San Jorge, Bajito Vaquería y San Jorge, La Playa y La Tiburonera, La Playa y El Pajal, así como entre Bajito Vaquería y La Playa.

Los resultados del presente estudio son una base fundamental para estudios futuros encaminados a la conservación de este valioso recurso, permitiendo comparar dichos resultados con futuras investigaciones. Igualmente contribuyen con la conservación de la especie siendo una base genética para estrategias de repoblamiento dentro de La Ensenada de Tumaco.

Los resultados de la estructura filogenética, corrobora que no existe estructuración entre las poblaciones y que a pesar que se encuentran aisladas geográficamente, existe flujo génico, de acuerdo con la genética de poblaciones mediante el modelo de islas de Wrigth.

## 8.2. RECOMENDACIONES

Continuar con estudios genéticos que permitan generar nuevo conocimiento sobre el estado de *A. tuberculosa* no solo en Nariño sino también en todas las localidades donde este organismo se distribuye dentro de Colombia.

Tomar como base los resultados del presente estudio para evaluar futuramente la disminución de la variabilidad genética en estudios futuros para esta especie dentro de los manglares analizados.

Obtener el genoma completo para *Anadara tuberculosa* y/o aportar más información a la base de datos de Genbank.

Ampliar el análisis genético a un estudio multilocus, que permita el uso combinado y comparativo de genealogías obtenidas de datos de ADN mitocondrial y ADN nuclear.

Como perspectiva a futuro, los resultados aportados con la presente investigación permiten indagar genes asociados con la sobrevivencia en la larvicultura, factor limitante en la domesticación de *A. tuberculosa*.

A partir de las secuencias obtenidas en este estudio se propone profundizar en investigaciones encaminadas a determinar si existe doble herencia uniparental para *A. tuberculosa,* presente en algunos moluscos bivalvos.

## BIBLIOGRAFÍA


ALJANABI, Salah and MARTINEZ, Iciar. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based tecniques. In: Nucleic Acids Research 1997. vol. 25 no. 22. p. 4692 – 4693. Available from internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC147078/pdf/254692.pdf>.

ÁLVAREZ LEÓN, Ricardo y BRAVO PAZMIÑO, Hernando. Moluscos y crustáceos asociados a los manglares del Pacífico colombiano y aprovechados por las comunidades negras. Proyecto Conservación y manejo para el uso múltiple y el desarrollo de los manglares en Colombia. Informe técnico No 29. Ministerio del Medio Ambiente ACOFORE-OIMT. Bogotá. 1998.

ARDILA C. L. y CANTERA, R. Diagnóstico de la pesca artesanal de moluscos en algunas regiones del Pacífico Colombiano. En: Simposio Internacional de los Recursos Vivos y las Pesquerías en el Pacífico Sudeste, Viña del Mar. Chile, 1989. p. 397.

ARDILA, Nestor y DÍAZ, Juan Manuel. *Anadara tuberculosa*, 96 - 98. En N. Ardila, G. R. Navas, y J. Reyes (Eds.). 2002. Libro rojo de los invertebrados marinos de Colombia. INVEMAR. Ministerio del Medio Ambiente. La serie Libros rojos de especies amenazadas de Colombia. Bogotá, Colombia. p. 96.

ARTUNDUAGA, E. y MORA, O. Diagnóstico sobre la pesca industrial y artesanal en el Pacífico colombiano. En: Conservación y Uso sostenible de los manglares del pacífico colombiano 1998. Ministerio de Medio Ambiente, Revista Divulgación Pesquera 1975 vol. 5 no. 5. Colombia. p. 37-60.

ASTORGA, Marcela. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. En: LOVATELLI, A., FARÍAS, A. y URIARTE, I. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. Puerto Montt, Chile. 2008. p. 277–287.

Barcodes of Life. The Mitochondrial Genome. [Esquema]. s.f. Available from internet: < http://www.dnabarcoding.ca/primer/Popups/Mit_genome.html >

BARRERA, Carolina y MARTINEZ, Oscar. Identificación molecular de los alelos del gen de la beta caseína (β-Cs) mediante PCR-RFLP y su relación con la producción de leche, grasa, proteína y el rendimiento en cuajada en hembras holstein del trópico alto de Nariño. Trabajo de grado Zootecnista. Pasto, Colombia. Universidad de Nariño. 2011. p. 105.

BORDA, Carlos y CRUZ, Raúl. Pesca artesanal de bivalvos (*Anadara tuberculosa* y *A. similis*) y su relación con eventos ambientales del Pacífico colombiano. En: Revista de Investigación Marina [online]. 2004. vol. 25 no 3. p. 197-208. Disponible en internet: < http://www.bio-nica.info/biblioteca/Borda2004.pdf>

BRAVO PAZMIÑO, Hernando; SANCHEZ, Heliodoro; ALVAREZ-LEON, Ricardo; GUEVARA, Omar Ariel; ZAMORA, Alejandro y RUBIANO, Diego José. Diversidad cultural y manglares del Pacífico colombiano. Bogotá, Ministerio del Medio Ambiente, Asociación Colombiana de. 1998. p. 360.

BRETON, Sophie; DOUCET, Helene; STEWART, Donald T.; HOEH, Walter R. and BLIER, Pierre U. The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough?. TRENDS in Genetics Vol. 23 no.9. 2007. p. 465 – 474.

BROWN, Wesley; GEORGE, Matthew and WILSON, Allan. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. In: Proceedings of the National Academy of the U S A 1979 [online]. vol. 76 no. 4. 1979. pp. 1967-1971. Available from internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC383514/>

CHEE, S.Y.; DEVAKIE, M.N. and SITI AZIZAH, M.N.. Phylogenetic study and barcoding of the blood cockle, *Tegillarca granosa*, found on the west coast of peninsular Malaysia using the COI gene. In: Genetics and Molecular Research 2011. vol. 10, no. 2. p. 1237-1244. Available from internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21732288>.

CRUZEIRO, Catarina. Population genetic structure of Scrobicularia plana along the Atlantic coast and comparison with Macoma balthica. Royal Netherlands Institute for Sea Research. 2009. p. 23. Disponible en la web: < http://www.nioz.nl/tl_files/Docs%20website%20editor/Diensten/Bibliotheek/NIOZ%20rapporten/nioz-report_2009-6.pdf>

DA COSTA PEREIRA, Jorge Cláudio. PERFIS DE RAPD-PCR EM POPULAÇÕES DE *R. decussatus* (LINNAEUS, 1758) DO SUL DE PORTUGAL: - AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA. Mestre em Genética em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica. UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO VILA REAL, 2008. p. 138.

DE LA ROSA, Leonardo Mario. Estructura genética y conectividad migratoria de las agregaciones invernantes de *Calidris mauri* (Charadiiformes: Scolopacidae) en Méxoco. Tesis de maestria en ciencias en Ecología molecular y Biotecnología: Ensenada, Baja California. Universidad autónoma de Baja California. 2012. p. 70.

DERAZO, Janeth. Estudio de la variabilidad genética del matrinchá (*Brycon orthotaenia*), mediante marcadores moleculares microsatélites. Trabajo de

grado de Ingeniero en Producción Acuícola. Pasto, Colombia. Universidad de Nariño. 2007. p. 124.

ESPINOSA, S., L. A. ZAPATA, C. CANDELO, M. X. ZORRILLA, ARTEAGA, G., DELGADO, M. F., OROBIO, B. y GIL-AGUDELO D. L. Diagnóstico de especies amenazadas: Estado actual de las poblaciones de piangüa *Anadara tuberculosa* en la costa pacífica colombiana. 261-268. En: Informe del Estado de los Ambientes Marinos y Costeros en Colombia: 2006. Serie de Publicaciones Periódicas No. 8, Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR, Santa Marta. 2007. p. 378.

ESPINOSA, Silvana; DELGADO, Maria Fernanda; OROBIO, Bernardo; MEJÍA, Luz Marina y GIL-AGUDELO, Diego. Estado de la población y valoración de algunas estrategias de conservación del recurso piangua *Anadara tuberculosa* (Sowerby) en sectores de Bazán y Nerete, costa pacífica nariñense de Colombia. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - Vol. 39 (1). 2010. p. 161 – 173. Disponible en internet: < http://www.scielo.org.co/pdf/mar/v39n1/v39n1a09.pdf>

EXCOFFIER, Laurent; LAVAL, Guillaume and SCHNEIDER, Stefan. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis Arlequin ver 3.1. 2006. Disponible en la web < http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>
FAO. Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. En: La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Sección C, Parte 4. p. 393 – 416. Disponible en internet: <http://www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s17.pdf>.

FISCHER, W., F. KRUPP, W. SCHNEIDER, C. SOMMER, K. E. CARPENTER y V. NIEM. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca Pacífico centro-oriental: plantas e invertebrados. Volumen I, FAO, Roma. p. 1995. 646.

FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R. y VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Center for Theoretical and Applied Genetics and Institute of Marine and Coastal Science, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey. Molecular Marine Biology and Biotechnology 1994. p. 294-299.

GODOY J.A. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. En: Ecosistemas, enero 2009 [online]. vol. 18 no.1. p. 22. Disponible en internet: <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=593> ISSN 1697-2473

GONZÁLEZ, J. Reglas de manejo, percepciones y estado del recurso piangua (*Anadara tuberculosa*): caso ASCONAR. Informe técnico ASCONAR, Tumaco, Colombia. 2006. p. 89.

GOOGLE EARTH. 2013. Disponible en internet: <http://www.google.com/earth/index.html>

HAAVIE, J.; SAETRE, G.-P.; POUM, T. Discrepant in population differentiation at microsatellites, mitochondrial DNA an plumagem colour in the pied flycatchet – inferring evolutionary processes. Molecular Ecology, vol. 9.2000. p. 1137-1148.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. vol. 41. 1999. p. 95-98.

HARPENDING, H.C., BATZER, M.A., GURVEN, M., JORDE, L., ROGERS, A.R., SHERRY, S.T. Genetic traces of ancient demography. Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol. 95. 1998. p. 1961–1967.

HARRISON, Richard. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. In: Treend in ecology and evolution, January 1989. vol. 4 no. 1. p. 6-11.

LAYTON, Kara. Examining patterns of genetic variation in Canadian marine molluscs through DNA barcodes. Tesis de maertría. Guelph, Ontario, Canada University of Guelph. 2012. p. 76.

LIBRADO p. and ROZAS J. DnaSP v5 a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics vol. 25. 2009. p. 1451 – 1452.

LORENZANO, P. Bass Van Frassen y la Ley de Hardy-Weinber: una discusión y desarrollo de su diagnóstico. En: Universidad Nacional de Quilmes-CONICET 2008 [online]. vol. 12 no. 2. pp. 54 – 121. Disponible en internet: < http://www.cfh.ufsc.br/~principi/p122-1.pdf>, Citado por Ibid., p. 49.

MacKENZIE, Clyde. The fisheries for mangrove cockles, *Anadara* spp., from Mexico to Peru, with descriptions of their habitats and biology, the fishermen's lives, and the effects of shrimp farming. In: Marine Fisheries Review 2001 [online]. vol. 62 no. 1. p. 1-39. Available from internet: < http://spo.nwr.noaa.gov/mfr631/mfr6311.pdf>

MARKO, Peter. Fossil Calibration of Molecular Clocks and the Divergence Times of Geminate Species Pairs Separated by the Isthmus of Panama. Molecular Biology and Evolution vol. 19 no. 11. p. 2005-2021.

McManus, Concepta; PAIVA, Samuel; SPOTO-CORREA, Patrícia; SEIXAS, Luiza; BARROS DE MELO, Cristiano. Estadísticas para descrever genética de populações. Serie técnica: Genética. Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira. 2011. p. 1-50.

MORAIS, SA y MARRELLI, MT. Citocromo c Oxidase I em subespécies do complexo *Culex pipiens* sul americano. Em: 55° Congresso Brasileiro de Genética, 30 de agosto a 2 de setembro de 2009 [online]. São Paulo, Brasil. p. 235. Disponível na internet: <http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs2009/GA235-28614.pdf >. ISBN 978-85-89109-06-2

MORAIS, SA y MARRELLI, MT. Citocromo c Oxidase I em subespécies do complexo Culex pipiens sul americano. En: 55° Congresso Brasileiro de Genética. 30 de agosto a 02 de setembro de 2009. São Paulo, Brasil. p. 235.

MORITZ, C.; DOWLING, T.E.; BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. In: Annual Review of Ecology and Systematics1987 [online]. vol. 18, p. 269-292. Available from internet:<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.es.18.110187.001413?journalCode=ecolsys.1>

MOSQUERA, A. I. La contaminación orgánica, un posible precursor de la Eutroficación en aguas de la Ensenada de Tumaco. Vol 2. p. 1067-1083. En: VII seminario Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar. Santa Marta. Colombia. 1992. p. 1067-1083.

NAGYLAKI, T. Fixation Indices in Subdivided Populations. In: Genetic Society of America 1998 [online]. Citado por Ibid., p. 50.

OCAMPO, Patricia y CANTERA, Jaime. Moluscos asociados a los principales ecosistemas de la ensenada de Utría, Pacífico colombiano. En: Memorias VI Seminario Nacional de Ciencia y Tecnología Marina. Comisión colombiana de Oceanografía. Colombia [online]. 1988. p. 87-92.

PIÑERO, Daniel. La diversidad genética como instrumento para la conservación y aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. Capital natural de Mexico, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México. p. 437 – 494. Disponible en: <http://www.academia.edu/412237/La_Diversidad_Genetica_Como_Instrumento_Para_La_Conservacion_Y_El_Aprovechamiento_De_La_Biodiversidad_Estudios_En_Especies_Mexicanas>

POWELL, J.R. et al. Rates of nucleotide substitution in Drosophila mitochondrial DNA and nuclear DNA are similar. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 83, 1986. p. 9090-9093.

PRAHL, Henry; CANTERA, Jaime y CONTRERAS, Rafael. Manglares y hombres del Pacífico. Fondo FEN Colombia. Editorial Presencia, Bogotá, Colombia. En: Revista de Investigación Marina 1990. p. 197-208.

RODRIGUEZ, Iram Y BARRERA, Hugo. La reacción en la cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. En: Ciencia UANL. Julio – Septiembre 2004. vol. 7, no. 3. p. 323 – 335.

ROGERS, Alan and HARPENDING, Henry. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. Mol. Bid. Evol. vol. 9, no. 3. 1992. p. 552-569.

SAHLS, G.; NYBLOM, K. Philogenetic analysis of the genus Cheilosia (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. Mol. Phylogen. Evol., vol. 15. 2000. p. 235-241.

SCHNEIDER, Stefan and EXCOFFIER, Laurent. Estimation of Past Demographic Parameters From the Distribution of Pairwise Differences When the Mutation Rates Vary Among Sites: Application to Human Mitochondrial DNA. Genetics Society of America vol. 152. 1999. p. 1079–1089.

Sección Cartográfica del Departamento de Mantenimiento de la Paz de Naciones Unidas. Referencia: Mapa No. 4170 Rev.4, Enero 2004. Disponible en internet: <http://wwis.aemet.es/057/c00888m.htm>
Servicio de información Meteorológica Mundial. Información del tiempo para Tumaco. Disponible en internet: < http://wwis.aemet.es/057/c00888.htm#climate>

SHEN Yu-bang, LI Jia-le, FENG Bing-bing. Genetic Analysis of Cultured and Wild Populations of Mytilus coruscus Based on Mitochondrial DNA. ZOOLOGICAL RESEARCH vol. 10 no. 3. 2009. p. 240-246.

SNEATH PHA & SOKAL RR. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco. 1973. sp.

SPERLING, Felix; ANDERSON Gail and HICKEY Donald. A DNA-Based Approach to the Identification of Insect Species Used for Postmorten Interval Estimation. ASTM International. 1994. p. 418 – 427.

SPIELMAN, Derek; BROOK, Barry and FRANKHAM, Richard. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004. vol 101, no. 52. p. 15261-15264.

Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. vol. 25. 1997. 3389-3402 pp.

TAMURA K, DUDLEY J, NEI M & KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and

Evolution vol. 24. 2007. p. 1596-1599. (Publication PDF at http://www.kumarlab.net/publications).

TAMURA K, NEI M & KUMAR S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (*USA*) vol. 101. 2004. p. 11030-11035.

TOSCANO, Carlos; CATANESE, Gaetano; FUNES, Victoria; PEREZ, Laura y MANCHADO, Manuel. Marcadores moleculares mitocondriales, estudios poblacionales y filogenia. En: I Jornada científico-técnicas Andalucía-Marruecos [online]. Disponible en internet: <http://dldregister.uca.es/030-jornadas_y_conferencias/010-1jornadas-cientifico-tecnicas-andalucia-marruecos/resumenes/doc-en/InfanteC-ver.pdf >

TURGEON, D.; QUINN, J. F.;. BOGAN, A. E; COAN, E. V.; HOCHBERG, F. G.; LYONS, W. G. *et al.* Common and scientific names of aquatic invertebrates from the United States and Canada: Mollusks, 2nd ed. In: American Fisheries Society Special Publication 26 [online]. 1998. p. 526. Available from internet: <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=567221&print_version=PRT&source=to_print>

WOLSTENHOLME, D.R. Animal mitochondrial DNA: structure and evoluting. In: Mitochondrial Genomes (eds. D.R. Wolstenholme e K.M. Joen), Academic Press, San Diego. 1992. p. 173-216.

WORLD WRESTLING FEDERATION. Diagnostico socioeconómico del sector piangüero y estado actual del recurso hidrobiológico Piangüa *Anadara tuberculosa* en la costa pacífica de Nariño. Fondo Mundial para la Naturaleza WWF, Cali. 2005. p. 35.

YAN WEI FENG; QILI LING and FENG KONG. Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci in the ark shell *Scapharca subcrenata* (Bivalvia:Arcidae). In: Conservation Genetics 2009. vol. 10 no. 4. p. 1125-1127.

# ANEXOS

# Anexo A. Protocolo de extracción de ADN de bivalvos. Concepto Azul



**Componentes del Kit:**

**Reactivos extracción de ADN**

| | |
|---|---|
| Solución lavado # 1 (3 x 40 mL) | 120 mL |
| Tampón de lisis | 40 ml |
| Reactivo pK | 160 µL |
| RNAsa | 80 µL |
| Solución de purificación # 1 | 24 mL |
| Solución de purificación # 2 | 48 mL |
| Solución de precipitación # 1 | 48 mL |
| Solución de lavado # 2 (2x32 mL) | 64 mL |
| Solución de resuspensión | 4 mL |

**Materiales y equipos adicionales necesarios no provistos:**

| | |
|---|---|
| Juego de Micropipetas | Baño de agua |
| Microtubos 1.5 mL libre de DNase/RNase | Microcentrifuga |
| Puntas con filtro libre de DNase/RNase | Refrigerador/Congelador -20ºC |
| Guantes de látex sin polvo | Cronómetro |
| Vortex (Homogenizador) | Jeringuillas 1 cc (hemolinfa) |

**Condición de almacenamiento:**

Las soluciones de extracción son estables a temperatura ambiente por un período de 6 meses., Una vez recibido el kit, los reactivos deben ser conservados a 4°C. El reactivo pK debe ser conservado a -20°C.
Se recomienda distribuir los reactivos, en alícuotas más pequeñas, dependiendo de la frecuencia de análisis de muestras.

**Recomendaciones preliminares:**

El material a utilizar debe ser estéril y libre de DNasas/RNasas.
El reactivo de precipitación y de lavado # 2, deben ser colocados en el congelador a -20ºC, antes del uso, debido a que se utilizan bien frío.

Telefax: (593 04) 2 284 066 - 2 284 615 / email: concepto@gye.satnet.net

*Concepto Azul S.A.*

**PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE BIVALVOS**

La toma de muestra debe ser realizada con precaución, a fin de evitar contaminaciones cruzadas con otros organismos invertebrados.

Las muestras pueden ser fijadas en etanol de 95% en caso de no poderlas analizar el mismo día del muestreo.

-Tomar entre (50-100) mg de tejido fresco o fijado y colocarlo en un microtubo de 1.5 ml de capacidad.

-Lavar el tejido colocando 500 µL de solución de lavado # 1, mezclar en el vortex y eliminar el líquido por completo con la ayuda de una pipeta. Realizar el lavado una sola vez si la muestra es fresca y hasta 3 veces si ha sido fijada.

-Macerar el tejido completamente (utilizar un macerador estéril) e inmediatamente adicionar 500 µl de tampón de lisis y homogenizar.

-Agregar 2 µl del reactivo PK y 1 µl de RNasa, homogenizar en el vortex e incubar en baño maría a 55 °C por 2 horas.

-Agregar 300 µl solución de purificación #1 y 300 µl solución de purificación # 2. Mezclar manualmente invirtiendo el tubo durante 1 minuto.

-Centrifugar a 10 000 rpm por 10 minutos a 5 °C. Transferir entre 300 y 400 µl de sobrenadante, a un nuevo microtubo.

-Adicionar 300 µl de solución de purificación # 2, mezclar manualmente invirtiendo el tubo por 5 veces.

-Centrifugar a 10 000 rpm por 10 minutos a 5 °C. Transferir entre 200 a 300 µl de sobrenadante, a un nuevo microtubo.

-Agregar solución de precipitación # 1, dos veces el volumen del sobrenadante recuperado (400 a 600 µl). Mantener a -20°C por 15 minutos y centrifugar 13 000 rpm por 10 minutos a 5 °C.

-Eliminar cuidadosamente el sobrenadante y adicionar 800 µl de solución de lavado #2. Centrifugar a 10 000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente.

-Eliminar totalmente el sobrenadante y dejar secar el precipitado (ADN) con el tubo abierto cerca de un mechero por un máximo de 15 minutos.

-Resuspender el precipitado de ADN en 50 µl de solución de resuspensión, previamente calentada a 65 °C y luego conservar a -20 °C. para su amplificación.

Telefax: (593 04) 2 284 066 - 2 284 615 / email:

## **Anexo B. Protocolo estandarizado de extracción de ADN a partir de tejido de *A. tuberculosa.***

**Materiales**:

- Agua destilada
- Tampón Salino - NaCl 0,4M; Tris-HCl 100mM pH 8 y EDTA 2 mM pH 8.
- SDS 20%
- Proteinasa K (20mg/ml)
- NaCl 5M
- Isopropanol
- Etanol 70%
- TE
- RNAsa (20mg/ml)

**Procedimiento**:

- Tomar de 50 a 100 mg de tejido conservado y lavar con 500 µL agua destilada 3 veces utilizando el Vortex.
- Macerar por aproximadamente 1 a 2 minutos y adicionar inmediatamente 400 µL de tampón salino (NaCl 0,4M; Tris-HCl 100mM pH 8 y EDTA 2 mM pH 8).
- Adicionar 80 µL de SDS al 20% y 16 µL de proteinasa K (20mg/ml) y mezclar por inversión 1 minuto.
- Incubar las muestras a 55 – 65 °C por 16 horas, o el tiempo necesario para que las muestras queden bien digeridas y homogéneas.
- Adicionar 300 µL de NaCl 5M y mezclar por inversión 5 veces.
- Centrifugar a 10.000 rpm por 35 minutos.
- Transferir 400 µL de sobrenadante a um nuevo microtubo.
- Adicionar el mismo volumen de isopropanol y mezclar por inversión.
- Incubar las muestras a -20 °C de 15 a 60 minutos.
- Centrifugar a 10.000 rpm por 20 minutos y descartar el sobrenadante.
- Adicionar 300 µL de etanol 70%.
- Centrifugar a 10.000 rpm por 5 minutos y descartar el sobrenadante, si se observa coloración marrón repetir este procedimiento 2 veces.
- Dejar secar cerca de un mechero, por máximo 15 minutos.
- Resuspender el pellet adicionando de 150 µL de TE y adicionar de 10 µL de RNAsa (20mg/ml).

La cuantificación y verificación de la calidad del ADN de las muestras se deben analizar en el gel de agarosa al 2%.
En caso de presentar restos de ARN o ADN hacer tratamiento con RNAsa Adicionando 1 µL (25 mg/ml) a cada tubo e incubar a 37 °C por 1 hora, finalmente se inactiva la enzima a 64 °C por 10 minutos. Después de obtener el ADN de se procede a realizar la reacción en la cadena de la Polimerasa (PCR).

# Anexo C. Protocolo de amplificación de un gen de bivalvos mediante simple PCR. Concepto Azul

*Concepto Azul S.A.*

**Componentes del Kit:**

| | |
|---|---|
| Master Mix 2X | 1250 µL |
| Solución 1 | 1100 µL |
| Primer F | 50 µL |
| Primer R | 50 µL |
| Control positivo | 15 µL |

**Reactivos adicionales necesarios no provistos:**

Agarosa (para gel)
Bromuro de Etidio
TAE (1X)

**Materiales adicionales necesarios no provistos:**

| | |
|---|---|
| Juego de Micropipetas | Termociclador |
| Microtubos libre de DNase/RNase | Equipo para electroforesis |
| Puntas con filtro libre de DNase/RNase | Refrigerador/Congelador -20ºC |
| Guantes de látex sin polvo | Vortex (Homogenizador) |

**Condición de almacenamiento:**

Los reactivos de PCR, son estables por un período de 6 meses., conservados a temperaturas bajas de -20ºC., y se recomienda distribuirlo en alícuotas de volúmenes pequeños para evitar repetida congelación y descongelación.

**Recomendaciones preliminares:**

El material a utilizar debe ser estéril y libre de DNasas/RNasas.
Se debe trabajar usando hielo para mantener la temperatura baja durante todo el proceso de preparación de la mezcla.

Telefax: (593 04) 2 284 066 - 2 284 615 / email: concepto@gye.satnet.net

*Concepto Azul S.A.*

**PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DE UN GEN DE BIVALVOS MEDIANTE SIMPLE PCR**

**Preparación del mix de PCR**

La preparación del Mix de PCR y el manejo de las muestras debe realizarse sobre hielo. Deben utilizarse puntas con filtros y guantes.

Para cada prueba se debe incluir un control positivo C (+) que sirve como testigo del buen funcionamiento de la reacción y un control negativo C (-) que sirve como testigo para confirmar que los reactivos no están contaminados.

Para la preparación del Mix de PCR, se debe calcular el número de reacciones considerando el número de muestras a analizar más el C (+), el C (-) y una reacción adicional.
**N=** número total de reacciones.

**N** = número de muestras + C (+) + C (-) + 1

| REACTIVOS | Para 1 reacción | Para N reacciones |
|---|---|---|
| Mastermix 2X | 25 µL | ___ µL |
| Solución 1 | 22 µL | ___ µL |
| Primer F | 1 µL | ___ µL |
| Primer R | 1 µL | ___ µL |
| **Volumen Final** | **49 µL/reacción** | |

- Colocar 49 µL del mix de PCR en los microtubos de PCR.
- Colocar 1 µL del ADN extraído de la muestra, a cada tubo de reacción y homogenizar.
- Cubrir con 20 µL de aceite mineral (si se requiere).
- Colocar las muestras en el termociclador.

**Programación del termociclador**

1 Ciclo inicial a:
95 ºC → 5 minutos

35 Ciclos a:
94ºC 30 segundos
50ºC 45 segundos
72ºC 1 minuto

1 Ciclo final a:
72ºC 7 minutos
4ºC hasta sacar los tubos

Telefax: (593 04) 2 284 066 - 2 284 615 / email: concepto@gye.satnet.net

**Electroforesis**

Los productos de la PCR deben ser analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa.

Tomar 15 µL del producto de PCR y mezclar con 3 µLde tampón de depósito 6X Depositar la mezcla en un gel de agarosa al 2 %.

El orden de depósito de las muestras

1) C(+) 2) Muestras analizadas 3) $C_{ext}$(-) 4) $C_{react}$(-)

Debe utilizarse un marcador de peso molecular (no incluido en el kit) para identificar el tamaño de los fragmentos generados.

Después de la separación electroforética observar resultados en el trans-iluminador (luz UV).

**Interpretación**

Se considerará positiva aquella muestra que presente una banda al mismo nivel que los controles positivos. En la reacción de PCR se genera un fragmento de alrededor de 650 pb. Los controles negativos aparecen sin banda, observándose una fluorescencia solo a nivel de los iniciadores

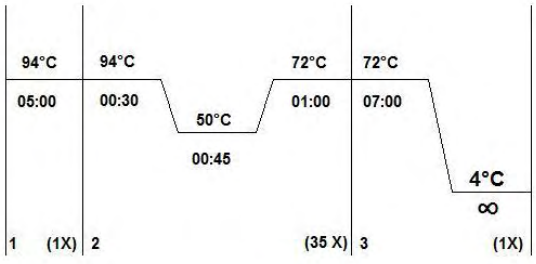
## Anexo D. Protocolo estandarizado de amplificación del gen mitocondrial COI por PCR

1. Se hace alícuotas de 1.25 µl de ADN en cada tubo de PCR debidamente rotulado y se conservan a -20 °C.
2. Se hacen los cálculos de acuerdo con las condiciones de PCR y al número de reacciones, para verificar la cantidad de cada componente. Para saber el número de reacciones se tiene en cuenta el número de muestras y se le suma el control positivo, el control negativo y una reacción adicional.
3. Para preparar el Mix se rotula un tubo de 1.5 ml como "MIX" y se adiciona en orden: agua, buffer, dNTPs, cebadores, magnesio y por último la ADN polimerasa Taq. Luego se homogeniza en vortex por 5 segundos y antes de servir a cada tubo se homogeniza con la micropipeta.

**Condiciones de PCR**

| Componente | Concentración en la Reacción | Volumen 1 Reacción (µl) |
|---|---|---|
| Buffer 5 X | 1 X | 5 |
| dNTP's 100 mM | 2 mM | 0,5 |
| PRIMER LCO1490 10 µm | 1 µM | 2,5 |
| PRIMER HCO2198 10 µm | 1 µM | 2,5 |
| MgCl2 25 mM | 2,5 Mm | 2,5 |
| Taq 500 u | 0,5 u | 0,025 |
| Agua | | 10,725 |
| ADN | | 1,25 |
| TOTAL | | 25 |

4. Se sirve a cada tubo con ADN 23.75 µl de Mix, se verifica que los tubos estén bien tapados y se llevan al termociclador programado de la siguiente manera:




Para observar los productos de PCR se realiza electroforesis en gel de agarosa al 2% y se coloca un marcador de peso molecular teniendo en cuenta que se espera un fragmento de aproximadamente 710 pb.

## Anexo E. BlastN para cada muestra

| Query | | | | Subject | | | | Score | | | Identities | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Name | Length | Start | End | AC | Length | Start | End | Bit | Raw | EValue | Match | Total | Pct.(%) |
| 1_LCO1490 | 46 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1_HC02198 | 704 | 52 | 644 | AF416838.1 | 603 | 590 | 1 | 1009 | 546 | 0.0 | 578 | 593 | 97 |
| 2_LCO1490 | 697 | 21 | 619 | AF416838.1 | 603 | 1 | 595 | 942 | 510 | 0.0 | 570 | 599 | 95 |
| 2_HC02198 | 706 | 39 | 641 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1014 | 549 | 0.0 | 585 | 603 | 97 |
| 3_LCO1490 | 694 | 28 | 627 | AF416838.1 | 603 | 3 | 602 | 1070 | 579 | 0.0 | 593 | 600 | 99 |
| 3_HC02198 | 713 | 46 | 647 | AF416838.1 | 603 | 602 | 1 | 1074 | 581 | 0.0 | 595 | 602 | 99 |
| 4_LCO1490 | 774 | 27 | 630 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1070 | 579 | 0.0 | 596 | 604 | 99 |
| 4_HC02198 | 702 | 45 | 647 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1075 | 582 | 0.0 | 596 | 603 | 99 |
| 5_LCO1490 | 692 | 22 | 624 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1098 | 594 | 0.0 | 600 | 603 | 99 |
| 5_HC02198 | 706 | 41 | 643 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1098 | 594 | 0.0 | 600 | 603 | 99 |
| 6_LCO1490 | 703 | 24 | 625 | AF416838.1 | 603 | 2 | 603 | 1074 | 581 | 0.0 | 595 | 602 | 99 |
| 6_HC02198 | 760 | 42 | 644 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1042 | 564 | 0.0 | 590 | 603 | 98 |
| 7_LCO1490 | 700 | 22 | 624 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1070 | 579 | 0.0 | 595 | 603 | 99 |
| 7_HC02198 | 695 | 41 | 643 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1070 | 579 | 0.0 | 595 | 603 | 99 |
| 8_LCO1490 | 695 | 20 | 622 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1075 | 582 | 0.0 | 596 | 603 | 99 |
| 8_HC02198 | 689 | 38 | 640 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1075 | 582 | 0.0 | 596 | 603 | 99 |
| 9_LCO1490 | 220 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 9_HC02198 | 206 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10_LCO1490 | 205 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10_HC02198 | 215 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16_LCO1490 | 207 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16_HC02198 | 205 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 17_LCO1490 | 768 | 19 | 621 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1059 | 573 | 0.0 | 593 | 603 | 98 |
| 17_HC02198 | 778 | 40 | 643 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1042 | 564 | 0.0 | 591 | 604 | 98 |
| 18_LCO1490 | 216 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 18_HC02198 | 208 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 19_LCO1490 | 200 | 30 | 196 | AF416838.1 | 603 | 14 | 179 | 274 | 148 | 2e-70 | 161 | 167 | 96 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 19_HC02198 | 204 | 47 | 204 | AF416838.1 | 603 | 597 | 442 | 169 | 91 | 8e-39 | 136 | 158 | 86 |
| 20_LCO1490 | 706 | 47 | 623 | AF416838.1 | 603 | 26 | 596 | 972 | 526 | 0.0 | 561 | 577 | 97 |
| 20_HC02198 | 771 | 42 | 644 | AF416838.1 | 603 | 600 | 1 | 1044 | 565 | 0.0 | 591 | 603 | 98 |
| 21_LCO1490 | 695 | 21 | 623 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1037 | 561 | 0.0 | 589 | 603 | 98 |
| 21_HC02198 | 783 | 40 | 642 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1042 | 564 | 0.0 | 590 | 603 | 98 |
| 22_LCO1490 | 194 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 22_HC02198 | 200 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 23_LCO1490 | 772 | 22 | 624 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1098 | 594 | 0.0 | 600 | 603 | 99 |
| 23_HC02198 | 766 | 38 | 640 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1075 | 582 | 0.0 | 596 | 603 | 99 |
| 24_LCO1490 | 774 | 22 | 624 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1070 | 579 | 0.0 | 595 | 603 | 99 |
| 24_HC02198 | 702 | 41 | 645 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1055 | 571 | 0.0 | 594 | 605 | 98 |
| 25_LCO1490 | 754 | 14 | 616 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1048 | 567 | 0.0 | 591 | 603 | 98 |
| 25_HC02198 | 777 | 37 | 642 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 972 | 526 | 0.0 | 580 | 606 | 96 |
| 31_LCO1490 | 687 | 20 | 621 | AF416838.1 | 603 | 2 | 603 | 1096 | 593 | 0.0 | 599 | 602 | 99 |
| 31_HC02198 | 700 | 45 | 651 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 963 | 521 | 0.0 | 580 | 608 | 95 |
| 32_LCO1490 | 686 | 16 | 619 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1070 | 579 | 0.0 | 596 | 604 | 99 |
| 32_HC02198 | 715 | 40 | 650 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1011 | 547 | 0.0 | 591 | 611 | 97 |
| 33_LCO1490 | 691 | 15 | 617 | AF416838.1 | 603 | 2 | 603 | 1062 | 575 | 0.0 | 594 | 603 | 99 |
| 33_HC02198 | 700 | 37 | 646 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 981 | 531 | 0.0 | 585 | 610 | 96 |
| 34_LCO1490 | 762 | 14 | 616 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1031 | 558 | 0.0 | 588 | 603 | 98 |
| 34_HC02198 | 206 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 35_LCO1490 | 698 | 17 | 619 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1075 | 582 | 0.0 | 596 | 603 | 99 |
| 35_HC02198 | 690 | 30 | 633 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1070 | 579 | 0.0 | 596 | 604 | 99 |
| 36_LCO1490 | 707 | 13 | 615 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1098 | 594 | 0.0 | 600 | 603 | 99 |
| 36_HC02198 | 704 | 38 | 640 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1098 | 594 | 0.0 | 600 | 603 | 99 |
| 37_LCO1490 | 214 | 56 | 214 | AF416838.1 | 603 | 35 | 186 | 154 | 83 | 2e-34 | 136 | 160 | 85 |
| 37_HC02198 | 206 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 38_LCO1490 | 200 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 38_HC02198 | 770 | 9 | 524 | AF416838.1 | 603 | 1 | 510 | 671 | 363 | 0.0 | 467 | 517 | 90 |
| 39_LCO1490 | 707 | 16 | 618 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1048 | 567 | 0.0 | 591 | 603 | 98 |
| 39_HC02198 | 689 | 31 | 633 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1048 | 567 | 0.0 | 591 | 603 | 98 |
| 40_LCO1490 | 201 | 27 | 201 | AF416838.1 | 603 | 16 | 190 | 279 | 151 | 4e-72 | 167 | 175 | 95 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 40_HC02198 | 221 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 46_LCO1490 | 693 | 13 | 615 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1092 | 591 | 0.0 | 599 | 603 | 99 |
| 46_HC02198 | 682 | 32 | 635 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1086 | 588 | 0.0 | 599 | 604 | 99 |
| 47_LCO1490 | 765 | 32 | 621 | AF416838.1 | 603 | 16 | 603 | 1022 | 553 | 0.0 | 578 | 590 | 98 |
| 47_HC02198 | 692 | 98 | 643 | AF416838.1 | 603 | 544 | 1 | 780 | 422 | 0.0 | 508 | 549 | 93 |
| 48_LCO1490 | 200 | 33 | 200 | AF416838.1 | 603 | 16 | 186 | 191 | 103 | 2e-45 | 152 | 174 | 87 |
| 48_HC02198 | 777 | 120 | 654 | AF416838.1 | 603 | 531 | 1 | 780 | 422 | 0.0 | 499 | 536 | 93 |
| 49_LCO1490 | 698 | 13 | 616 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1092 | 591 | 0.0 | 600 | 604 | 99 |
| 49_HC02198 | 683 | 35 | 638 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1098 | 594 | 0.0 | 601 | 604 | 99 |
| 50_LCO1490 | 691 | 14 | 615 | AF416838.1 | 603 | 2 | 603 | 1068 | 578 | 0.0 | 594 | 602 | 99 |
| 50_HC02198 | 696 | 38 | 640 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1070 | 579 | 0.0 | 595 | 603 | 99 |
| 51_LCO1490 | 691 | 12 | 616 | AF416838.1 | 603 | 1 | 603 | 1083 | 586 | 0.0 | 599 | 605 | 99 |
| 51_HC02198 | 694 | 36 | 644 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1048 | 567 | 0.0 | 596 | 609 | 98 |
| 52_LCO1490 | 683 | 22 | 619 | AF416838.1 | 603 | 6 | 603 | 1088 | 589 | 0.0 | 595 | 598 | 99 |
| 52_HC02198 | 684 | 31 | 634 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1092 | 591 | 0.0 | 600 | 604 | 99 |
| 53_LCO1490 | 694 | 27 | 620 | AF416838.1 | 603 | 10 | 603 | 1064 | 576 | 0.0 | 588 | 594 | 99 |
| 53_HC02198 | 694 | 38 | 640 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1075 | 582 | 0.0 | 596 | 603 | 99 |
| 54_LCO1490 | 683 | 41 | 614 | AF416838.1 | 603 | 31 | 602 | 1009 | 546 | 0.0 | 565 | 574 | 98 |
| 54_HC02198 | 705 | 54 | 643 | AF416838.1 | 603 | 589 | 1 | 1027 | 556 | 0.0 | 579 | 590 | 98 |
| 55_LCO1490 | 705 | 30 | 624 | AF416838.1 | 603 | 12 | 602 | 1018 | 551 | 0.0 | 581 | 595 | 98 |
| 55_HC02198 | 712 | 36 | 640 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1061 | 574 | 0.0 | 595 | 605 | 98 |
| 61_LCO1490 | 724 | 41 | 630 | AF416838.1 | 603 | 17 | 596 | 893 | 483 | 0.0 | 556 | 590 | 94 |
| 61_HC02198 | 691 | 49 | 641 | AF416838.1 | 603 | 592 | 1 | 989 | 535 | 0.0 | 574 | 593 | 97 |
| 62_LCO1490 | 200 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 62_HC02198 | 195 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 63_LCO1490 | 701 | 29 | 622 | AF416838.1 | 603 | 10 | 603 | 1053 | 570 | 0.0 | 586 | 594 | 99 |
| 63_HC02198 | 201 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 64_LCO1490 | 769 | 30 | 624 | AF416838.1 | 603 | 10 | 603 | 1053 | 570 | 0.0 | 587 | 595 | 99 |
| 64_HC02198 | 704 | 38 | 640 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1070 | 579 | 0.0 | 595 | 603 | 99 |
| 65_LCO1490 | 761 | 45 | 625 | AF416838.1 | 603 | 23 | 603 | 907 | 491 | 0.0 | 552 | 582 | 95 |
| 65_HC02198 | 785 | 77 | 651 | AF416838.1 | 603 | 570 | 1 | 929 | 503 | 0.0 | 553 | 576 | 96 |
| 66_LCO1490 | 705 | 26 | 623 | AF416838.1 | 603 | 6 | 603 | 1038 | 562 | 0.0 | 586 | 598 | 98 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 66_HC02198 | 778 | 45 | 647 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1048 | 567 | 0.0 | 591 | 603 | 98 |
| 67_LCO1490 | 762 | 40 | 616 | AF416838.1 | 603 | 18 | 593 | 898 | 486 | 0.0 | 547 | 577 | 95 |
| 67_HC02198 | 757 | 41 | 641 | AF416838.1 | 603 | 602 | 1 | 1044 | 565 | 0.0 | 590 | 602 | 98 |
| 68_LCO1490 | 693 | 22 | 622 | AF416838.1 | 603 | 3 | 603 | 1066 | 577 | 0.0 | 593 | 601 | 99 |
| 68_HC02198 | 699 | 38 | 640 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1070 | 579 | 0.0 | 595 | 603 | 99 |
| 69_LCO1490 | 1000 | 20 | 203 | AF416838.1 | 603 | 1 | 167 | 202 | 109 | 5e-48 | 162 | 184 | 88 |
| 69_HC02198 | 709 | 38 | 644 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1035 | 560 | 0.0 | 592 | 607 | 98 |
| 70_LCO1490 | 698 | 29 | 624 | AF416838.1 | 603 | 10 | 603 | 1055 | 571 | 0.0 | 588 | 596 | 99 |
| 70_HC02198 | 708 | 38 | 640 | AF416838.1 | 603 | 603 | 1 | 1081 | 585 | 0.0 | 597 | 603 | 99 |

# Anexo F. Secuencias utilizadas para el análisis estadístico

1_HCO2198
GATGTTTTATCTTGTCGATCAGTTGACAACATTCGTTGAGCCACCAGCATAACACTGCGCAAAGAAAACAACAATAA
CCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGGCCTAAAATCA
TTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACCATATCTAAAG
CTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTCCTTCAATTAAA
GCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGGTGGCTTATGT
CTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAGAAGAAAATCA
TTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGTTGAGCCAAAT
TCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

2_HCO2198
AGGACGAAAAAGAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCAGTAAAACG
GCCTAAAATCATTGTACACATAAGATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAAAGAAAAAATTAC
CATATCTGAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGAGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCT
CCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGG
GTGGCTTATGTCTCTACGACCAACCATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAA
GAAGAAAATCATTATCAATGCATGACTTGTAACAACTACGTTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCCG
GTTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

2_LCO1490
AAAGAGATGTATTAGTATGTTGATCAGTTGACTACATTGCTAAGCCACCAGATAACACTGGCAATGAAAACAACAAT
AACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGTCATGTGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGGCCTAAAAT
CATTGTATACATAAAATTTAAAGACGTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAAAGAAAAAATTACCATATCTAA
AGTCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGAGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTCCTTCAATT
AAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGGTGGCTTA
TGTCTCTACAACCAACCATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAGAAGAAAA
TCATTATCAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCACGGTTGAGCC
TAAATTCAACCGCAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCTAAACCC

3_HCO2198
GGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAAA
CAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCTGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

3_LCO1490
GGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAAA
CAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCTGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAAC

4_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCTCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

4_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG

TGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCTCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAAGCCC

5_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGA
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAACCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

5_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGA
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAACCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

6_HCO2198
AGGACTATAAAGAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAATAACATTGTTAAGCCACCATCTAACACTGGCAAAGAAT
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGGCTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

6_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGGCTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

7_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGATCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATATCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

7_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGATCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATATCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

8_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC

CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGGCTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

8_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGGCTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

17_HCO2198
AGGAGGAAAAAGAGATGTATTAGCATGTCGGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGA
AAACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAAC
GGCCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTA
CCATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACC
TCCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAG
GGTGGCTTATATCTCTACAACCGACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAACCCCCCTATTATTACTGGCATAACAA
AGAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTG
GTTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

17_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGGCTTATATCTCTACAACCGACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAACCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

19_LCO1490
CAATTTACAAATCCCCCTATTATTACTGGCAGGACAAAGAAGAAAATCATTATTAATGCAGTGACTTGTAACAACTAC
ATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCCGGTTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAAT
CCCTATCAATG

20_HCO2198
ACGAAAAAAAAGATGTTTTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATCTGTTAAGCCACCAGTCTAACACTGCGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTGAAACG
GCCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTAC
CATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCT
CCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGG
GTGGCTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAA
GAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGG
TTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

20_LCO1490
AAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACATACATTGTTAACCCATCCAGCTAACACTGGCATAGAAAACAACA
ATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGGCTTAAA
ATCATTGTACACCTAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTGCCATATCT
AAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTCCTTCAA
TTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGGTGGCT
TATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTATCTGGCATAACAAAGAAGA
AAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCATATAAATCCCACCTGGTTGA
GCTCAAATTCAACCGCAATATGAAACCTTAACCTAA

21_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAAAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGAGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTCC
TTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGGT
GGCTTATATCTCTACAACCAACCATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAGA
AGAAAATCATTATCAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCCGGTT
GAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

21_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCCATATGTAAAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGAGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTCC
TTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGGT
GGCTTATATCTCTACAACCAACCATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAGA
AGAAAATCATTATCAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCCGGTT
GAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

23_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTGGATCAGTTAACAACATTGGGAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAA
AACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAATAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACG
ACCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTAC
CATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCT
CCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGG
GTGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAA
GAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGG
TTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAACCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

23_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGA
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAACCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

24_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTCATTAAGCCACCAGCTAACACTGCGCAAAGA
AAACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAAC
GGCCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTA
CCATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACC
TCCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAG
GGTGGCTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAA
AGAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTG
GTTGAGCCAAGTTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

24_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGGCTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAGTTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

25_HCO2198
AGGACGAAAAAGAGATGGATTATTCATGTCGATGAGTTAGCAACATTCGTGAAGGCACCAATCTAGCACTGGCAAA
GAAAACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAATCCCCAAGTAATAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAA
ACGGCCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAAAGAAAAAAT
TACCATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGAGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCAC
CTCCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGA
GGGTGGCTTATGTCTCTACAACCAACCATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACA
AAGAAGAAAATCATTATCAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCC
GGTTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

25_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAAAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGAGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTCC
TTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGGT
GGCTTATGTCTCTACAACCAACCATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAGA

AGAAAATCATTATCAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCCGGTT
GAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

31_HCO2198
AGGACGATAAAGATATGGATTAGTCATGTGCGATGAATTTAAGATCATTCGTGAGGCCACCTGTCTAAGAATGGCCA
AGAAAACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGGAAGAATCTGTTTGCGCTCCGGAATTATAGCATTAA
AACGACCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCCGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAA
TTACCATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCA
CCTCCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCG
AGGGTGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAAC
AAAGAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCT
GGTTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAACCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

31_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGA
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAACCCCTATCAATGCTGATCAAAACC

32_HCO2198
AGGACGAAAAAGAGATGGATTAGTCATGTGCGATCAGTTTAACAACATCTCGTGAAGCCACCAGTATAACACTGCG
CGAAGAAAACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCA
TTAAAACGGCCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCGTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGA
AAAAATTACCATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCC
CAGCACCTCCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTC
AAGCGAGGGTGGCTTATGTCTCTACAACCAATTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGG
CATAACAAAAAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATC
CCACCTGGTTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

32_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGGCTTATGTCTCTACAACCAATTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAA
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCTGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

33_HCO2198
AGGACGAAATAAAGAGGTTTTATTCTTGTGCGATCATTTTAACAACATCTGTGAAGCCATCTAGCTAACACTCGCGC
AAAGAAAACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAATAATTGGTATGCGCTCCGGAATTATAGCATT
AAAACGGCCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGATCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAA
AATTACCATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAG
CACCTCCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAG
CGAGGGTGACTTATATCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATA
ACAAAGAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCA
CCTGGTTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

33_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGATCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATATCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCTGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACC

34_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAGACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACG
GCCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTTC
CATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCCCCT
CCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGGGAGG

GTGGCTTATATCTCTACAACCGACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAACCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAA
GAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGG
TTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGTTCAAAACCC

35_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTCGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAA
AACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACG
GCCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGATCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTAC
CATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCT
CCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAACGAGG
GTGACTTATATCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAA
GAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGG
TTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

35_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGATCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAACGAGGG
TGACTTATATCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

36_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGA
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAACCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

36_LCO1490
GGGTTTTGATCAGCATTGATAGGGGTTAGGTTAAGGTTTCATATTCGGTTGAATTTGGCTCAACCAGGTGGGATTTA
TAGGGAACTCCCGCAAATATATAATGTAGTTGTTACAAGTCATGCATTAATAATGATTTTCTTCTTTGTTATGCCAGTA
ATAATAGGGGGATTTGGAAATTGACTTATCCCATTAATAGTTGGTTGTAGAGACATAAGTCACCCTCGCTTGAATGG
GTTTAGGTTTTGGGTTTTGCCGGGTGCTCTTTTTATAGTACTTATATCTGCTTTAATTGAAGGAGGTGCTGGGACTG
GTTGGACTTTGTACCCCCCTCTTTCAAGATGAATTTTTCATAGGACACCAGCTTTAGATATGGTAATTTTTTCTCTAC
ATATTGCTGGGCTGGGGTCTATAATAAGGTCTTTAAATTTTATGTGTACAATGATTTTAGGTCGTTTTAATGCTATAAT
TCCGGAGCGCATGCCGATTCTTACTTGGGGTTTGTTTGTGACTTCTTGGTTATTGTTGTTTTCTTTGCCAGTGTTAG
CTGGTGGCTTAACAATGTTGTTAACTGATCGACATGCTAATACATCTTTTTTTCGTCCT

39_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAAAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGAGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTCC
TTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGGT
GGCTTATGTCTCTACAACCAACCATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAGA
AGAAAATCATTATCAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCCGGTT
GAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

39_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAAAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGAGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTCC
TTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGGT
GGCTTATGTCTCTACAACCAACCATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAGA
AGAAAATCATTATCAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCCGGTT
GAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

40_LCO1490
ATGGGATAAATCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTTCTGGCATAACAAAGAAGTAAATCATTATTAATGCATGAGTTG
TAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGTGGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAAC
CTTTACCTTACTCCTATCAA

46_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTCGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAA
AACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACG
ACCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTAC
CATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCT
CCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGG
GTGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAA
GAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGG
TTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

46_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGA
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

47_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGGCTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCACCCGAAATATGAAACCTAAACATTACTCCCTCTCAA

49_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTCGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAA
AACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACG
ACCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTAC
CATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCT
CCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAACGAGG
GTGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAA
GAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGG
TTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAACCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

49_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGA
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAACGAGGG
TGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAACCCCTATCAATGCGGATCTAAAACCC

50_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGATCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATATCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

50_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGATCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATATCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACC

51_HCO2198
AGGAGGAATAAGAGATGTGAGTTAGCATGTCGATCAGATTAACAACATTCGTTAAGCCACCAGTCTAACACTGCGC
AAAGAAAACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATT
AAAACGACCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAA
AATTACCATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAG
CACCTCCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAG
CGAGGGTGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATA
ACAAAGAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCA
CCTGGTTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

51_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGA
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCTGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAAACCC

52_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGGCAAAGAA
AACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACG
ACCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTAC
CATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCT
CCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGG
GTGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAA
GAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGG
TTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAACCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

52_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGA
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAACCCCTATCAATGCTGATCAA

53_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGGCTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

53_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGGCTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGA

54_HCO2198
ATGTATTATTTTGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGTCTAACACTGGCAAAGAAAACAACAATAACCAA
GAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGGCCTAAAATCATTGT
ACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACCATATCTAAAGCTGG
TGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTCCTTCAATTAAAGCAG
ATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGGTGGCTTATGTCTCTA
CAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAGAAGAAAATCATTATT

AATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGTTGAGCCAAATTCAAC
CGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

54_LCO1490
GGACGTAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCATAGAAAA
CAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGGCTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCTCAAATTCAACCGCAATATGAAACCTTAA

55_HCO2198
AGGACGAAAAAGAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTCGTTAAGCCACCAGTCTAACACTGGCAAAGA
AAACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAAC
GGCCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTA
CCATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACC
TCCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAG
GGTGGCTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAA
AGAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTG
GTTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

55_LCO1490
GGACGTAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGACATAGAAAA
CAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGGCTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCTCTATAAATCCCTACCTG
GTTGAGCTTAAATTCAACCGCAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCT

61_HCO2198
AAGATGGATTAGTATGTCGATCACTTGACAACAATGTGAAGCCACCAGCTAACACTGCGCAAAGAAAACAACAATAA
CCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCGGGAATTATAGCATTAAAACGGCCTAAAATC
ATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACCATATCTAAA
GCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTCCTTCAATTA
AAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTTAAGCGAGGGTGGCTTAT
GTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATCATTACTGGCATAACAAAGAAGAAAAT
CATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGTTGAGCCAA
GTTTAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

63_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAACCCCCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGA
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGAGCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTGCAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGAGTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGA

64_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGATCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATATCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

64_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGATCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG

TGACTTATATCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCTCTATAAATCCCACCTGG
TTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGA

65_HCO2198
AGTTAACCACATTCGTGGAGGCCACCTGTCTAACAATGCGCAAGAAAACAACAAGAACCTGGAAGTCACAAACAAA
CCCCAAGGAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGACATAAAATCATTGTACACATAAAATTTGA
AATGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCGATATGTAGAGAAAAAATTACCATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAA
AATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACGAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTCCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTA
TAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGGTGACTTATGTCTCTACAACCAACTATT
AATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAGAAGAAAATCATTATGAATGCATGACTT
GTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGTTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAA
CCTTAACCTAACCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

65_LCO1490
AGGTCGAAAAGATGAGGTATAGGCATGTCGATCAGTTAACTTCATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAT
ACAACAATAACCTAGAAGTCACAAACAAACCACAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTACAGCATTAAAACGA
CGTAAAATCATTGTACACATCAAATTTTAAGACGTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTGCAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CCCCACTTTAAGCAGATATATGTACTATAAAAAGAGCGCCCGGCAAAACCCAAAACCTTAACCCATTCAAGCGAGG
GTGAGTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCAGAACAAA
GAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGG
ATGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTTACCC

66_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAAAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGAGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTCC
TTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGGT
GGCTTATGTCTCTACAACCAACCATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAGA
AGAAAATCATTATCAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCCGGTT
GAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

66_LCO1490
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAAAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGAGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTCC
TTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGGT
GGCTTATGTCTCTACAACCAACCATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAGA
AGAAAATCATTATCAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCCGGTT
GAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAA

67_HCO2198
GGACGAAACAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAAAC
AACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGGC
CTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACCA
TATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTCC
TTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGGT
GGCTTATATCTCTACAACCGACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAACCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAGA
AGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGTT
GAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

67_LCO1490
AAAGATGTGGTAGCAGGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACGCTGGCAAAGAAAACAACAATA
ACCAAGAAGTCACAAGCAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGGCGTAAAAT
CATTGTACACATACAATTTAAAGACCTTATTATGGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACCATATTTAA
AGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGAAGAAAGTCCAGCCAGTCCCAGCACTTCCTTCACTT
AAAGCAGATATAAGTATTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCACTCAAGCGAGGGTGGGTTA
TATCTCTACAACCGACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAACCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAGAAGAAAA
TCATTATTAATGCATGACTGGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGTTGAGCCA
AATTCAACCTGAATATGAAACCTTAACCTTATTCCTATC

68_HCO2198
AGGACGAAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATTGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGG
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGATCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC

CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATATCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAATCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

68_LCO1490
GTTTTGATCAGCATTGATAGGGATTAGGTTAAGGTTTCATATTCGGTTGAATTTGGCTCAACCAGGTGGGATTTATA
GGGAACTCCCGCAAATATATAATGTAGTTGTTACAAGTCATGCATTAATAATGATTTTCTTCTTTGTTATGCCAGTAAT
AATAGGGGGATTTGGAAATTGACTTATCCCATTAATAGTTGGTTGTAGAGATATAAGTCACCCTCGCTTGAATGGGT
TTAGGTTTTGGGTTTTGCCGGGTGCTCTTTTTATAGTACTTATATCTGCTTTAATTGAAGGAGGTGCTGGGACTGGT
TGGACTTTGTACCCCCCTCTTTCAAGATGAATTTTTCATAGGACACCAGCTTTAGATATGGTAATTTTTTCTCTACATA
TTGCTGGGCTGGGATCTATAATAAGGTCTTTAAATTTTATGTGTACAATGATTTTAGGCCGTTTTAATGCTATAATTC
CGGAGCGCATGCCAATTCTTACTTGGGGTTTGTTTGTGACTTCTTGGTTATTGTTGTTTTCTTTGCCAGTGTTAGCTG
GTGGCTTAACAATGTTGTTAACTGATCGACATGCTAATACATCTTTTTTTCGTCCT

69_HCO2198
AGGACGAATAAGAGATGGATTAGCATGTGCGATCAGTTAACAACATTCGTTGAGCCACCAGTCTAACACTGCGCAA
AGAAAACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTA
GAACGACCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAA
ATTACCATATCTGAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAG
CACCTCCTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAG
CGAGGGTGACTTATGTCTCTACGACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATGATTACTGGCAT
AACAAAGAAGAAAATCATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCC
ACCTGGTTGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAACCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

70_HCO2198
AGGACGAAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGA
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATGTCTCTACGACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATGATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATTATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCCAAATTCAACCGAATATGAAACCTTAACCTAACCCCTATCAATGCTGATCAAAACCC

70_LCO1490
AGGACGTAAAAAAGATGTATTAGCATGTCGATCAGTTAACAACATTGTTAAGCCACCAGCTAACACTGGCAAAGAAA
ACAACAATAACCAAGAAGTCACAAACAAACCCCAAGTAAGAATCGGCATGCGCTCCGGAATTATAGCATTAAAACGA
CCTAAAATCATTGTACACATAAAATTTAAAGACCTTATTATAGACCCCAGCCCAGCAATATGTAGAGAAAAAATTACC
ATATCTAAAGCTGGTGTCCTATGAAAAATTCATCTTGAAAGAGGGGGGTACAAAGTCCAACCAGTCCCAGCACCTC
CTTCAATTAAAGCAGATATAAGTACTATAAAAAGAGCACCCGGCAAAACCCAAAACCTAAACCCATTCAAGCGAGGG
TGACTTATGTCTCTACAACCAACTATTAATGGGATAAGTCAATTTCCAAATCCCCCTATTATTACTGGCATAACAAAG
AAGAAAATTATTATTAATGCATGACTTGTAACAACTACATTATATATTTGCGGGAGTTCCCTATAAATCCCACCTGGT
TGAGCTTAAATTCAACGGCAATATGAAACCTTAACCTAACCCCTATCAATGCTGA