



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

**RELACIONES FILOGENÉTICAS A
NIVEL MOLECULAR DE ESPECIES
DEL GÉNERO *Macrobrachium* y
ESTRUCTURA POBLACIONAL DE
M. inca Y *M. gallus* DE LOS RÍOS DEL
PACÍFICO PERUANO**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS, CON MENCIÓN
EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**

ELIANA VICTORIA ZELADA MÁZMELA

LIMA - PERÚ

2020

ASESOR

Luis Julio César De Stefano Beltrán Ph.D.

JURADO DE TESIS

Dr. Dimitri Alexey Gutiérrez Aguilar

PRESIDENTE

Dr. Rodolfo Martín Salas Gismondi

VOCAL

Dr. Michael John Talledo Albújar

VOCAL

Dr. Jorge Enrique Rodríguez Bailón

SECRETARIO

DEDICATORIA

A Luis, mi esposo, quién como digo, está siempre un paso delante de mí; el que esté siempre allí, motiva en mí la superación.

A Elianita, mi hija querida: Yo estoy consiguiendo este grado y tú, con el favor de Dios, estás ya próxima a obtenerlo.

Al Dios Todopoderoso, autor de una creación en perpetuo crecimiento, que maneja los hilos sutiles de la evolución, lo que afirma todas las invenciones y maravillas de la naturaleza. Nada es producto del azar. Lo que encontré en esta historia, creo firmemente es porque Él lo desarrolló. A ti Padre, todo el honor y la gloria en el santo nombre de Jesucristo.

Presenté este manuscrito cuando ustedes estaban con vida, ahora que debo de presentar el documento definitivo para su defensa, ya no están más. Mamá Edith y papá Manuel, sé que este logro los hubiera llenado de orgullo; Dios los tenga en su Santa Gloria. A mis hermanos y sobrinos, es mi deseo sea un móvil para más superación.

AGRADECIMIENTO

La realización de un trabajo de tesis doctoral, cuyos estudios si bien se realizaron en una universidad privada, proviene de una persona que pertenece a la universidad pública, donde lastimosamente por las políticas en donde el investigador debe financiar el proyecto con su propio peculio, significa que se haya tenido que recurrir a una serie de personas para que este trabajo tenga los resultados que se esperaba.

En ese sentido debo de agradecer a quienes permitieron iniciarme en este mundo de la Genética de Poblaciones y posibilitaron la realización de la presente tesis:

A los doctores Oswaldo Ramírez y Maggie Arana, investigadores del Laboratorio de Biología Integrativa de la UPCH, porque fue en su laboratorio donde la idea tal vez primitiva que tenía allá por los noventas de especiación por parte de la cordillera de los Andes, tomó la forma correcta y se convirtió en el proyecto de tesis. No era la cordillera, era el istmo de Panamá.

Al Biólogo Luis De Stefano Beltrán Ph. D., docente de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por aceptar asesorar la presente investigación.

A Percy Pinedo, biólogo consultor del Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción (LGFyR) de la Universidad Nacional del Santa por su apoyo y recomendaciones en la etapa inicial del trabajo.

A Eduardo Reyes, biólogo consultor del Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción (LGFyR) de la Universidad Nacional del Santa, quien finalmente se quedó con la responsabilidad de ser mi “sostén molecular”; gracias, Lalo, realmente fuiste vital para culminar este trabajo, comenzando desde cómo realizar una

correcta preservación de las muestras adquiridas, hasta el mejoramiento de las figuras, que ahora lucen más bonitas en el presente informe.

A los doctores Jorge Ramírez y Pedro Romero, gracias por sus sugerencias y apoyo en la obtención de algunos datos y revisión del manuscrito; por eso también agradezco al Dr. Alan Marín.

Al Dr. Walter Reyes, por enseñarme a identificar morfológicamente los camarones y proporcionarme sus resúmenes de las claves.

A Sheyla Pesantes, gracias por el contacto y la compañía para conseguir los panamenses. Gracias al Ing^o Milthon Sócola, gerente general de la langostinera La Bocana de Tumbes, por su amabilidad en permitir muestrear en los canales de la empresa.

A la Asociación de Camaroneros del río Pativilca, en la persona de su presidente Miguel Villanueva Soriano.

Al personal de guardianía del Puente Internacional en el río Zarumilla, gracias por apoyarme en la captura de los americanos. A Yufani Olaya por su apoyo en el recorrido de los ríos Tumbes y Zarumilla. A la familia de Bereliza, por los camarones del río Zaña. Al señor Lara del río Virú.

A Ronald, con quien pude salir a recorrer el río Paita, los canales de Amotape, el reservorio de Poechos; casi compramos langostas por camarones!. Al profesor Guillermo Bernal, al alcalde Porfirio Meca y al conductor Pedro Timaná, por su apoyo en las compras en estos mismos canales; gracias Miguel Zegarra por la coordinación y apoyo para el contacto con los pescadores.

A todos los profesores del doctorado, fue bueno para mi formación el decidir hacer los estudios en la renombrada Universidad Peruana Cayetano Heredia. Viajar todas las semanas a Chimbote para cumplir con las clases que continué dictando en el pregrado de mi Alma Mater laboral, la Universidad Nacional del Santa, si bien significó mucho sacrificio, permitió cumplir dos sueños: los estudios de doctorado en una universidad prestigiosa y echar a caminar el proyecto del laboratorio, en el cual pude hacer el presente trabajo de tesis.

Muchas gracias Dr. Antenor Guerra Martínez y Dra. Julia Amaya de Guerra, ex docentes de la Universidad Nacional de Trujillo, por obsequiarme el trabajo realizado por ustedes, que fue de mucha utilidad para el presente estudio.

En algún momento he manifestado que tengo la sensación de estar tarde en la consecución de logros personales. Sin embargo, el hecho de que la presente tesis haya sido ejecutada cuando jóvenes del laboratorio también hacían sus trabajos, me daba el aliciente para seguir trabajando. Gracias sobre todo a José, Julissa, Sissy, Sonia y Jhoel; muchas cosas del trabajo las aprendí también de ustedes.

Gracias Carmen, por acompañarme en el sueño de tener el LGFyR, que permitió que este trabajo pudiera realizarse al contar con el equipamiento y reactivos necesarios; de no tenerlo, probablemente no hubiera podido realizar esta tesis con la comodidad adecuada.

A todas las personas, que de una u otra manera contribuyeron a que esta tesis se haga realidad, sobre todo, a todos los que me apoyaron en los recorridos a los diferentes ríos, desde Tumbes hasta Huaura.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Tesis Autofinanciada

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
RESUMEN	
ABSTRACT	
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. CAPÍTULO I:	8
RELACIONES FILOGENÉTICAS A NIVEL MOLECULAR ENTRE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Macrobrachium</i> DE LOS RÍOS DEL PACÍFICO PERUANO Y CON ESPECIES DE <i>Macrobrachium</i> DE LA VERTIENTE DEL ATLÁNTICO	
2.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	16
2.2 MARCO TEÓRICO	
2.2.1 BASES TEÓRICAS	17
2.2.1.1 Antecedentes de la Investigación	17
2.2.1.1.1 Taxonomía	17
2.2.1.1.2 Ciclo de Vida	18
2.2.1.1.3 Distribución	18
2.2.2 ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN	20

2.2.3 MARCO TEÓRICO O TEORÍA SUSTANTIVA	
2.2.3.1 Filogenética	21
2.2.3.2 Reloj Molecular	23
2.2.3.3 ADN mitocondrial	26
2.2.3.4 Alopatría, Vicarianza y Dispersión	29
2.2.4 DEFINICIÓN DE PALABRAS CLAVES	
<i>Macrobrachium</i>	30
Análisis Filogenético	31
<i>COI</i>	31
<i>16S rDNA</i>	31
<i>28S rDNA</i>	31
2.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	32
2.4 OBJETIVOS	35
2.5 METODOLOGÍA	
2.5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	36
2.5.2 POBLACIÓN	36
2.5.3 MUESTRA	36
2.5.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	38
2.5.5 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS DE LA INVESTIGACIÓN	
2.5.5.1 Fuente de Secuencias de ADN: Colección de especies	40

2.5.5.2 Análisis de la identidad morfológica de las especies del género <i>Macrobrachium</i>	40
2.5.5.3 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación	41
2.5.5.4 Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos	44
2.5.5.4.1 Caracterizar la identidad molecular y relaciones filogenéticas de las especies morfológicas del género <i>Macrobrachium</i> de los ríos del Pacífico peruano, en base al análisis de un fragmento de los genes <i>COI</i> , <i>16S</i> y <i>28S</i>	44
2.5.5.4.2 Relaciones Filogenéticas del género <i>Macrobrachium</i> de los ríos del Pacífico peruano con especies de <i>Macrobrachium</i> de la vertiente del Atlántico	47
2.6 RESULTADOS	50
2.6.1 Fuente de Secuencias de ADN: Colección de especies	50
2.6.2 Análisis de la identidad morfológica de las especies del género <i>Macrobrachium</i>	50
2.6.3 Caracterizar la identidad molecular y relaciones filogenéticas de las especies morfológicas del género <i>Macrobrachium</i> de los ríos del Pacífico peruano, en base al análisis de un fragmento de los genes <i>COI</i> , <i>16S</i> y <i>28S</i>	51
2.6.4 Relaciones Filogenéticas del género <i>Macrobrachium</i> de los ríos del Pacífico peruano con especies de <i>Macrobrachium</i> de la vertiente del Atlántico	65

2.7 DISCUSIÓN	77
2.8 CONCLUSIONES	96
3.0 CAPÍTULO II:	87
ESTRUCTURA POBLACIONAL DE <i>MACROBRACHIUM INCA</i> Y <i>MACROBRACHIUM GALLUS</i>, BASADA EN LAS SECUENCIAS PARCIALES DE LOS GENES CITOCROMO OXIDASA I (<i>COI</i>) Y <i>16SRDNA (16S)</i>	98
3.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	102
3.2 MARCO TEÓRICO	103
3.2.1 BASES TEÓRICAS	
3.2.1.1 Antecedentes de la Investigación	103
3.2.1.1.1 El uso de marcadores mitocondriales en Estructura de Poblaciones	103
3.2.1.1.2 Población	103
3.2.2 MARCO TEÓRICO O TEORÍA SUSTANTIVA	
3.2.2.1 Filogeografía	104
3.2.2.2 Diversidad Genética	105
3.2.2.3 Estructura Poblacional	106
3.2.3 DEFINICIÓN DE PALABRAS CLAVES	
Haplotipo	108

3.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	109
3.4 OBJETIVOS	111
3.5 METODOLOGÍA	
3.5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	112
3.5.2 POBLACIÓN	112
3.5.3 MUESTRA	112
3.5.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	113
3.5.5 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS DE LA INVESTIGACIÓN	
3.5.5.1 Fuente de Secuencias de ADN: Colección de especies	114
3.5.5.2 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación	114
3.5.5.3 Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos	
3.5.5.3.1 Análisis de Secuencias	116
3.5.5.3.2 Análisis de Haplotipos	117
3.5.5.3.3 Análisis de Distancias Genéticas	118
3.5.5.3.4 Reconstrucción Demográfica	119
3.5.5.3.5 Análisis Filogenético	120
3.5.5.3.6 Estructura Poblacional	120
3.6 RESULTADOS	
3.6.1 Obtención de la Muestra	122
3.6.2 Análisis Morfológicos y Distribución	122

3.6.3	Alineamiento de las Secuencias	123
3.6.4	Estructura Poblacional de <i>M. inca</i> basada en secuencias parciales de los genes Citocromo oxidasa I (<i>COI</i>) y 16SrDNA (<i>16S</i>)	
3.6.4.1	Estadísticas básicas de las secuencias	123
3.6.4.2	Diversidad Genética	124
3.6.4.3	Análisis de Haplotipos	129
3.6.4.4	Análisis de Distancias Genéticas	136
3.6.4.5	Análisis de Patrones Históricos Demográficos	139
3.6.4.6	Análisis Filogenéticos	141
3.6.4.7	Estructura Poblacional	144
3.6.5	Estructura Poblacional de <i>M. gallus</i> basada en secuencias parciales de los genes Citocromo oxidasa I (<i>COI</i>) y 16SrDNA (<i>16S</i>)	147
3.6.5.1	Estadísticas básicas de las secuencias	147
3.6.5.2	Diversidad Genética	149
3.6.5.3	Análisis de Haplotipos	150
3.6.5.4	Análisis de Distancias Genéticas	153
3.6.5.5	Análisis de Patrones Históricos Demográficos	154
3.6.5.6	Análisis Filogenéticos	156
3.6.5.7	Estructura Poblacional	160
3.7	DISCUSIÓN	161
3.8	CONCLUSIONES	175

4.0 RECOMENDACIONES GENERALES	177
5.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178
6.0 ANEXOS	

DEFINICIONES

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
mADN:	Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial
<i>16S</i>	Gen <i>16S rDNA</i>
<i>28S</i>	Gen <i>28S rDNA</i>
<i>COI</i>	Citocromo oxidasa sub unidad I
IMARPE:	Instituto del Mar del Perú
My:	Millones de años
μM :	Micromolar
mM:	Milimolar
ng:	Nanogramos
μl :	Microlitros
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
Ta:	Temperatura de <i>annealing</i> o Temperatura de Hibridación
UV:	Ultravioleta

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Posición geográfica de los lugares de obtención de las especies del género *Macrobrachium* de las costas del Pacífico peruano

Tabla 2: Operacionalización de Variables

Tabla 3: Secuencias de *primers* utilizados en la filogenia de las especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano

Tabla 4: Secuencias de *primers* utilizados en la determinación de la filogenia de las especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano con las especies de la vertiente del Atlántico

Tabla 5: Distribución de los camarones *Macrobrachium* en los ríos del Pacífico Peruano (de octubre del 2013 a febrero del 2016). En azul, nueva distribución encontrada

Tabla 6: Clasificación taxonómica de camarones del género *Macrobrachium* identificados morfológicamente, capturados de los ríos del Pacífico peruano, de octubre del 2013 a febrero del 2016

Tabla 7: Estadísticas para el set de datos de las secuencias de los genes *COI*, *16S* y *28S* para las seis especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano

Tabla 8: Distancias genéticas intrapoblacional del gen *COI* para las especies de *Macrobrachium* en los 15 ríos del Pacífico peruano, basados en el modelo Kimura 2-P con 10000 *bootstrap*

Tabla 09: Distancias genéticas interpoblacional del gen *COI* para las especies de *Macrobrachium* en los 15 ríos del Pacífico peruano, basados en el modelo Kimura

2 parámetros con 10000 *bootstrap*. En rojo las distancias entre *M. americanum* – *M. inca* y *M. gallus* - *M. panamense*

Tabla 10: Distancias genéticas intrapoblacional del gen *16S* para las especies de *Macrobrachium* en los 15 ríos del Pacífico peruano, basados en el modelo Kimura 2-P con 10000 *bootstrap*

Tabla 11: Distancias genéticas interpoblacional del gen *16S* para las especies de *Macrobrachium* en los 15 ríos del Pacífico peruano, basados en el modelo Kimura 2 parámetros con 10000 *bootstrap*. En rojo las distancias entre *M. americanum* – *M. inca* y *M. gallus* - *M. panamense*

Tabla 12: Distancias genéticas intrapoblacional del gen *28S* para las especies de *Macrobrachium* en los 15 ríos del Pacífico peruano, basados en el modelo Kimura 2-P con 10000 *bootstrap*

Tabla 13: Distancias genéticas interpoblacional del gen *28S* para las especies de *Macrobrachium* en los 15 ríos del Pacífico peruano, basados en el modelo Kimura 2-P con 10000 *bootstrap*. En rojo las distancias entre *M. americanum* – *M. inca* y *M. gallus* - *M. panamense*

Tabla 14: Distancias genéticas intraespecífica del gen *16S* para las especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano y las especies gemelas de la vertiente del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

Tabla 15: Distancias genéticas interespecífica del gen *16S* para las especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano y las especies gemelas del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap* y con *C. caementarius* y *P. hancokii* como grupos externos. Los números en rojo resaltan que los menores valores corresponden entre especies consideradas gemelas

Tabla 16: Distancias genéticas (d) *intrasibling* del gen *16S* para las especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano unidas a las especies sibling del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

Tabla 17: Distancias genéticas (d) *intersibling* del gen *16S* para las especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano unidas a sus especies gemelas del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

Tabla 18: Tiempo de Divergencia entre las especies del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano y especies de la vertiente del Atlántico, basado en el gen *16S*

Tabla 19: Distancias genéticas intraespecífica del gen *COI* para especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano y las especies gemelas del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

Tabla 20: Distancias genéticas interespecífica del gen *COI* para especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano y las especies gemelas del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

Tabla 21: Distancias genéticas (d) *intrasibling* del gen *COI* para las especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano unidas a las especies gemelas del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap* (ANEXO 01)

Tabla 22: Distancias genéticas (d) *intersibling* del gen *COI* para las especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano unidas a las especies gemelas del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap* (ANEXO 01)

Tabla 23: Tiempo de Divergencia entre las especies del género *Macrobrachium* del Pacífico peruano y especies del Atlántico, basado en el gen *COI*

Tabla 24: Operacionalización de Variables

Tabla 25: Secuencias de *primers* utilizados en estructura poblacional de *M. inca* y *M. gallus* de los ríos del Pacífico peruano

Tabla 26: Número total de especímenes de *M. inca* y *M. gallus* obtenidos entre octubre 2013 a febrero 2016

Tabla 27: Número total de especímenes de *M. inca* y *M. gallus* y haplotipos obtenidos por fecha de muestreo. El color negro indica haplotipos compartidos, y el color celeste indica haplotipos únicos (ANEXO 01)

Tabla 28: Estadísticas básicas de las secuencias del gen *COI* en *M. inca*, de la población total y de cada río

Tabla 29: Estadísticas básicas de las secuencias del gen *16S rDNA* en *M. inca*, de la población total y de cada río

Tabla 30: Valores de diversidad genética del gen *COI*: *M. inca* para las 326 secuencias y de cada río muestreado

Tabla 31: Valores de diversidad genética del gen *16S rDNA*: *M. inca* para las 334 secuencias y de cada río muestreado

Tabla 32: Comparación de parámetros genéticos básicos en el gen *COI*_ *M. inca* según su posición en el codón de inicio (ANEXO 01)

Tabla 33: Composición nucleotídica del gen *COI*, para *M. inca* en las diferentes posiciones del codón de inicio (ANEXO 01)

Tabla 34: Composición de aminoácidos (%) de las secuencias de *M. inca*, gen *COI*, según posición 3 del marco de lectura (ANEXO 01)

Tabla 35: Número promedio y frecuencia de uso de codones de las secuencias de *M. inca* del gene *COI* (ANEXO 01)

Tabla 36: Distancias genéticas (d) intrapoblacional de las secuencias parciales de los genes *COI* y *16S* para *M. inca* en los ríos muestreados del Pacífico peruano, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*. En color azul se resalta el río con mayor diversidad, y en color rojo el río con menor diversidad

Tabla 37: Distancias genéticas interpoblacional del gen *COI* para *M. inca* en los ríos del Pacífico peruano, basadas en el modelo Kimura-2P

Tabla 38: Distancias genéticas interpoblacional del gen *COI* para *M. inca* en los ríos del Pacífico peruano, basadas en el modelo Kimura-2P

Tabla 39: Estimadores de parámetros demográficos utilizados para el análisis de cambio en el tamaño poblacional, de las secuencias parciales de las secuencias de los genes *COI* y *16S* para *M. inca* (ANEXO 01)

Tabla 40: Tiempo de inicio de expansión demográfica y número de hembras (N_e) con el que se inició la expansión de *M. inca*, según los genes *COI* y *16S*

Tabla 41: Valores encontrados para las pruebas de Neutralidad: Tajima' D y Fu'S Fs para las secuencias parciales de las secuencias de los genes *COI* y *16S* para *M. inca* (ANEXO 01)

Tabla 42: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *COI* de *M. inca* los 15 ríos muestreados, sin estructuración en grupos

Tabla 43: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *COI* de *M. inca* los 15 ríos muestreados, con estructuración en 2 grupos

Tabla 44: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *COI* de *M. inca* los 15 ríos muestreados, con estructuración en 2 grupos

Tabla 44: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *COI* de *M. inca* los 15 ríos muestreados, estructurado en cuatro grupos

Tabla 45: *Population pairwise* FST en 15 poblaciones de *M. inca* basado en la frecuencia de haplotipos de la secuencia parcial del gen *COI* (ANEXO 01)

Tabla 46: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *16S* de *M. inca* los 15 ríos muestreados, estructurado en dos grupos

Tabla 47: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *16S* de *M. inca* de los 15 ríos muestreados, sin estructuración en grupos

Tabla 48: *Population pairwise* FST en 15 poblaciones de *M. inca* basado en la frecuencia de haplotipos de la secuencia parcial del gen *16S* (ANEXO 01)

Tabla 49: Matriz de significancia en 15 poblaciones de *M. inca* basado en la frecuencia de haplotipos de la secuencia parcial del gen *16S* (ANEXO 01)

Tabla 50: Estadísticas básicas de las secuencias parciales de las secuencias de los genes *COI* y *16S* para *M. gallus*

Tabla 51: Valores de diversidad genética de las secuencias parciales de los genes *COI* y *16S* - *M. gallus* y de cada río muestreado

Tabla 52: Comparación de parámetros genéticos básicos en el gen *COI* - *M. gallus* según su posición en el codón de inicio (ANEXO 01)

Tabla 53: Composición nucleotídica del gen *COI-M. gallus* en las diferentes posiciones del codón de inicio (ANEXO 01)

Tabla 54: Composición de aminoácidos (%) de las secuencias de *M. gallus*, gen *COI*, según la tercera posición del codón (ANEXO 01)

Tabla 55: Número promedio y frecuencia de uso de codones de las secuencias de *M. gallus* del gen *COI* (ANEXO 01)

Tabla 56: Distancias genéticas (d) intrapoblacional de las secuencias parciales de los genes *COI* y *16S* de *M. gallus* en los ríos Zarumilla y Tumbes, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

Tabla 57: Distancias genéticas interpoblacional del gen *COI* para *M. gallus* en los ríos Tumbes y Zarumilla, basados en el modelo Kimura 2 parámetros con 10000 *bootstrap*

Tabla 58: Distancias genéticas (d) intrapoblacional del gen *16S* para *M. gallus* en los ríos muestreados del Pacífico Peruano, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

Tabla 59: Estimadores de parámetros demográficos utilizados para el análisis de cambio en el tamaño poblacional, para el gen *COI* y *16S* – *M. gallus* (ANEXO 01)

Tabla 60: Tiempo de inicio de expansión demográfica y número de hembras (N_e) con el que se inició la expansión en las poblaciones de *M. gallus*

Tabla 61: Valores encontrados para las pruebas de Neutralidad: Tajima' D y Fu'S Fs para los genes *COI* y *16S* - *M. gallus* (ANEXO 01)

Tabla 62: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *COI* de *M. gallus* para los dos ríos muestreados, estructurado en dos grupos

Tabla 63: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *COI* de *M. gallus* para los dos ríos muestreados, sin estructuración en grupos

Tabla 64: *Population pairwise* F_{ST} para *M. gallus* basado en la frecuencia de haplotipos de la secuencia parcial de *COI* en los ríos Zarumilla y Tumbes (ANEXO 01)

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Distribución geográfica de las especies *M. digueti*, *M. olfersii* y *M. hancockii* (Tomado de Rossi, 2012)

Fig 2: Esquema de los caracteres morfológicos del género *Macrobrachium*. Nótese la espina hepática como distintivo del género (Tomado de Hernández, 2007)

Fig. 3: Siete de los 203 modelos de sustitución nucleotídica de la familia de General Time- Reversible (GTR) (Tomado de Varcárcel *et al.*, 2012)

Fig 4: Mapa del Perú mostrando los lugares de colecta de las especies del género *Macrobrachium*

Fig. 5: Árbol filogenético construido con el algoritmo de Máxima Parsimonia (MP), a partir de las 83 secuencias del gen *COI* para las seis especies de *Macrobrachium*, considerando a *P. hancockii* como grupo externo

Fig. 6: Árbol filogenético construido con análisis de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G, a partir de las 83 secuencias del gen *COI* para las seis especies de *Macrobrachium*, considerando a *P. hancockii* como grupo externo

Fig. 7: Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima Parsimonia (MP), a partir de las 93 secuencias del gen *16S* para las seis especies de *Macrobrachium*, considerando a *P. hancockii* como grupo externo

Fig. 8: Árbol filogenético construido con análisis de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: K80+I+G, a partir de las 93 secuencias del

gen *16S* para las seis especies de *Macrobrachium*, considerando a *P. hancockii* como grupo externo

Fig. 9: Árbol filogenético construido con el algoritmo de Máxima Parsimonia (MP), usando el modelo de sustitución AIC a partir de las 28 secuencias del gen *28S* para las seis especies de *Macrobrachium*, considerando a *P. hancockii* como grupo externo

Fig. 10: Árbol filogenético construido con análisis de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I, a partir de las 28 secuencias del gen *28S* para las seis especies de *Macrobrachium*, considerando a *P. hancockii* como grupo externo

Fig 11: Árbol filogenético concatenado de especies del género *Macrobrachium*: *COI-16S* construido con análisis de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G (ANEXO 02)

Fig 12: Árbol filogenético concatenado de especies del género *Macrobrachium*: *COI-28S* construido con el algoritmo MrBayes (MB) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G (ANEXO 02)

Fig 13: Árbol filogenético concatenado de especies del género *Macrobrachium*: *16S-28S* construido con análisis de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G (ANEXO 02)

Fig 14: Árbol filogenético de especies del género *Macrobrachium*: *16S* construido con el algoritmo Máxima Parsimonia (MP), considerando *P. hancockii* y *C. caementarius* como grupos externos

Fig 15: Árbol filogenético de especies del género *Macrobrachium*: *16S* construido con análisis de Inferencia Bayesiana (BI), con el modelo de sustitución HKY+I+G y considerando a *P. hancockii* y *C. caementarius* como grupos externos

Fig 16: Timetree obtenido por el software Beast mostrando el tiempo de divergencia entre especies del Género *Macrobrachium*, considerando una tasa de mutación del 0.9% My, para el gen *16S*

Fig 17: Timetree obtenido por el software Beast mostrando el tiempo de divergencia entre especies del Género *Macrobrachium*, considerando una tasa de mutación del 0.6% My para el gen *16S*

Fig 18: Árbol filogenético de especies del género *Macrobrachium*: *COI* construido con análisis de Inferencia Bayesiana (BI), considerando secuencias de *M. digueti* del Genbank y *C. caementarius* como grupo externo

Fig. 19: Distribución biogeográfica de *Macrobrachium* en las costas de América (tomado de Anger, 2013). Nótese que la Corriente Peruana ha sido desviada en su recorrido a la altura de Ica, cuando realmente ésta continua hasta Piura, encontrándose en una zona de congruencia con la Corriente de El Niño, de aguas cálidas

Fig 20: Principales factores que influyen los niveles de variabilidad genética dentro de una población. Tomado de Freeland (2005)

Fig 21: Representación general de la distribución de haplotipos de los 15 ríos muestreados, para las secuencias parciales del gen *COI* de *M. inca*

Fig 22: Mapa general de la distribución de haplotipos de los 15 ríos muestreados, para secuencias del gen *COI* de *M. inca* en relación a su ubicación geográfica

Fig. 23: Representación general de la distribución de haplotipos de los 15 ríos muestreados, para el gen *16S* de *M. inca*

Fig. 24: Mapa general de la distribución de haplotipos de los 15 ríos muestreados, para el gen *16S* de *M. inca* en relación a su ubicación geográfica

Fig. 25: Red de haplotipos del gen *COI* *M. inca*, generada por el algoritmo Median Joining Network

Fig. 26: Red de haplotipos del gen *16S* *M. inca*, generada por el algoritmo Median Joining Network

Fig. 27: Análisis *mismatch*: Distribución de frecuencias observadas y esperadas del gen *COI* - *M. inca* de los 15 ríos muestreados, bajo el supuesto de tamaño poblacional variable

Fig. 28: Análisis de *mismatch*: Distribución de frecuencias observadas y esperadas del gen *16S* - *M. inca* de los 15 ríos muestreados, bajo el supuesto de tamaño poblacional variable

Fig. 29: Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima Parsimonia (MP), usando la función Kimura – 2P a partir de los 171 haplotipos encontrados para las 326 secuencias del gen *COI* para *M. inca*

Fig. 30: Árbol filogenético construido con análisis de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G, a partir de los 171 haplotipos encontrados para las 326 secuencias del gen *COI-M. inca* (Anexo 02)

Fig. 31: Comparación de árbol filogenético construido con el algoritmo MP usando la función Kimura – 2P1 a partir de los 60 haplotipos encontrados para las 334 secuencias del gen *16S-M. inca*, considerando a *P. hancockii* como grupo externo

Fig. 32: Comparación de árbol filogenético construido con análisis de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución: GTR+I, a partir de los 60 haplotipos encontrados para las 334 secuencias del gen *16S-M. inca* (Anexo 02)

Fig. 33: Árbol filogenético concatenado *M. inca: COI-16S* construido con el algoritmo MP usando la función Kimura – 2P

Fig. 34: Distribución general de la distribución de haplotipos de los ríos Zarumilla y Tumbes muestreados, para las secuencias parciales del gen *COI* de *M. gallus*

Fig 35: Distribución general de la distribución de haplotipos de los ríos Zarumilla y Tumbes muestreados, para las secuencias parciales del gen *16S* de *M. gallus*

Fig. 36: Red de haplotipos obtenida de las secuencias parciales del gen *COI - M. gallus*, generada por el algoritmo Median Joining Network

Fig. 37: Red de haplotipos obtenida de las secuencias parciales del gen *16S - M. gallus*, generada por el algoritmo Median Joining Network

Fig. 38: Análisis de *mismatch*: Distribución de frecuencias observadas y esperadas del gen *COI -M. gallus* de los ríos Zarumilla y Tumbes, bajo el supuesto de tamaño poblacional en expansión

Fig.39: Análisis de *mismatch*: Distribución de frecuencias observadas y esperadas del gen *16S - M. gallus* de los ríos Zarumilla y Tumbes, bajo el supuesto de tamaño poblacional en expansión

Fig. 40: Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima Parsimonia (MP), usando la función Kimura – 2P1 a partir de las 40 secuencias del gen *COI - M. gallus*

Fig 41: Árbol filogenético construido con análisis de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC K80+I+G, a partir de las 40 secuencias del gen *COI - M. gallus* (Anexo 02)

Fig 42: Comparación de la forma radial de árbol filogenético construido con el algoritmo MP, usando la función Kimura – 2P1 a partir de las 37 secuencias del gen *16S-M. gallus*

Fig 43: Comparación de la forma radial de árbol filogenético construido con análisis de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G, a partir de las 37 secuencias del gen *16S-M. gallus* (Anexo 02)

Fig 44: Árbol filogenético concatenado de las secuencias parciales de los genes *COI-16S* de *M. gallus*: construido con el algoritmo MP usando la función Kimura – 2P

Fig 45: Árbol filogenético concatenado de secuencias de *M. gallus*: *COI-16S*, construido con análisis de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G (Anexo 02)

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 01: TABLAS COMPLEMENTARIAS

Tabla 21: Distancias genéticas (d) *intrasibling* del gen *COI* para las especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano unidas a las especies gemelas del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

Tabla 22: Distancias genéticas (d) *intersibling* del gen *COI* para las especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano unidas a las especies gemelas del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

Tabla 27: Número total de especímenes de *M. inca* y *M. gallus* obtenidos por fecha de muestreo

Tabla 32: Comparación de parámetros genéticos básicos en el gen *COI* *M. inca* según su posición en el codón de inicio

Tabla 33: Composición nucleotídica del gen *COI*, para *M. inca* en las diferentes posiciones del codón de inicio

Tabla 34: Composición de aminoácidos (%) de las secuencias de *M. inca*, gen *COI*, según posición 3 del marco de lectura

Tabla 34: Composición de aminoácidos (%) de las secuencias de *M. inca*, gen *COI*, según posición 3 del marco de lectura

Tabla 39: Estimadores de parámetros demográficos utilizados para el análisis de cambio en el tamaño poblacional, de las secuencias parciales de las secuencias de los genes *COI* y *16S* para *M. inca*

Tabla 41: Valores encontrados para las pruebas de Neutralidad: Tajima' D y Fu'S Fs para las secuencias parciales de las secuencias de los genes *COI* y *16S* para *M. inca*

Tabla 45: *Population pairwise* F_{ST} en 15 poblaciones de *M. inca* basado en la frecuencia de haplotipos de la secuencia parcial del gen *COI*

Tabla 48: *Population pairwise* F_{ST} en 15 poblaciones de *M. inca* basado en la frecuencia de haplotipos de la secuencia parcial del gen *16S*

Tabla 52 : Comparación de parámetros genéticos básicos en el gen *COI* - *M. gallus* según su posición en el codón de inicio

Tabla 53: Composición nucleotídica del gen *COI-M. gallus* en las diferentes posiciones del codón de inicio

Tabla 54: Composición de aminoácidos (%) de las secuencias de *M. gallus*, gen *COI*, según la tercera posición del codón

Tabla 55: Número promedio y frecuencia de uso de codones de las secuencias de *M. gallus* del gen *COI*

Tabla 59: Estimadores de parámetros demográficos utilizados para el análisis de cambio en el tamaño poblacional, para el gen *COI* y *16S* – *M. gallus*

Tabla 61: Valores encontrados para las pruebas de Neutralidad: Tajima' D y Fu'S Fs para los genes *COI* y *16S* - *M. gallus*

Tabla 64: *Population pairwise* F_{ST} para *M. gallus* basado en la frecuencia de haplotipos de la secuencia parcial de *COI* en los ríos Zarumilla y Tumbes

ANEXO 02: FIGURAS COMPLEMENTARIAS

Fig 11: Árbol filogenético concatenado de especies del género *Macrobrachium*: *COI-16S* construido con el algoritmo de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G

Fig 12: Árbol filogenético concatenado de especies del género *Macrobrachium*: *COI-28S* construido con el algoritmo de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G

Fig. 13: Árbol filogenético concatenado de especies del género *Macrobrachium*: *16S-28S* construido con el algoritmo de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G

Fig 30: Árbol filogenético construido con el algoritmo de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G, a partir de los 171 haplotipos encontrados para las 326 secuencias del gen *COI-M. inca*

Fig. 32: Comparación de árbol filogenético construido con el algoritmo de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución: GTR+I, a partir de los 60 haplotipos encontrados para las 334 secuencias del gen *16S-M. inca*

Fig 41: Árbol filogenético construido con el algoritmo de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC K80+I+G, a partir de las 40 secuencias del gen *COI - M. gallus*

Fig 43: Comparación de la forma radial de árbol filogenético construido con el algoritmo de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G, a partir de las 37 secuencias del gen *16S-M. gallus*

Fig 45: Árbol filogenético concatenado de secuencias de *M. gallus*: *COI-16S*, construido con el algoritmo de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G

ANEXO 03:

Especies Trans-isthmianas de *Macrobrachium* consideradas gemelas de especies *Macrobrachium* de la vertiente del Pacífico peruano y otros palaemónidos utilizadas para el análisis filogenético, con las respectivas localidades de colecta, número de catálogo, y números de adhesión en GenBank (Tomado de Pileggi *et al.*, 2014)

ANEXO 04:

Foto 1: *Macrobrachium transandicum* Holthuis, 1950. A, Hembra del río Zarumilla. B, detalle del rostro.

Foto 2: *Macrobrachium transandicum* Holthuis, 1950. Hembra del río Zarumilla.

Foto 3: *Macrobrachium transandicum* Holthuis, 1950. A, Macho del río Tumbes. B, Detalle del rostro. C, quela mayor.

Foto 4: *Macrobrachium transandicum* Holthuis, 1950. Macho del río Tumbes. A, quela menor; B, gonoporo, coxa quinto par de periópodos.

Foto 5: *Macrobrachium digueti* Bouvier, 1895. A, Macho del río Zarumilla. B, detalle del rostro; C, uña de la quela mayor.

Foto 6: *Macrobrachium panamense* Rathbun, 1912. A, Macho del río Tumbes. B, detalle del telson; C, Detalle del rostro.

Foto 7: *Macrobrachium gallus* Holthius, 1950. A, Macho del río Zarumilla. B, detalle del rostro; C, Detalle del telson.

Foto 8: *Macrobrachium gallus* Holthius, 1950. A, Macho del río Zarumilla. B, detalle del telson; C, Detalle del rostro.

Foto 9: *Macrobrachium inca* Holthius, 1950. A, Macho del río Chicama. B, detalle del rostro; C, Detalle del rostro de hembra de río Santa; D, telson

ANEXO 05: Modelos de Sustitución

ANEXO 06: Test de Saturación de las Secuencias del gen *COI* – *M. inca*

ANEXO 07: Frecuencia de Haplotipos – *M. inca COI*

ANEXO 08: Frecuencia de Haplotipos – *M. inca 16S*

ANEXO 09: Test de Saturación de las Secuencias del gen *COI* – *M. gallus*

ANEXO 10: Frecuencia de Haplotipos – *M. gallus COI*

ANEXO 11: Frecuencia de Haplotipos – *M. gallus 16S*

ANEXO 12: Algunos lugares de adquisición de los especímenes con características de las zonas

RESUMEN

Los camarones del género *Macrobrachium* incluye especies de agua dulce con diversos rangos de hábitats, desde áreas salinas, ríos abiertos y cuerpos de agua encerrados, y que a pesar de de la importancia económica y culinaria que presentan, estudios sobre ellos en ríos peruanos son escasos, menos aún aquellos relacionados con la acreditación molecular de su estatus de especie de seis de las ocho morfoespecies del género *Macrobrachium* que existen (*M. americanum*, *M. digueti*, *M. panamense*, *M. transandicum*, *M. inca* y *M. gallus*), así como sus relaciones filogenéticas; o para el caso específico de *M. inca*, y *M. gallus*, estudios de su estructura poblacional que fundamenten realmente las normas legales para su conservación haciendo uso de metodologías estadísticas biogeográficas para implementar aproximaciones filogeográficas a nivel intraespecífico.

El informe de investigación se divide en dos capítulos: El Capítulo I versa sobre las **Relaciones Filogenéticas a nivel molecular entre las especies del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano y con especies de *Macrobrachium* de la vertiente del atlántico**, y el Capítulo II que aborda la **Estructura Poblacional de *M. inca* y *M. gallus*, basada en las secuencias parciales de los genes *COI* y *16S***.

El Capítulo I gira en torno a la hipótesis que *M. americanum*, *M. digueti*, *M. panamense* y *M. transandicum* son especies definidas en su estatus molecular y cuentan con especies gemelas en la vertiente del Atlántico; y que *M. inca* y *M. gallus* no las presentan, pero están relacionadas con *M. americanum* y *M. panamense*, respectivamente. Los objetivos propuestos para este capítulo son los de confirmar la identidad morfológica, caracterizar la identidad molecular y relaciones filogenéticas en base al análisis de un fragmento de los genes *COI*, *16S*

y 28S e inferir las relaciones filogenéticas determinando el tiempo de divergencia entre las especies del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano y las especies consideradas como gemelas de *Macrobrachium* de la vertiente del Atlántico y separadas por vicarianza generada por el istmo de Panamá.

La muestra consistió en 152 camarones de 06 especies del género *Macrobrachium*, 08 de *Palaemon hancockii* y 03 de *Cryphiops caementarius*, tomadas entre octubre del 2013 y febrero del 2016, obtenidos principalmente de los ríos Tumbes y Zarumilla e identificados morfológicamente según la clave propuesta por Méndez (1981). Las secuencias amplificadas por PCR convencional y secuenciadas por electroforesis capilar, fueron analizadas para establecer la filogenia con los métodos de MP e IB. Con secuencias obtenidas del Genbank de las especies consideradas hermanas, se estableció el tiempo de divergencia en Ma.

Los resultados obtenidos, permitieron demostrar el estatus de especie a nivel molecular, sólo de *M. inca*, *M. gallus*, *M. panamense*, *M. digueti* y *M. americanum*; más no de *M. transandicum*, recomendándose mayor muestreo para reexaminar su posición como especie. Se comprobó el origen monofilético de las especies de *Macrobrachium* de los ríos peruanos, usándose *P. hancockii* como grupo externo. La hipótesis de que *M. inca* y *M. gallus* están relacionadas con *M. americanum* y *M. panamense*, respectivamente, está soportada sólo por las secuencias del gen 28S. Con secuencias parciales del gen 16S se validó la hipótesis de que *M. americanum*-*carcinus*; *M. digueti*-*M. olfersi* y *M. panamense*-*M. amazonicum*, son especies gemelas. Los tiempos de divergencia de 4.4- 4.04; 2.33-1.81 y 5.0-3.65 Ma para cada pareja y ante la discrepancia relacionada con el tiempo del cierre del istmo de Panamá, se concuerda, de que, a lo largo de su formación y cierre, el istmo de Panamá fue causando especiación por vicarianza de manera gradual en las

especies del género *Macrobrachium* que se encuentran en los ríos de ambas vertientes.

En el Capítulo II se analiza la hipótesis que *M. inca* y *M. gallus* independientemente presentan poblaciones únicas, con baja o moderada diversidad genética, sin asociación con la distribución geográfica y que se encuentran en expansión. Los objetivos consistieron en determinar la variabilidad genética, la estructura poblacional y analizar la demografía histórica de *M. inca* y *M. gallus* a través de secuencias parciales de los genes mitocondriales *COI* y *16S*. La muestra consistió en 476 especímenes de *M. inca* y 114 especímenes de *M. gallus* tomados entre octubre del 2013 y junio del 2016, obtenidos en 14 ríos y una quebrada, desde Tumbes hasta Supe.

Los resultados sugieren que *M. inca* es una especie que se caracteriza por haber pasado por una etapa de reducción, seguida de una expansión demográfica, indicado por el bajo índice nucleotídico, elevado porcentaje de haplotipos únicos, forma de estrella de la red de haplotipos, valores negativos de los índices de neutralidad de Tajima y F_{st} , y el *mismatch* unimodal. El AMOVA definió que la población, de acuerdo al gen *COI* no está estructurada, pero según el gen *16S* ligeramente estructurada, con la mayor variación intrapoblacional. Estos resultados sugieren una población única, con niveles altos de flujo genético, por lo que deben ser consideradas como una única unidad de gestión.

Por su parte *M. gallus*, que sólo fue encontrada en los ríos Tumbes y Zarumilla, presentó resultados un tanto diferentes en los genes estudiados: Para *COI*, los *mismatch* al tener tendencia unimodal junto con los valores de neutralidad de F_{st} altamente significativos, sugieren que esta especie se encuentra en una ligera expansión. Por su lado, las secuencias del gen *16S* mostraron sólo valores

significativos para el río Zarumilla y para el total de la población, lo que aunado con la distribución *mismatch* multimodal sugiere estabilidad demográfica. En conjunto, ambos genes estarían sugiriendo que la población está en desequilibrio con menor posibilidad de expansión. Ambos ríos presentan un número alto de haplotipos únicos (90% - 89% en *COI* y 73% - 60% en *16S*, para los ríos Zarumilla y Tumbes, respectivamente, que se evidencia en las redes de haplotipos. El AMOVA encontrado para *COI* presentó que la población está estructurada, pero con la mayor variación dentro de cada población. Respecto a la propuesta de gestión y conservación de *M. gallus* en los dos ríos del Pacífico peruano, los datos sugieren que mientras no existan otros datos con otros marcadores o se realice un muestreo más fino, que reafirmen o contradigan lo encontrado en el presente estudio, ambas poblaciones deben ser consideradas como unidades de gestión diferentes.

Palabras claves: Citocromo oxidasa subunidad I, *16SrDNA*, *28S rDNA*, *Macrobrachium americanum*, *Macrobrachium digueti*, *Macrobrachium panamense*, *Macrobrachium transandicum* *Macrobrachium inca*, *Macrobrachium gallus*, filogenia, vicarianza, estructura poblacional, haplotipos.

ABSTRACT

The *Macrobrachium* shrimp genre includes species from fresh water with different habitats, such as open rivers and enclosed body areas. Even though they have a highly economic and culinary importance, shrimp studies in Peruvian rivers are limited, even less those studies related to their molecular certification status of six out of eight morphospecies from the *Macrobrachium* genre: *M. americanum*, *M. digueti*, *M. panamense*, *M. transandicum*, *M. inca* y *M. gallus*, and to their phylogenetic relationships. Specifically, there is a lack of population structure studies of *M. inca*, and *M. gallus*, that really support laws for their conservation making use of biogeographic statistical methodologies to implement phylogeographic approaches at the intraspecific level.

This study contains two chapters: Chapter I describes **molecular phylogenetic relation between species of the *Macrobrachium* genre from pacific Peruvian rivers and species of the *Macrobrachium* genre from the Atlantic slope**. Chapter II delineate the population structure of ***M. inca* and *M. gallus*, based on the partial sequences of COI and 16S genes**.

Chapter I recounts the hypothesis that whereas *M. americanum*, *M. digueti*, *M. panamense* and *M. transandicum* are species defined in their molecular status that have twins species in the Atlantic slope, *M. inca* and *M. gallus* do not present twin species in the Atlantic slope, but that they are related to *M. americanum* y *M. panamense*, respectively. The aims proposed for this chapter are: to confirm the morphological identity, to characterize the molecular identity and phylogenetic relations based on analysis on *COI*, *16S* y *28S* fragments, and finally to infer the

phylogenetic relations determined by the divergence time between species of *Macrobrachium* genre from the Pacific river and the species considered as twins of the *Macrobrachium* genre from the Atlantic slope.

152 shrimps were collected: 06 species of *Macrobrachium* genre, 08 of *Palaemon hancockii* genre, and 03 of *Cryphiops caementarius* genre, collected from October 2013 and February 2016. Shrimps were collected from Tumbes and Zarumilla rivers and they were morphological identified as previously described by Méndez (1981). Sequences amplified by PCR and by capillary electrophoresis were analyzed to establish phylogeny with MP and IB methods. Using Genbank sequences from species considered as twins, it was established the divergence time (My).

The results obtained allowed us to demonstrate the molecular status of *M. inca*, *M. gallus*, *M. panamense*, *M. digueti* y *M. americanum*, but *M. transandicum*, suggesting that a greater number of samples is required to re-examine its status as a specie. The morphological origin of *Macrobrachium* species from Peruvian rivers was proved using *P. hancockii* as an external group. Our hypothesis that *M. inca* y *M. gallus* are related to *M. americanum* y *M. panamense*, respectively, is supported only by the 28S sequences. On the other hand, our hypothesis that *M. americanum*-*M. carcinus*, *M. digueti*-*M. olfersi* and *M. panamense*-*M. amazonicum* are twin species was validated by 16S sequences. The divergence times go through 4.4- 4.04; 2.33-1.81 y 5.0-3.65 My for each specie related. However, there is a discrepancy between the time of the closure of the Panama Isthmus with the My times, suggesting that during the its formation and closure,

the Panama Isthmus caused a gradually vicarious speciation of the *Macrobrachium* genre species that are present in the rivers from both slopes.

Chapter II analyze the hypothesis that *M. inca* and *M. gallus* present unique populations, with low and moderate genetic diversity without any geographical distribution association with constant expansion. The aims were to determine the genetic variability, population structure, and to analyze the historical demography of *M. inca* and *M. gallus* through partial sequences of mitochondrial genes such as *COI* y *16S*. The samples consisted in 476 organisms from of *M. inca* and 114 organisms of *M. gallus* collected between October 2013 and June 2016 from 14 rivers and one stream, along Tumbes and Supe.

Our results suggest that *M. inca* went through a reduction stage followed by a demographic expansion, indicated by the low nucleotide index, high percentage of unique haplotypes, star shape of haplotypes, negative index values of Tajima and F_{st} , and finally the *mismatch* unimodal. By AMOVA we defined that the population, based on the *COI* gen, is not structured. However, according to *16S* gene, the population is relative structured, with the highest interpopulation variety. These results suggest that this population is unique, with high levels of genetic flow, arguing that it might be considered as a single management unit.

On the other hand, *M. gallus*, was only observed in the Tumbes and Zarumilla rivers. It also showed different results in the analyses: For *COI*, the mismatch had a unimodal tendency along with the neutrality F_{st} values, suggesting that this specie is a moderate expansion. In contrats, *16S* gene sequences analyses showed only significative values for the Zarumilla river, which together with the

multimodal mismatch distribution suggests demographic stability. Altogether, both genes would be suggesting that the populations is in imbalance with less possibility of expansion. Both rivers present high number of unique haplotypes (90% - 89% in *COI* and 73% - 60% in *16S*, for the Zarumilla and Tumbes rivers, respectively. The AMOVA found for *COI* showed that the populations is structured, but with the greatest variation eithin each population. Regarding the management and conservation proposal of *M. gallus* in the two rivers of the Peruvian Pacific, the data suggests that a long as no other data with others markers or a finer sampling is carried out, they reaffirm or contradict what was found in the present study, both populations should be considered as different management units.

Keywords: *cytochrome oxidase subunit I, 16SrDNA, 28SrDNA, Macrobrachium americanum, Macrobrachium digueti, Macrobrachium panamense, Macrobrachium transandicum Macrobrachium inca, Macrobrachium gallus, phylogeny, vicariance, population structure, haplotypes.*

1.0 INTRODUCCIÓN

De todos los crustáceos, el Orden Decapoda Latreille 1802, es indudablemente el grupo más reconocido, registrando aproximadamente 15 000 especies (Ahyong *et al.*, 2011; Toon *et al.*, 2009), en su mayoría restringidas en áreas marinas. El conocimiento de la biodiversidad de este grupo en ecosistemas alrededor del mundo se ha dirigido principalmente hacia especies que habitan ecosistemas estuarinos y marinos, y poco ha sido el esfuerzo para conocer la fauna dulceacuícola. Estos organismos – los decápodos - han sido el sujeto de más publicaciones que los otros crustáceos combinados, no sólo por la importancia económica que muchos de ellos tienen, sino también debido a su tremenda diversidad. Su gran tamaño los predispuso para ser sujetos de algunos de los primeros trabajos usando datos bioquímicos y moleculares para resolver sus relaciones de parentesco (Martin y Davis, 2001).

Los Decapoda forman un grupo bastante ancestral, considerando para el caso particular de los Caridea, su origen en el Devónico Superior (Fransen y De Grave, 2009; Felgenhauer y Abele, 1983) en la parte central de Norte América (Felgenhauer y Abele, 1983), es decir 417 – 423 millones de años (Ma) permitiendo un considerable vacío entre la aparición de fósiles y el origen estimado de los linajes superiores (Fransen y De Grave, 2009). Con respecto al género *Macrobrachium*, está pensado que su existencia data, desde el Oligoceno tardío y el Mioceno temprano, hace 30 a 20 Ma (Murphy y Austin, 2005).

Los Decapoda, incluyen dos grandes ramas: Dendrobranchiata y Pleocyemata Burkenroad 1963, este último conteniendo los decápodos no peneidos, nadadores o reptantes. Dentro de ellos, la familia Palaemonidae, que comprende aproximadamente 116 géneros y 876 especies (Martín *et al.*, 2009), es un grupo

muy exitoso de decápodos habitando ambientes marinos, de estuario y de agua dulce de todo el mundo. Está corrientemente subdividida en cuatro subfamilias: Pontoniinae, Euryrhynchinae, Typhlocaridinae y Palaemoninae (Holthuis, 1952; Murphy y Austin, 2003), si bien Valencia y Campos (2007) reportan que la familia está subdividida en dos subfamilias: Pontoniinae conteniendo camarones marinos y Palaemoninae, que incluye especies marinas, de estuario y de agua dulce.

Los Palaemoninae incluyen 17 géneros, diez de los cuales están reportados para América (Valencia y Campos, 2007) y cuenta con los géneros probablemente más comunes: *Macrobrachium*, *Palaemon* y *Palaemonetes* (Murphy y Austin, 2003). *Macrobrachium* como un nuevo género fue propuesto por Bate (1868) describiéndolo con cuatro especies integrantes: *M. americanum*, *M. formosense*, *M. longidigitum* y *M. africanum*; con una descripción para diferenciarlo del género *Palaemon*, basada en detalles como el tamaño del segundo par de periópodos. En 1950, Holthuis describe doce nuevas especies de camarones palaemónidos para aguas americanas, siendo del género *Macrobrachium*: *M. inca*, *M. rathbunae*, *M. transandicum*, *M. occidentale*, *M. crenulatum* y *M. hancocki*. Para el caso de *M. inca*, menciona que el holotipo es un macho del Río Moche, en el norte de Perú.

Los *Macrobrachium* como género fueron descritos de manera más detallada por Holthuis (1952) en “*A General revisión of the Palaemonidae (Crustacea, Natantia, Decapoda) of the Americas. II. The Subfamily Palamininae*”. En esa publicación destaca como distintivo básico del género, la presencia de la espina hepática y ausencia de la espina branquiostegal y otros caracteres definidos en una clave de identificación, señalando que la misma es dificultosa de realizar por varios factores:

- Sólo un pequeño número de características es utilizable para identificación, dado que la forma general y muchos arreglos es común en todas las especies. La

identificación básica se da con características del rostro y el segundo par de periópodos.

- Muchos de los caracteres son variables dentro de las especies, especialmente durante el desarrollo del animal, por ejemplo, el rostro se acorta con la edad.
- La hembra es muy diferente del macho al estado adulto, no así en organismos juveniles, siendo dificultoso separa hembras de dos especies diferentes al estado juvenil.

El género puede ser ecológicamente separado en dos grupos: Las que requieren concentraciones salinas específicas (aproximadamente 1/3 de agua de mar) para completar su desarrollo larval (Munasinghe, 2010); habitan en ríos y arroyos costeros a distancia generalmente no muy grande del mar. Otras denominadas de tierra adentro o continentales, con distribución más limitada y con ciclo vital completado sólo en agua dulce (Munasinghe, 2010); han sido capaces de penetrar al interior de los continentes a través de los grandes ríos independizándose de los estuarios.

A pesar de una larga historia sistemática, estos organismos son taxonómicamente recalcitrantes, debido a la presencia de fuerte conservacionismo interespecífico y considerable variación intraespecífica, ocasionando que un tratamiento taxonómico a esos niveles sea ambiguo debido a la dificultad de trabajar con morfologías convergentes y a la carencia de diferencias morfológicas entre especies (Pileggi y Mantelatto, 2010). Mucho debate ha envuelto las relaciones sistemáticas de muchas especies dentro de este grupo, las cuales hasta hace poco estuvieron basadas exclusivamente en la comparación de características externas (de Bruyn, 2005).

Las primeras aproximaciones para resolver las preguntas relacionadas con la sistemática dentro del género *Macrobrachium* fueron realizadas por Murphy y

Austin (2002), quienes reconocieron que ha habido problemas relacionados con la clasificación de los Palaemonidae, a nivel de especie, de género y de familia, atribuidos a las dificultades en la interpretación de la significancia de las características morfológicas usadas para clasificarlos, dificultando además el desarrollo de sistemas estables de clasificación (Murphy y Austin, 2002; 2003) . Los autores consideran así mismo, que la clasificación que Holthuis (1950, 1952) estableció, es la más ampliamente distribuida y está basada en un número de características morfológicas, pero que, sin embargo, el esquema ha sido criticado, por no reflejar con exactitud relaciones evolucionarias dentro del grupo.

Una hipótesis morfológica acerca de las relaciones filogenéticas dentro de los Palaemonoidea fue presentada por Pereira (1997), quien concluye que tanto la superfamilia Palaemonoidea como la familia Palaemonidae son grupos naturales, pero que un rearrreglo de los subgrupos palaemonide podría reflejar mejor sus relaciones filogenéticas. Martín *et al.* (2009) indica que varios géneros en la subfamilia Palaemoninae, tales como *Macrobrachium*, *Cryphiops*, *Palaemon*, *Palaemonetes*, y *Pseudopalaemon*, son parafiléticos.

La mayoría de estudios sobre relaciones filogenéticas dentro de la familia Palaemonidae, se han focalizado en el género *Macrobrachium*, el más grande dentro de la subfamilia Palaemoninae (conteniendo aproximadamente el 65% de las especies de esta subfamilia), encontrándose evidencia de anomalías con la clasificación taxonómica corriente, la que no refleja con exactitud la historia evolucionaria y las relaciones filogenéticas dentro de las especies que integran el género *Macrobrachium* (Murphy y Austin, 2003; Lefébure *et al.*, 2006; Pileggi y Mantelatto, 2010; Rossi, 2012).

Recientemente se han iniciado esfuerzos para tratar de dilucidar las relaciones intragenéricas de las especies *Macrobrachium* usando marcadores moleculares, ayudando a clarificar ciertas interrogantes e inconsistencias que se presentaron durante las investigaciones basadas netamente en la morfología. La mayoría de los estudios han sido conducidos para especies de la región Indo-Pacífico, no incluyéndose especies americanas en el análisis (Pileggi y Mantelatto, 2010). Así mismo, un reciente estudio realizado sobre langostinos del género *Macrobrachium* por García *et al.* (2013), no incluye a *M. inca* y *M. gallus* como especies presentes en ríos americanos. Por su lado, Anger (2013) en una revisión de los *Macrobrachium*, menciona a *M. inca* y *M. gallus* como especies presentes en los andes sudamericanos.

Hasta los años 60, los análisis de fósiles eran la única fuente de información acerca del tiempo de cuando los ancestros de los organismos extantes vivieron y desde ese entonces, los estudios de genética molecular han proporcionado los llamados relojes moleculares que ayudan a estimar la historia evolutiva y tiempo de divergencia entre organismos, sobre todo en aquellas especies que carecen de un registro fósil, o de aquellos linajes que muestran poca morfogénesis a través del tiempo o exhiben mucha variabilidad fenotípica (Bargues *et al.*, 2000; Marko, 2002).

La hipótesis del reloj molecular asume que la sustitución de nucleótidos en una secuencia de DNA ocurre a una tasa constante para proporcionar un método para medir el tiempo de divergencia entre dos secuencias (Zuckerlandl y Pauling, 1965), pudiéndose de este modo reconstruir la historia filogenética y resolver el tiempo en que se dio la ramificación entre linajes (Bargues *et al.*, 2002). Así, en ausencia de un adecuado registro fósil, los eventos geológicos antes de la primera aparición en la medición geológica de taxa hermanas, son a menudo usados para calibrar el reloj molecular.

La formación del istmo de Panamá en el continente americano, causado principalmente por actividad tectónica durante la colisión del arco volcánico de Panamá con el norte de América del Sur (Molnar, 2008; Buchs *et al.*, 2019) y cuyo modelo general de formación establece que se cerró hace aproximadamente 3.5 millones de años (Coates y Stallard, 2013; Coates *et al.*, 1992), aislando los océanos Atlántico Tropical Oeste del Pacífico Este; es uno de tales eventos que se usa frecuentemente para inferir tasas de divergencia nucleotídica en secuencias de DNA (Marko, 2002; Craig *et al.*, 2004; Bermingham y Lessios, 1993; Bermingham *et al.*, 1997; Haug *et al.*, 2001).

La calibración ístmica asume que especies gemelas similares morfológicamente viviendo a ambos lados del istmo, fueron aisladas geográficamente por los últimos estados de cierre del camino oceánico (Marko, 2002; Knowlton *et al.*, 1993; Lessios, 2008). En tal sentido, haciendo especial referencia a taxones transístmicos, Jordán (1908) acuñó el término “especies gemelas”, para pares de taxones hermanos, similares morfológicamente y que habitan a ambos lados de una barrera geográfica. La literatura taxonómica sugiere numerosos pares de especies, caracterizadas por el grado de diferencia morfológica, divergencia molecular o aislamiento reproductivo entre ellas, ubicadas a ambos lados de éste (Knowlton y Weigt, 1998; Knowlton *et al.*, 1993; Tringali *et al.*, 1999; Beu, 2001; Dick *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2010; Lessios, 2008). Los camarones del género *Macrobrachium*, también son uno de los géneros que presentan especies muy similares separadas por el istmo de Panamá (Holthuis, 1952).

Aunque los camarones del género *Macrobrachium* con interés económico y pesquero son bien conocidos y explotados en casi todas las comunidades ribereñas de Latinoamérica, no han sido apropiadamente estudiados, por lo que su conservación está en riesgo (García *et al.*, 2013). Las características económicas,

sociales y culturales de la mayoría de los países de la región en donde habita este crustáceo, se traducen en el deterioro del hábitat y la sobreexplotación pesquera, (inclusive con métodos prohibidos) lo que pone en peligro de desaparición sus poblaciones (García *et al.*, 2013; Bowles *et al.*, 2000).

En Perú, a pesar de la importancia económica y culinaria que presentan los camarones, estudios sobre camarones de agua dulce peruanos son escasos y los existentes están mayormente relacionados a *Cryphiops caementarius*. Estudios sobre especies de *Macrobrachium*, se tienen al realizado por Reyes *et al.* (1992), sobre la influencia de la temperatura del agua en la pre-crianza de *M. panamense* en acuarios; el de Tagle (1981) que llega a determinar 10 estadíos larvales pero no llega a completar el desarrollo larvario de *M. gallus* en laboratorio; el de Gómez *et al.* (1991) que lograron obtener juveniles de *M. gallus* en laboratorio, el de Manrique (2013) que encontró que una densidad de siembra de 9 individuos/40 litros fue mejor en un 80% en la sobrevivencia y crecimiento de juveniles de *M. amazonicum* criados en acuarios en Yurimaguas; el de Arica y Barrientos (2013) que obtuvieron sobrevivencia hasta zoea II en un ensayo de reproducción de *M. americanum*, en laboratorio, con el fin de proveer de semilla que mitigue lo disminuido que están las poblaciones a causa de la sobreexplotación del recurso.

Sin embargo, no se reportan investigaciones realizadas en nuestro país, relacionadas con la acreditación molecular de su estatus de especie, así como sus relaciones filogenéticas; o para el caso específico de *M. inca*, y *M. gallus*, estudios de su estructura poblacional que fundamenten realmente las normas legales para su conservación, haciendo uso de metodologías estadísticas biogeográficas para implementar aproximaciones filogeográficas a nivel intraespecífico. Estudios en el Perú sobre camarones a este nivel, sólo se reporta el de Reyes (2012) para *Cryphiops caementarius*, en los ríos de la zona centro - norte del país.

2.0 CAPÍTULO I

RELACIONES FILOGENÉTICAS A NIVEL MOLECULAR ENTRE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *MACROBRACHIUM* DE LOS RÍOS DEL PACÍFICO PERUANO Y CON ESPECIES DE *MACROBRACHIUM* DE LA VERTIENTE DEL ATLÁNTICO

Los camarones del género *Macrobrachium* Bate 1868, son importantes miembros de los sistemas de agua dulce y estuarinos, posiblemente el más conocido de la subfamilia Palaemoninae, no sólo por el número de especies que incluye, sino también por su amplia distribución geográfica e importancia comercial (Bowles *et al.*, 2000). Tiene actualmente reconocidas unas 240 especies (Rossi y Mantelatto, 2013; Pileggi y Mantelatto, 2010; De Grave y Franssen, 2010; García *et al.*, 2013) habiendo aún un número grande de especies crípticas que no han sido descritas (Liu *et al.*, 2007). Su distribución es pantropical, y si bien la mayor diversidad aparece en la región Indo-Pacífico, para América se han reportado unas 57 especies, y aunque su número real permanezca como una incertidumbre, ninguna de ellas está presente en otras zonas geográficas que no sea América (Anger, 2013).

Una serie de estudios han examinado la taxonomía y distribución de los camarones ribereños en varias latitudes, y si bien la aproximación más cercana es la referida por Holthuis (1952), quien revisó la subfamilia Palaemoninae de las Américas, han sido descritas otras especies que las corrientemente conocidas y de las especies ya conocidas, ha sido ampliada su distribución (Bowles *et al.*, 2000).

Es así, que de las 8 especies del género *Macrobrachium* reportadas para Perú para la vertiente del Pacífico (Amaya y Guerra, 1976; Méndez, 1981; ONERN, 1986; Hendrickx y Wicksten, 2011; Valencia y Campos, 2007; Luque, 2008)), seis de ellas (*M. americanum*, *M. tenellum*, *M. digueti*, *M. hancocki*, *M. panamense*) no son

exclusivas de los ríos peruanos, sino que también están presentes en América Central y México (Mc Larney *et al.*, 2010; Hernández, 2008; Valencia y Campos, 2007) (Fig 1), aunque en la distribución inicial de Holthuis (1952) para *M. panamense*, *M. hancockii* y *M. digueti*, no estaban considerados los ríos peruanos.

En la descripción que hizo, Holthuis en 1952 de los *Macrobrachium* de América, señaló que “existe una buena distinción entre las especies que habitan las aguas dulces de los ríos que desembocan en el océano Atlántico con respecto a las especies que habitan las aguas de los ríos que desembocan en el océano Pacífico”; pero que, sin embargo, muchas de las especies del Oeste están cercanamente relacionadas con las especies del Este, siendo muy pequeña la diferencia entre ellas, estableciendo parejas de especies gemelas:

- a) *M. americanum* – *M. carcinus*
- b) *M. tenellum* – *M. acanthurus*
- c) *M. digueti* – *M. olfersii*
- d) *M. panamense* – *M. amazonicum*
- e) *M. transandicum* – *M. surinamicum*
- f) *M. hancockii* – *M. crenulatum*.

En esa misma descripción también se señala, que, al momento de la publicación, sólo dos especies conocidas para el lado oeste de América (*M. inca* y *M. gallus*), no son directamente comparables con formas del este. Si bien *M. inca* no está relacionada de manera directa con ninguna especie americana conocida, sugiere que probablemente lo más cercano sea una relación con *M. carcinus* y *M. americanum*, distinguiéndose de ellas sólo por su menor tamaño, por el menor tamaño de los dedos del segundo par de patas y por el mero de la pata más hinchado. Con respecto

a *M. gallus*, la especie puede estar cercanamente relacionada con *M. panamense*, pero puede diferenciarse rápidamente de ésta, por el margen posterior del telson.



Figura 1: Distribución geográfica de las especies *M. digueti*, *M. olfersii* y *M. hancockii* (Tomado de Rossi, 2012)

Las especies gemelas, mencionadas, son especies morfológicamente iguales separadas por el istmo de Panamá, hace aproximadamente 3.5 Ma (Knolwton *et al.*, 1993; Knolwton y Weigt, 1998; Fortunato, 2008; O’Dea *et al.*, 2016) y usadas ampliamente para inferir tasas de evolución molecular a partir de tasas de divergencia de secuencias nucleotídicas, asumiendo que especies gemelas, morfológicamente similares viviendo ahora a ambos lados del istmo, fueron aisladas geográficamente por los últimos estados del cierre del corredor marino (Marko, 2002). Muchos de estos estudios asumen que el cese del flujo génico entre

las poblaciones de organismos separados por el istmo ocurrió cuando éste cerró completamente la comunicación, por lo que, usando esta asunción, la cantidad de divergencia entre especies gemelas puede ser usada para estimar la tasa a la cual los genes divergen (Marko, 2002; Knowlton y Weigt, 1998).

La formación del istmo de Panamá no sólo causaría esta especiación alopátrica vicariante, sino que hizo más fácil para que animales y plantas, se dispersaran entre los dos continentes, en el *Gran Intercambio Americano*, descrito principalmente para grandes mamíferos (Fortunato, 2008). Ello no significó que otro tipo de organismos, sobre todo acuáticos, no pudieran desplazarse una vez establecido el puente de tierra, asumiéndose que las especies ya gemelas por la separación de ambos océanos, comenzaron a migrar hacia la parte norte de Sudamérica, encontrando un sistema de ríos establecidos en el Paleoceno (Anger, 2013), manteniendo su condición separada al encontrarse con otra barrera: la Cordillera de los Andes, de formación mucho más antigua, pues se asocia el desarrollo de la parte norte con eventos de alta/baja presión y temperatura en el Mesozoico (Alemán y Ramos, 2000; Horton, 2018).

Al respecto, Bermingham y Martin (1998), consideran que peces de agua dulce también participaron del Gran Intercambio Americano, anotando que, debido a que la dispersión de los peces de agua dulce (y de cualquier organismo que habita este medio), es dependiente de conexiones entre cuencas hidrográficas de manera directa, y debido a que la historia de interconexiones de las cuencas refleja el desarrollo geológico fundamental de los paisajes, el análisis de los organismos de agua dulce permite hacer fuertes inferencias sobre la evolución geológica de una región.

Diferentes publicaciones reportan una serie de especies gemelas originadas luego de la aparición del istmo de Panamá: Tringali *et al.* (1999) mencionan el caso de especies gemelas en peces marinos; Beu (2001) en gasterópodos tonioideanos; Dick *et al.* (2003) en briozoos; Miura *et al.* (2010) en serpientes de costa; Lessios (1998) y Bermingham y Lessios (1993) en erizos, isópodos y peneidos; Knolwlton y Weigt (1998) para langostinos. Marko (2002) reporta que los diferentes autores aplicaron datos de calibración a partir de la medida fósil para citocromo oxidasa I (*COI*) y el gen nuclear histona-3 (H3) para encontrar divergencia para seis pares de especies gemelas en el género *Arcidae*; sin embargo, análisis en la primera base de *COI* para todas las seis especies gemelas, establece que los tiempos de separación son significativamente mayores que 3.5 millones de años (Ma). La secuencia de H3 establece mucha más reciente gemelaridad.

Para el caso de los camarones *Macrobrachium*, la gemelaridad propuesta por Holthuis (1952), ha sido comprobada en cierta manera para algunas especies, tal es el caso del trabajo presentado por Pereira (1997) y Pereira *et al.* (2002), quienes en un análisis filogenético de especies del género *Macrobrachium* usando el gen *COI*, proponen un árbol en el que está presente *M. panamense* muy cercano a *M. rosenbergii* y a *M. amazonicum*. Así mismo Valencia y Campos (2007) en un estudio para Colombia, detalla las semejanzas y las pequeñas diferencias que tienen entre sí los pares de especies propuestos. La diferencia es que Valencia y Campos (2007) consideran gemelas a *M. transandicum* con *M. heterochirus* en lugar de *M. transandicum* - *M. surinamicum*, como es la propuesta de Holthuis (1952).

A través de análisis genéticos multilocus, Woong (2010) ha investigado las relaciones interespecíficas de un número de *Palaemonidae*, muchas de ellas especies hermanas Atlántico – Pacífico del género *Macrobrachium* que sufrieron una especiación vicariante luego de la formación del istmo de Panamá. Pileggi y

Mantelatto (2010) usando dos marcadores mitocondriales, *COI* y *16S*, realizaron el análisis filogenético de diferentes especies de camarones *Macrobrachium*, encontrando una relación bastante fuerte basada en una similaridad muy cercana entre *M. americanum* y *M. carcinus*, proponiendo que *M. americanum* es un sinónimo de *M. carcinus*.

Rossi y Mantelatto (2013), por su lado, relacionan a *M. olfersii* con *M. digueti* de la vertiente del Pacífico. Pilegui *et al.* (2014) trabajando con la concatenación de fragmentos parciales de los genes *16S*, *COI* y *18S* como marcadores, presentaron una perspectiva molecular para las también llamadas “sibling” especies de *Macrobrachium*, encontrando soporte para cinco de ellas, más no para la propuesta *M. panamense* – *M. amazonicum*. Sin embargo, como en otros estudios de camarones en Latinoamérica, no se consideraron en el estudio ejemplares de ríos peruanos de la vertiente del Pacífico.

Varios genes mitocondriales han sido usados para estudios filogenéticos en crustáceos decápodos, entre ellos el gen que codifica para la subunidad I de citocromo oxidasa (*COI*). Este gen, ha sido usado en más de 30 estudios y es especialmente informativo a nivel de taxones inferiores con una buena resolución a nivel de especie y algunas veces a nivel de familia (Lefébure, *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2009; Matzen *et al.*, 2011). Para este marcador, se reporta el trabajo de Zhang *et al.* (2009) para *M. rosenbergii*, *M. qilianensis* y *M. nipponense*; el de Liu *et al.* (2007) para especies *Macrobrachium* del este asiático; Pereira *et al.* (2002) para especies representativas del género *Macrobrachium*. Los estudios tienen como conclusión común, que las pruebas moleculares indican inconsistencias en el estatus taxonómico basado en la morfología externa.

El gen no codante 16S ribosomal RNA (*16S*) es ligeramente más conservado que *COI*, con una buena resolución a nivel de familia (Martin *et al.*, 2009). Sin embargo, las secuencias parciales de este gen han mostrado ser una herramienta muy utilizada para esclarecer las relaciones taxonómicas y definir los límites de las especies entre grupos morfológicamente conservados de decápodos en general (Crandall y Fitzpatrick, 1996; Murphy y Austin, 2002). Es de revisión el trabajo de Murphy y Austin (2003, 2004) para especies de palaemónidos australianos, el de Liu *et al.* (2007) para especies *Macrobrachium* del este asiático; el de Chen *et al.* (2009) para especies taiwanesas, el de Munashinge (2010) para especies de Sri Lanka; el de Hernández (2007) y Acuña (2002) para *Macrobrachium* mexicanos.

Genes nucleares han sido también aplicados en unos pocos estudios filogenéticos, como el gen *28S rDNA* (*28S*) que ha sido usado recientemente en estudios filogenéticos de crustáceos, y ha sido encontrado que tiene una tasa de evolución similar o menor que el gen *16S*. Se reporta el trabajo de Chen *et al.* (2009) en camarones taiwaneses, comparando al gen *28S* con el *16S*, concluyendo que el gene nuclear presenta mayor resolución y confiabilidad que el mitocondrial.

Si bien existen autores que hacen referencia a la presencia de camarones *Macrobrachium* en ríos peruanos de la vertiente del Pacífico, el trabajo más amplio sobre su identificación y distribución en el país, corresponde a Amaya y Guerra (1976), identificación que sin embargo, fue basada en caracteres morfológicos, no existiendo para los *Macrobrachium* que habitan los ríos del Pacífico peruano, trabajos realizados usando marcadores moleculares que determinen a este nivel, el estatus de especie, así como las relaciones filogenéticas entre ellas y con las especies hermanas ístmicas propuestas; es decir su historia evolucionaria en general.

Estudios con *Macrobrachium* revelan caracteres altamente variables con los cuales es insuficiente para puntualizar un diagnóstico de grupos de especies dentro de este género, lo que deviene en resultados no concluyentes de las relaciones de muchas especies (Lui *et al.*, 2007), por lo que se emplea marcadores moleculares para resolver su taxonomía, filogenia e historia evolucionaria (Deepak y Harikrishnan, 2018; Murphy y Austin, 2002) y que en muchos casos resulta en revisiones taxonómicas.

2.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En tal sentido, ante la evidencia de que hay una gran dificultad para separar las especies de camarones de agua dulce del género *Macrobrachium* utilizando datos morfológicos; la reciente demostración de que *M. americanum* y *M. carcinus* son especies gemelas, que no existan trabajos a nivel molecular con los camarones que habitan los ríos peruanos de la vertiente del Pacífico y que *M. inca* y *M. gallus* son especies con pequeño rango de distribución a las que no se les ha atribuido relaciones filogenéticas con otras especies del continente americano, se propone:

Problema de Investigación

¿Cuáles son las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano y con especies de *Macrobrachium* de la vertiente del Atlántico?

Hipótesis de Investigación

M. americanum, *M. digueti*, *M. panamense* y *M. transandicum* son especies definidas en su estatus molecular y cuentan con especies gemelas en la vertiente del Atlántico: *M. carcinus*, *M. olfersii*, *M. amazonicum* y *M. surinamicum*; respectivamente.

M. inca y *M. gallus* carecen de especies gemelas en la vertiente del Atlántico, pero están relacionadas con *M. americanum* y *M. panamense*, respectivamente.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 BASES TEÓRICAS

2.2.1.1 Antecedentes de la Investigación.

2.2.1.1.1 Taxonomía

En los ríos peruanos de la vertiente occidental de los Andes, juntamente con *C. caementarius*, son conocidas popularmente como “camarón de río”. El género *Macrobrachium* se caracteriza por tener rostro bien desarrollado, caparazón con espina hepática y antenal, ojos pedunculados, los dos primeros pares de apéndices torácicos con quelas, siendo el segundo par usualmente más largo y desarrollado en machos adultos (Méndez, 1981; Fig. 2).

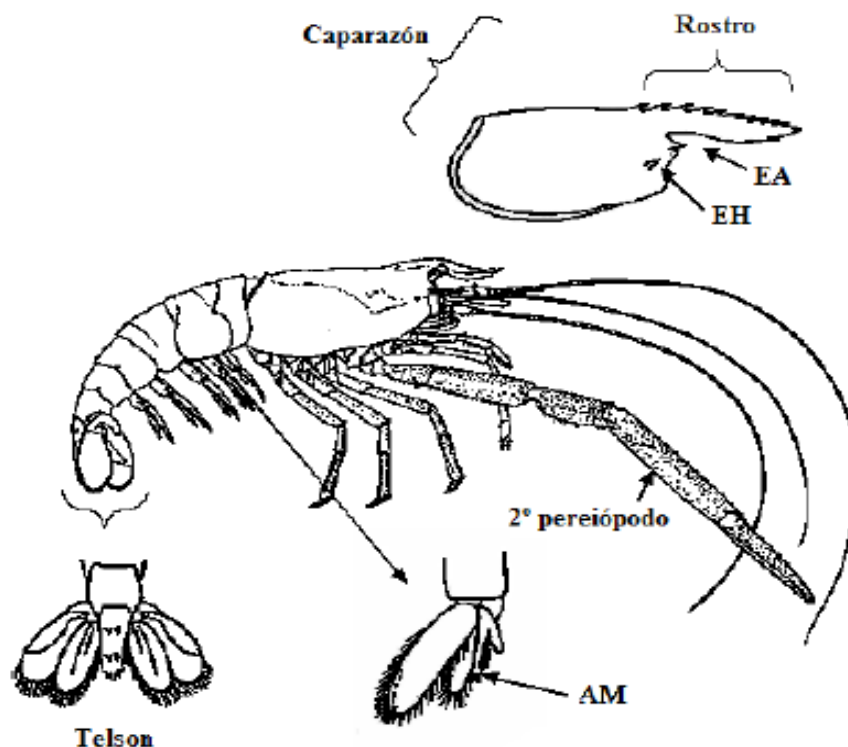


Figura 2: Esquema de los caracteres morfológicos del género *Macrobrachium*. Nótese la espina hepática como distintivo del género (Tomado de Hernández, 2007)

Algunas especies pueden ser diferenciadas fácilmente por el segundo par de periópodos, pero en otras se hace necesario un análisis más detallado de esta estructura, siendo requisito, contar con machos adultos, ya que se presenta variabilidad morfológica con machos juveniles y hembras de la misma especie (Murphy y Austin, 2005).

2.2.1.1.2 Ciclo de Vida

Las especies del género *Macrobrachium*, al igual que la mayoría de crustáceos, constituyen especies dioicas, con dimorfismo sexual, reconociéndose los machos por la presencia del orificio genital en el artejo basal del quinto par de patas torácicas, en tanto que las hembras lo llevan en el tercer par (Barnes, 1989; Viacava *et al.*, 1978).

Los *Macrobrachium* de la vertiente Occidental de los Andes peruanos, son especies anfídromas, con estados larvales extendidos que ocurren en aguas estuarinas (Meruane *et al.*, 2006; Bauer, 2011) con el mayor pico de reproducción en los meses de lluvia (diciembre – marzo); aunque Amaya y Guerra (1976) reportan hembras ovígeras en mayo, agosto, noviembre y diciembre.

2.2.1.1.3 Distribución

La distribución de las especies de *Macrobrachium* de la vertiente occidental de los Andes está limitada a los ríos costeros y para el Perú está basada principalmente en los estudios realizados por Amaya y Guerra (1976) y sistematizados por Méndez (1981), tal como se describe a continuación:

a) *M. americanum*: Especie encontrada desde Baja California a Perú. En el Perú, desde el río Zarumilla al río Chira; en su distribución altitudinal ha sido

encontrada hasta los 100 m.s.n.m. Manrique *et al.* (2005) establecen la presencia de esta especie en el Coto de Caza El Angolo, ubicado en las provincias de Sullana y Talara en el departamento de Piura.

b) *M. digueti*: Especie conocida desde Baja California a Perú. En el Perú, desde el río Zarumilla al río Moche; en su distribución altitudinal ha sido encontrada hasta los 200 m.s.n.m.

c) *M. gallus*: Especie encontrada en Ecuador y Perú. En Perú desde el río Zarumilla hasta el río Huaura; en cuanto a su distribución altitudinal ha sido encontrada hasta los 200 m.s.n.m.

d) *M. inca*: Especie señalada endémica del Perú (Wasiw y Yépez, 2017; Yépez, 2009; Zacarías y Yépez, 2008), distribuida desde el río Tumbes hasta el río Huaura; en cuanto a su distribución altitudinal ha sido encontrada hasta los 1150 m.s.n.m. Bastidas (2015) menciona sin embargo registros de esta especie en Ecuador según datos provistos por el Museo de Historia Natural Gustavo Orcés de la Universidad Politécnica Nacional de Ecuador. Ruiz (2016) menciona que su distribución es desde el Cabo San Francisco en Ecuador, pero su mayor abundancia es en los ríos peruanos.

e) *M. hancocki*: Especie señalada desde Colombia a Perú. En Perú colectada desde el río Tumbes hasta el río Chira; con una distribución altitudinal hasta los 80 m.s.n.m.

f) *M. panamense*: Especie reportada desde Honduras al Perú; en el Perú desde el río Zarumilla hasta el río Chira; siendo en su distribución altitudinal una especie de las partes bajas, con el rango más alto 80 m.s.n.m

g) *M. tenellum*: Especie conocida desde Baja California hasta el norte del Perú. En el Perú, hasta el río Chira; en su distribución altitudinal ha sido encontrada hasta los 80 m.s.n.m.

h) *M. transandicum*: Especie señalada para Colombia y Perú. En Perú colectada en el río Tumbes, con una distribución altitudinal de 100 m.s.n.m.

2.2.2 ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

Estudios sobre camarones de agua dulce peruanos son escasos y los existentes están mayormente relacionados a *Cryphiops caementarius*, siendo esta especie la que es evaluada en la evolución de sus capturas para el establecimiento de los períodos de veda de los camarones en general por IMARPE desde 1996 (Zacarías y Yépez, 2008). Los camarones *Macrobrachium* de la vertiente del Pacífico solo han sido estudiados en su bio-ecología, reproducción y desarrollo de su cultivo (Tagle, 1981; Gómez *et al.*, 1991; Reyes *et al.*, 1992; Manrique, 2013; Arica y Barrientos, 2013); no encontrándose información relacionada con comprobar su identificación morfológica con estudios moleculares y filogenéticos.

Por su parte, también se cuentan con estudios de las especies de *Macrobrachium* pertenecientes a la vertiente oriental, contando con los trabajos de Ayarza *et al.* (2006); García y Magalhães, (2003); García *et al.* (1996); Montreul *et al.* (1990) y González (1975), que tratan sobre identificación taxonómica y potencialidades de su cultivo. Igualmente, como ocurre con las especies de la vertiente occidental, no se encuentran trabajos que se relacionen con aspectos moleculares o filogenéticos.

A pesar de la existencia de información que reportan la presencia de camarones en los ríos de ambas vertientes, ninguno de ellos es mencionado en la actualización sobre la realidad de los camarones *Macrobrachium* en América Latina realizada por García *et al.* (2013), ni en “*Studies on Freshwater Decapods in Latin America*” editado por Wehrtmann y Bauer

(2013). Chong *et al.* (2015) no incluye a Perú dentro de los países con publicaciones sobre este género.

2.2.3 MARCO TEÓRICO O TEORÍA SUSTANTIVA

2.2.3.1 Filogenética

La **filogenética** es la ciencia que estudia las relaciones entre organismos basándose en su cercanía evolutiva, clasificándolas (tanto las existentes como las extinguidas), en base no a características fenotípicas, sino según su historia evolutiva. La forma más visual y conveniente de representar estas relaciones evolutivas es a través de los árboles filogenéticos, haciendo uso de secuencias biológicas que se desarrollan a partir de modelos evolutivos; es decir, modelos matemáticos que intentan explicar de la forma más fiel posible, la evolución real de dichas secuencias (Álvarez, 2011).

La filogenética usa **modelos evolutivos**, que se crearon para definir la probabilidad de cambio entre los distintos nucleótidos en secuencias de ADN, ARN, o aminoácidos, y tienen como objetivo intentar explicar la evolución que han sufrido dichas secuencias a lo largo del tiempo. El modelo puede contemplar la posibilidad de que exista reversión, es decir, que una mutación que se haya producido se deshaga en el tiempo, quedando completamente definido con la asignación, parcial o total, de una serie de parámetros. Algunos modelos establecen que el cambio entre nucleótidos en secuencias de ADN o ARN es equiprobable, mientras que otros postulan que las transiciones son más frecuentes que las transversiones (Álvarez, 2011).

Actualmente existe una variedad de modelos, y su elección, es muy importante ya que puede acarrear serios problemas en trabajos de análisis o

estudio de secuencias, ya que una mala elección en un modelo evolutivo, puede establecer relaciones incorrectas entre especímenes o, en el mejor de los casos, derivar en un árbol de mala calidad (Dulcey, 2009; Bos y Posada, 2005; Luo *et al.*, 2010; Tamura, 1992; Tajima y Nei, 1984; Kimura, 1980). Así, para escoger el mejor modelo, se pueden realizar pruebas estadísticas, en las que utilizando los valores de *likelihood* (verosimilitud), se puede evaluar el ajuste de los datos a los diferentes modelos por medio de criterios de información: criterio de información Akaike (AIC) y el criterio de información Bayesiano (BIC) (Sullivan y Joyce, 2005; Dulcey, 2009).

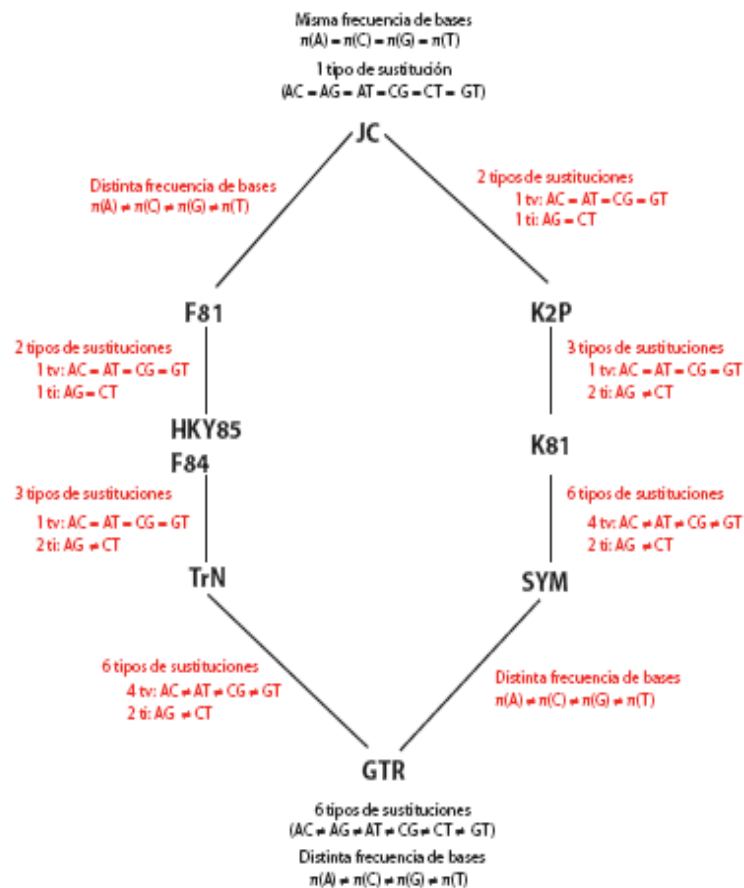


Figura 3: Siete de los 203 modelos de sustitución nucleotídica de la familia de General Time- Reversible (GTR) (Tomado de Varcárcel *et al.*, 2012)

2.2.3.2 Reloj Molecular:

Uno de los caminos más fáciles para obtener información acerca de las relaciones evolucionarias de diferentes alelos, es calcular el grado al cual dos secuencias difieren una de otra, referido comúnmente como divergencia de secuencia, que es presentado de la forma más simple, como el porcentaje de sitios variables, aunque otros modelos toman en consideración procesos mutacionales más complejos como transversiones vs. transiciones o sustituciones sinónimas vs. no sinónimas (Freeland, 2005).

La idea de "reloj molecular" fue introducida por Emile Zuckerkandl y Linus Pauling, en los años 60, subrayando que la cantidad de diferencias en los aminoácidos de la hemoglobina entre linajes, encajaba con la tasa evolutiva de divergencia basada en la evidencia fósil (Zuckerkandl y Pauling, 1965). Esta propuesta informacional de un reloj molecular fue seguida por observaciones realizadas por Margolish en secuencias de citocromo c, generalizando que la tasa de cambio evolutivo de cualquier proteína específica, era aproximadamente constante a lo largo del tiempo y de diferentes linajes (Kumar, 2005). Posteriormente, Allan Wilson y Vincent Sarich, a partir de su trabajo y el de Kimura (1968) observaron que los errores espontáneos en la replicación del ADN causan mutaciones que dirigen la evolución molecular, y que la acumulación de diferencias evolutivas neutrales entre dos secuencias podía usarse para medir el tiempo, si pudiera calibrarse la tasa de error de la replicación del ADN. Para ello, se utilizaron como referencias pares de grupos de especies vivas cuya fecha de especiación era ya conocida a partir del registro fósil.

Con el desarrollo de técnicas moleculares para secuenciación de DNA, basado en la similitud de la divergencia entre humanos, ratones y conejos, esta idea fue ampliada por Miyata en los 80s (Kumar, 2005) hacia la hipótesis de que las secuencias de DNA evolucionan a una tasa aproximadamente constante y por lo tanto, la disimilitud de las dos secuencias puede ser usada para calcular la cantidad de tiempo que ha pasado desde que ellas divergieron una de otra (Hu *et al.*, 2013; Freeland, 2005; Kumar, 2005; Bromham y Penny, 2003). En principio, se asumió que la tasa de error de la replicación del ADN era constante - no a lo largo del tiempo - sino en todas las especies y en cualquier parte del genoma que se quisiera comparar. Sin embargo, conforme fue acumulándose evidencia molecular, el concepto de un reloj molecular estricto y universal, ha caído, al menos como hipótesis general (Kumar, 2005; Bromham y Penny, 2003), reconociéndose ahora ampliamente, que las sustituciones no se acumulan a una tasa universalmente constante.

Sanderson (1997) y Thorne (1998), introdujeron el concepto de “reloj relajado” para estimar el tiempo del más reciente común antecesor en la ausencia de una tasa constante, asumiendo en sus modelos, que las secuencias evolucionan con un componente temporal inherente, si bien el reloj no funciona uniformemente a través de la filogenia completa o a través del tiempo. El método de Sanderson cuenta con estimaciones probabilísticas, mientras que el método de Thorne encajó el problema de estimación de la tasa en una forma de cadena MonteCarlo Bayesiana de Markov (Wertheim *et al.*, 2010).

La calibración del reloj molecular está entonces basada en la fecha aproximada cuando dos líneas genéticas se separaron una de la otra, fecha que

podría ser idealmente obtenida a partir de información independiente de los datos moleculares, por ejemplo, la medida del fósil o un evento geológico conocido y en tal sentido, calcular la divergencia genética que ha ocurrido a partir de esa fecha. El cálculo se realiza por la división del número de pares de bases diferente por el total de nucleótidos y se representa como el porcentaje de pares de bases que se espera ha cambiado por cada millón de años (Ma) (Freeland, 2005).

Brown *et al.* (1982) trabajando con primates, encontraron que la tasa de cambio de la mitocondria es aproximadamente 2% Ma, lo que fue citado como un reloj mitocondrial universal, por lo menos para vertebrados (Freeland, 2005). Esta aseveración poco a poco ha sido rebatida, encontrándose que puede haber diferencias en una misma secuencia (p.e. sustituciones sinónimas vs. no sinónimas) y entre grupos taxonómicos. Por ejemplo, trabajos con 13 especies de tiburones geminados, separados por el istmo de Panamá, presentaron tasas de sustituciones en los genes *cit b* y *COI* que son de siete a ocho veces más baja que en primates, para esos mismos genes, dependiendo de las condiciones de temperatura del hábitat, tiempo de generación y tasas metabólicas (Martin *et al.*, 1992; Bromham y Penny, 2003). Ello condujo a que los investigadores hagan las calibraciones para cada grupo taxonómico y para la región del gen en estudio (Freeland, 2005).

No obstante, a pesar de que la hipótesis del reloj molecular no puede asumirse completamente, funciona muchas veces y aunque ha de comprobarse en cada caso, se considera, aún, como una buena herramienta en la sistemática molecular. El conocimiento de la tasa aproximada de evolución molecular en ciertos grupos de linajes, facilita el establecimiento de fechas de eventos filogenéticos no documentados en el registro fósil, como la divergencia de

taxones vivos y la formación del árbol filogenético; debiéndose, sin embargo, por las situaciones que se presentan comentadas, que los estudios con comparaciones filogenéticas con mtDNA, deben en general concretarse a poblaciones coespecíficas y de especies relacionadas cercanamente, separadas de manera convencional no más de 5 Ma (Eguiarte *et al.*, 2007).

Dentro del género *Macrobrachium*, puede ocurrir radiación para eventos de especiación debido a microhábitat y especializaciones de comportamiento, los que pueden ser estudiados a través de su bioecología e historia paleogeográfica (Deepak y Harikrishnan, 2018); sin embargo, muchos estudios recomiendan la necesidad de estimar la historia evolucionaria (que es una combinación de la filogenia y los componentes de una escala de tiempo) de las especies congénéricas, usando marcadores moleculares para revelar sus relaciones entre ellas (Lui *et al.*, 2007) así como las intraespecíficas (Deepak y Harikrishnan, 2018). Hasta ahora, un reloj molecular basado en aproximaciones, ha jugado un rol importante en la sistemática de los carideos en general y del género *Macrobrachium* en particular.

2.2.3.3 ADN mitocondrial

Aunque la gran mayoría del DNA en casi todos los eucariotas se encuentra en el núcleo, una parte se encuentra en los cloroplastos y mitocondrias que son dos organelos intracelulares, estando los cloroplastos sólo presentes en plantas y las mitocondrias tanto en plantas, hongos y animales (Castro *et al.*, 1998; Lodish *et al.*, 2005; Bogenhagen, 2009).

Numerosas líneas de evidencia indican que las mitocondrias y los cloroplastos evolucionaron de bacterias que fueron endocitadas en células ancestrales que

contenían un núcleo eucariote, transmitiendo a lo largo de la evolución la mayoría de sus genes hacia el DNA nuclear, reteniendo en las células actuales, DNA que codifica para proteínas esenciales para el funcionamiento del organelo, al igual que los RNA ribosómico y de transferencia, necesarios para la traducción (Lang *et al.*, 1999; Lodish *et al.*, 2005). Así, el mantenimiento de la mitocondria depende del DNA mitocondrial (DNAm) para la síntesis de varios componentes proteicos de la fosforilación oxidativa para la producción de ATP (Castro *et al.*, 1998), crucial para la vida de los animales (Brown *et al.*, 1979).

El genoma de la mitocondria en los animales es pequeño y relativamente uniforme en tamaño entre vertebrados e invertebrados (Brown *et al.*, 1979). El contenido de genes es altamente conservado (Cook *et al.*, 2005) aunque existen organismos como *C. elegans* que carece de un gen con respecto a la mayoría de animales (Lemire, 2005). En crustáceos como en mamíferos, 13 proteínas son codificadas en el genoma de DNAm, acompañado de dos genes de RNAr (*16S* y *12S*) y 22 genes de RNAt (Cook *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 1998). Las 13 proteínas codificadas son incorporadas a los complejos I, III, IV y V de la cadena respiratoria, junto con 67 subunidades nucleares. Las células típicamente mantienen miles de copias de DNAm distribuidas entre cientos de organelos que intercambian componentes a través de ciclos activos de fusión y fisión (Castro *et al.*, 1998).

El DNAm es probablemente la más popular y poderosa molécula para un amplio rango de estudios de genética de poblaciones, filogenéticos y filogeográficos, aunque sorprendente y lamentablemente, varias características acerca de procesos genéticos intracelulares en el DNAm animal permanece pobremente entendido (Tatarenkov y Avise, 2007). Las

ventajas que ofrece el DNAm como marcador molecular con respecto al DNA nuclear son:

- Su estructura circular, covalentemente cerrada y los cientos de copias presentes la hacen mucho más fácil de extraer y amplificar que el DNA nuclear.
- Ausencia de intrones, DNA repetitivo, elementos transposables, es decir, todo el DNA es informativo.
 - Exhibe un modo directo de transmisión genética, sin recombinación y otros re-arreglos, con rara heteroplasma, y en la mayoría de los casos, es transmitido por línea materna, lo que hace su interpretación más fácil y permite extrapolaciones como en el caso del reloj molecular.
 - Las tasas de mutación son mucho más altas que el DNA nuclear, de 5 a 10 veces más rápido, con altos niveles de transiciones y transversiones, debido a que el DNAm carece de sistema de reparación, lo que permite acumular señales filogenéticas en cortos marcos de tiempo (Brown *et al.*, 1979; Avise *et al.*, 1987; Castro *et al.*, 1998; Lang *et al.*, 1999; Lemire, 2005; Tatarenkov y Avise, 2007; Schubart, 2009).

La información basada en el análisis del DNAm puede derivar a partir de estudios relacionados al orden de los genes, la secuencia de los genes individuales o del genoma completo y polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Wilson *et al.*, 2000). En crustáceos, la primera filogenia basada en DNAm que data de no más de 15 años atrás, fue basada en el análisis de la secuencia de los genes correspondiente a la subunidad grande ribosomal *16S* y *COI* y que aún predominan en los estudios de filogenia molecular de los crustáceos (Schubart, 2009).

Se pueden mencionar al respecto los trabajos realizados por Saunders *et al.* (1986) en *Limulus polyphemus*; Baldwin *et al.* (1998) y Chan *et al.* (2008) en el género *Penaeus*; Wilson *et al.* (2000) en *Penaeus monodon*; Murphy y Austin (2003, 2004, 2005), en especies del género *Macrobrachium*; Murphy *et al.* (2004) en *M. australiense*; de Bruyn *et al.* (2004) en *M. rosenbergii*; Liu *et al.* (2007) en especies del género *Macrobrachium*; Muñoz *et al.* (2008) en *Artemia salina*; Bauza *et al.* (2009) en *Metacrangonyx longipes*; Pilegui y Mantelatto (2010) en especies del género *Macrobrachium*; Vergamini *et al.* (2011) en *M. amazonicum*; Rossi (2012) en *M. olfersii*; entre otros más.

2.2.3.4 Alopatría Vicariante y Dispersión

Las poblaciones naturales de la gran mayoría de organismos, no se distribuyen de manera homogénea, sino que pueden estar estructuradas en varios grados por diversos factores. Estos procesos que generan la distribución geográfica y la composición, es decir, la estructura de las poblaciones, son materia de estudio de la biogeografía, disciplina según la cual, los posibles mecanismos que explican la distribución y estructura poblacional son la vicarianza y la dispersión (Morrone, 2000).

Alopatría vicariante, es el término dado a la separación de una población continua, formalmente establecida, por barreras geográficas, como los ríos, montañas o distancias muy grandes (Freeland, 2005; Bohonak, 1999). La elevación del istmo de Panamá es un claro ejemplo de un evento vicariante que causó que poblaciones de especies del Atlántico y del Pacífico con flujo genético, se aislen una de la otra (Freeland, 2005). Cuando ello ocurre, la amplia distribución de la especie se vuelve en poblaciones más discretas

(Page *et al.*, 2005), dando lugar con el tiempo a dos especies separadas, pero cercanamente emparentadas.

Por otro lado, la dispersión es el proceso que permite la ampliación de la distribución de la especie, o que poblaciones de la especie que han sido previamente separadas, puedan tener flujo genético. Un ejemplo de dispersión es la migración o dispersión activa), mientras que dispersión por efectos meteorológicos y oceanográficos también puede ocurrir se considera como dispersión pasiva (Bohonak, 1999).

2.2.4 DEFINICIÓN DE PALABRAS CLAVES

Macrobrachium: Género de camarón de agua dulce de la familia *Palaemonidae*, morfológicamente conservado (Holthuis, 1950; 1952) lo que crea muchas dificultades de identificación dentro del grupo y sirviendo poco para establecer relaciones filogenéticas y biogeográficas. La morfología se caracteriza por la ampliación extrema del segundo par de periópodos - al menos en el macho -, el rostro bien desarrollado, comprimido y con dientes o denticulos. Es también característica del género, la presencia de una espina hepática a ambos lados del cefalotórax.

El género es cosmopolita y en relación, al continente americano, habita las costas del Pacífico oriental, y del Atlántico. En los ríos del norte peruano, ocho especies del género coexisten en simpatría, además de otros géneros de la familia, disminuyendo en número conforme se avanza hacia el sur, con la predominancia de *M. inca* (información del presente trabajo). Amaya y Guerra (1976), reportaron que *M. inca* y *M. gallus* coexisten en todos los ríos desde Tumbes hasta Huaura, mientras que las otras, son casi exclusivas de los ríos del norte peruano

Análisis Filogenético: Análisis que se basa en el estudio de determinados caracteres que se suponen importantes para la evolución de los grupos taxonómicos y con los que será posible establecer las relaciones filogenéticas, atendiendo a diferentes grados o estados evolutivos observados en ellos.

COI: Gen mitocondrial codante de la proteína citocromo oxidasa subunidad I, usado en más de 30 estudios y que es especialmente informativo a nivel de taxones inferiores con una buena resolución a nivel de especie y algunas veces a nivel de familia.

16S rDNA: Secuencia de DNA mitocondrial ribosomal muy comúnmente usada en análisis filogenéticos de varios crustáceos decápodos. Presenta regiones que rápidamente evolucionan y pueden entonces proporcionar información a través de un amplio espectro taxonómico (Murphy y Austin, 2004).

28SrDNA: Secuencia de DNA nuclear ribosomal, que codifica para uno de los RNA que forman parte de la unidad mayor de los ribosomas de los ribosomas citoplasmáticos eucariotas y, por lo tanto, uno de los componentes básicos de todas las células eucariotas. La utilización de este gen en estudios de filogenia se basa en que, si bien presenta una tasa evolutiva igual a su homólogo mitocondrial, presenta mayor resolución y confiabilidad. (Chen *et al.*, 2009).

2.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Los camarones de río, son organismos que han sido capturados por el hombre desde hace muchos siglos, sin embargo, es difícil de hablar en nuestro país de una pesquería establecida, pues generalmente es una actividad complementaria y realizada por campesinos en forma artesanal, generalmente asociada a la época de lluvia, siendo los organismos capturados, consumidos localmente o comercializados en lugares aledaños a los lugares de pesca. La gran aceptación de los camarones en general determina que la presión de pesca vaya en aumento, que la disponibilidad de áreas para la producción natural disminuya agravado porque la contaminación restringe las posibilidades de las poblaciones naturales.

Estos factores han ocasionado la disminución de la población de estas especies en los ríos de la vertiente del Pacífico peruano, a niveles tan bajos que hacen posible que puedan desaparecer como especie. Por ello, el Estado Peruano a través de la Resolución Ministerial N° 312-2006-PRODUCE, estableció el período comprendido entre el 1 de abril y el 19 de diciembre de cada año como la temporada de pesca de las especies nativas del recurso camarón de río *Cryphiops caementarius* y *Macrobrachium* spp en los cuerpos de agua públicos de la vertiente occidental de los Andes, quedando prohibida la extracción, procesamiento, transporte, comercialización y utilización del recurso entre el 20 de diciembre de cada año y el 31 de marzo del año siguiente.

Sin embargo, las recomendaciones sobre el período de veda, están sustentadas en prospecciones realizadas básicamente en los ríos del sur (Tambo, Camaná, Ocoña y Majes) bajo la justificación que es donde se localiza más del 80% de las poblaciones de camarones de la vertiente occidental de los Andes, que las poblaciones de camarón de los diversos ríos de la costa muestran similar patrón en

la evolución de su ciclo reproductivo y que las condiciones reproductivas del *Cryphiops caementarius* y de todas las especies nativas del género *Macrobrachium* son similares, por lo que, hacen extensiva la recomendación del Instituto del Mar del Perú a todas las poblaciones de camarón de ambientes naturales de la vertiente occidental de los Andes Peruanos (Resolución Ministerial N° 312-2006-PRODUCE).

Estudios sobre especies del género *Macrobrachium* en el Perú son pocos y aislados, destacando el de Amaya y Guerra (1976) como el trabajo más completo sobre su identificación y distribución, no existiendo información estudios a nivel molecular que confirmen por ejemplo su condición de especie, la estructuración molecular de las poblaciones de las especies consideradas nativas para Perú (como *M. inca*) o las relaciones filogenéticas entre ellos y otras especies cuya cercanía genética está establecida teóricamente (Holthuis, 1952).

Así mismo, García *et al.* (2013) en una revisión de los langostinos del género *Macrobrachium* en América Latina, consideran que, si bien estos organismos son bien conocidos y explotados en casi todas las comunidades ribereñas de América Latina, no han sido estudiados adecuadamente por lo que su conservación está en riesgo, y si bien mencionan al Perú como límite en su distribución al sur del continente en algunas especies, no reporta ningún estudio hecho en este país. Por su parte, Chong *et al.* (2015) en una revisión de la literatura referida a los aspectos sociales, económicos, y biológicos relacionada a *Macrobrachium* en los últimos 33 años, no incluye a Perú dentro de los países con publicaciones sobre este género.

Por todo lo manifestado, se resume que la investigación realizada es importante:

- Para el mundo académico porque está aportando la prueba a nivel molecular de la definición del estatus de especie de seis de las ocho especies de *Macrobrachium*

reportadas para los ríos del Pacífico peruano, las que estaban basadas en caracteres morfológicos; constituyéndose en el primer estudio a este nivel para los camarones carideos peruanos.

- Ha permitido reconstruir la historia filogenética de las especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano, demostrando que los acontecimientos geológicos ocurridos en nuestro planeta pueden ser utilizados para estimar tasas de evolución molecular, en la ausencia de un adecuado registro fósil.
- Se podrá aplicar de manera correcta todas las normas de protección que el Estado Peruano tiene para las poblaciones naturales de estos crustáceos, de mucha utilización en la pesca artesanal en la parte norte de nuestro país.

2.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

a) Objetivo General

Determinar las relaciones filogenéticas de las especies del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano y con especies de *Macrobrachium* de la vertiente del Atlántico.

b) Objetivos Específicos

1. Confirmar la identidad morfológica de las muestras obtenidas de las especies del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano.
2. Caracterizar la identidad molecular y las relaciones filogenéticas de las especies morfológicas del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano, en base al análisis de un fragmento de los genes *COI*, *16S* y *28S*.
3. Inferir las relaciones filogenéticas y determinar el tiempo de divergencia entre las especies del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano y las especies presentes de *Macrobrachium* de la vertiente del Atlántico, consideradas como especies gemelas., separadas por vicarianza generada por el istmo de Panamá.

2.5 METODOLOGÍA

2.5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

La filogenia de los camarones de los ríos del Pacífico peruano será resuelta a través de un diseño de investigación descriptiva, de tipo correlacional comparativa (Tresierra, 2010; Hernández *et al.*, 1998).

2.5.2 POBLACIÓN

La población está conformada por los camarones del género *Macrobrachium* que habitan los ríos peruanos de la vertiente del Pacífico, desde Tumbes hasta Supe, y susceptibles de ser extraídos.

2.5.3 MUESTRA

La muestra consistió en 152 camarones de 06 especies del género *Macrobrachium*, 08 del género *Palaemon* y 03 del género *Cryphiops*, tomadas entre octubre del 2013 y febrero del 2016, obtenidos principalmente de los ríos Tumbes y Zarumilla (departamento de Tumbes), que son los ríos de mayor concentración de especies.

Se procuró contar con al menos 03 individuos por cada especie, de acuerdo a Munashinge (2010), con la finalidad de establecer sus relaciones filogenéticas a través de la comparación de secuencias de los genes *COI*, *16S* y *28S*. La posición geográfica de los lugares donde se obtuvieron los especímenes, y el número de individuos colectados, se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Posición geográfica de los lugares de obtención de las especies del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano

Río	SÍMBOLO	DEPARTAMENTO	INDIVIDUOS COLECTADOS (N°)	POSICIÓN GEOGRÁFICA	
		ZONA DE COLECTA		Latitud Sur	Longitud Oeste
Tumbes	Tb	Tumbes	62	3°59'57"	80°47'67"
		Bocana, Puente, Rica Playa			
Zarumilla	Zar	Tumbes	40	3°26'27"	80°13'19"
		La Palma			
Chira	Chir	Piura	6	6°80'69"	79°22'72"
		Amotape, Pueblo Nuevo, Bocana			
Coto de Caza El Angolo	Ang	Piura	3	4°26'36"	80°56'45"
Quebrada Juana Ríos	JR	Lambayeque	3	6°62'80"	79°40'30"
		Chongoyape			
Zaña	Zan	Lambayeque	3	6°80'69"	79°22'72"
		Macuaco			
Chicama	Chic	La Libertad	3	7°76'99"	79°40'67"
		Paján			
Moche	Moch	La Libertad	3	8°08'35"	79°0'46"
		Puente Santa Rosa			
Virú	Vir	La Libertad	11	8°25'22"	78°46'58"
		Zona Puente			
Chao	Chao	La Libertad	3	8°32'11"	78°40'49"
		Laramie			
Santa	San	Ancash	3	8°58'11"	78°37'16"
		Puente			
Lacramarca	Lcr	Ancash	3	9°10'98"	78°54'83"
		Puente Pardo			
Nepeña (Huambacho)	Hb	Ancash	3	10°71'65"	78.50°96"
		Samanco			
Pativilca	Pat	Lima	3	10°65'47"	77°76'55"
		Puente Simón Bolívar			
Fortaleza	For	Lima	3	10°84'21"	77°83'83"
		Puente			
Supe	Sup	Lima	3	9°27'63"	77°69'05"
		Puente			

2.5.4 Tabla 2: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Operacionalización de Variables					
			Dimensiones	Indicador	Valores Finales	Tipo de variable	Fuente	
La filogenia de las especies del género <i>Macrobrachium</i> de los ríos del Pacífico peruano	Ciencia que estudia las relaciones entre organismos basándose en su cercanía evolutiva, clasificándolas (tanto las existentes como las extinguidas), en base no a características fenotípicas, sino dando cuenta a su historia evolutiva							
La identificación morfológica de las especies de <i>Macrobrachium</i> de los ríos del Pacífico peruano	Conjunto de individuos morfológicamente similares, generalmente asociados entre sí por una distribución geográfica definida y separados de otros conjuntos por discontinuidades morfológicas (Caín, 1954) Reconocimiento de una especie con base en evidencia morfológica <i>sensu stricto</i>	Se le asignó la especie de acuerdo, a sus características fenotípicas y en base a una clave de identificación	Número de especies identificadas	Cumplimiento de características establecidas en la clave de identificación	Especie identificada morfológicamente	Numérica Gráfica	ADN de músculo de pleópodo	
La identificación molecular de las especies de <i>Macrobrachium</i> de los ríos del Pacífico peruano Las relaciones filogenéticas entre las especies del género <i>Macrobrachium</i> de los ríos del Pacífico peruano	Descripción taxonómica de una especie, basada en análisis de distancia de una secuencia de ADN en particular (Herbert <i>et al.</i> , 2003). Relaciones de proximidad evolutiva entre las diferentes especies, a partir de la reconstrucción de la historia de su diversificación, que implica desde el origen de la vida en la tierra	Se consideró especie molecular a aquella que agrupó todas las secuencias parciales de los genes COI, 16S y 28S en la misma rama del árbol	Árbol filogenético por Inferencia Bayesiana con las secuencias coincidiendo con la designación morfológica y se	Secuencias de los genes Distancias interespecíficas	% de Identidad Porcentaje	Numérica Gráfica Numérica	ADN de músculo de pleópodo	

	hasta el día de hoy, construyéndose por recurrencia al método cladístico	construido para cada gen	agrupan en la misma rama				
El establecimiento de las especies gemelas El tiempo de dievergencia entre las especies gemelas	Relaciones de proximidad evolutiva entre las diferentes especies, a partir de la reconstrucción de la historia de su diversificación, que implica desde el origen de la vida en la tierra hasta el día de hoy, construyendo se recurriendo al método cladístico. Este método emplea las propiedades derivadas compartidas de los organismos que se están estudiando, obteniéndose diagramas de relación en un árbol o cladogramas y que demuestran las diferentes hipótesis de relaciones que se tejieron a partir de esa relación. Las especies gemelas, son especies morfológicamente iguales separadas por el istmo de Panamá, hace aproximadamente 3.5 Ma y usadas ampliamente para inferir tasas de evolución molecular a partir de tasas de divergencia de secuencias nucleotídicas, asumiendo que especies gemelas, morfológicamente similares viviendo ahora a ambos lados del istmo, fueron aisladas geográficamente por los últimos estados del cierre del corredor marino	Se obtuvieron secuencias de las especies de camarones <i>Macrobrachium</i> de la vertiente del Atlántico y de determinaron las distancias interespecíficas para el gen 16S. En el árbol, las especies gemelas comparten el mismo nodo	Árbol con ramas por pares que agrupan a las secuencias gemelas Valores en millones de años	Árbol filogenético construido por inferencia Bayesiana para cada fragmento de gen analizado Distancias interespecíficas Distancias inter e intrasibling Tiempo de divergencia	Árbol Porcentaje Porcentaje Tiempo de divergencia en millones de años	Gráfica Numérica Gráfica Numérica	ADN de músculo de pleópodo

2.5.5 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS DE LA INVESTIGACIÓN

2.5.5.1 Fuente de Secuencias de ADN: Colección de especies

Se obtuvieron especímenes frescos de seis especies del género *Macrobrachium* reportadas para los ríos del Pacífico peruano, adquiridos de los lugareños de la zona. Para las faenas de pesca, los pescadores utilizan atarrayas con 1 mm de abertura de malla, calcales de mano o por tamizado de vegetación marginal y sobre fondos rocosos del cauce y estuario de los ríos Tumbes, Zarumilla, Chira, Zaña, Chicama, Moche, Virú, Chao, Santa, Lacramarca, Nepeña (Huambacho), Pativilca, Fortaleza, Supe y de la Quebrada Juana Ríos (Chongoyape) (Fig. 7). Se obtuvieron ejemplares de *P. hancockii* y *C. caementarius* para ser utilizados como grupo externo (Fig. 4).

Los ejemplares fueron preservados inmediatamente en alcohol de 96°, rotulados según río y fecha, y transportados al laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción (LGFyR) de la Universidad Nacional del Santa (UNS) para su identificación, cambio de alcohol y rotulación permanente.

2.5.5.2 Análisis de la identidad morfológica de las especies del género *Macrobrachium*

Todos los especímenes machos fueron identificados morfológicamente, uno a uno, siguiendo la clave propuesta por Méndez (1981), etiquetados con una clave relacionada a: río, especie y número, y organizados en una matriz. Los organismos se almacenaron en el LGFyR de la UNS.



Fig. 4: Mapa del Perú mostrando los lugares de colecta de las especies del género *Macrobrachium*

2.5.5.3 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

De cada uno de los especímenes preservados, se extrajo el ADN genómico total a partir de tejido muscular de los pleópodos, usando el kit comercial de extracción de ADN Genomic DNA Purification de Thermo Scientific.

En un equipo marca Epoch spectrophotometer (Bioteck instrument, Singapore) se midió la cantidad de ADN en ng.mL^{-1} por espectrofotometría, así como el ratio 260/280 para verificar la calidad del extracto. La calidad también se observó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (80V y 125 de intensidad de corriente), usando Gelred como intercalante.

El estudio de las relaciones filogenéticas de las especies del género *Macrobrachium* comprendió dos aspectos:

a) Caracterizar la identidad molecular y relaciones filogenéticas de las especies morfológicas del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano, en base al análisis de un fragmento de los genes *COI*, *16S* y *28S*

Para ello se amplificaron dos genes mitocondriales: *16SrDNA* (*16S*) y citocromo oxidasa c subunidad I (*COI*) y el gen nuclear *28SrDNA* (*28S*), con los siguientes sets de *primers*:

Tabla 3: Secuencias de *primers* utilizados en la filogenia de las especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano

Gen	Primer	Secuencia (5' -- 3')	Referencia Bibliográfica
<i>COI</i>	Col6bF	ACAAATCATAAAGATATYGG	Schubart y Heber (2006)
	COH6R	TADACTTCDGGRTGDCCAAARAAYCA	
<i>16S</i>	1471	CCT GTT TAN CAA AAA CAT	Munashinge (2010); Lui <i>et al.</i> (2007)
	1472	AGA TAG AAA CCA ACC TGG	
<i>28S</i>	28RDDF D2CFD45F	TAC CGT GAG GGA AAG TTG AAA	Suresh <i>et al.</i> (2012); Ndong <i>et al.</i> (2012)
	28D2CRD45R	AGA CTC CTT GGT CCG TGT TT	

Las secuencias fueron confirmadas por secuenciación de la hebra *forward*.

Las condiciones que se utilizaron para la PCR fueron:

- **Para *COI***: Una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 45 segundos (desnaturalización), 42° por 1 minuto (hibridación o

annealing), 72°C por 1 minuto (extensión) y una extensión final por 6 minutos a 72°C.

- **Para 16S:** Una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 30 ciclos a 95°C por 1 minuto (desnaturalización), 40° por 1 minuto (hibridación o *annealing*), 72°C por 1 minuto (extensión) y una extensión final por 10 minutos a 72°C.

- **Para 28S:** Una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 38 ciclos a 94°C por 30 segundos (desnaturalización), 56° por 30 segundos (hibridación o *annealing*), 72°C por 38 segundos (extensión) y una extensión final por 7 minutos a 72°C.

b) Filogenia de las especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano, con las especies de la vertiente del Atlántico

Se amplificaron dos genes mitocondriales: *16S* y citocromo oxidasa c subunidad I (*COI*), con los siguientes sets de *primers*:

Tabla 4: Secuencias de *primers* utilizados en la determinación de la filogenia de las especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano con las especies de la vertiente del Atlántico

Gen	Primer	Secuencia (5' -- 3')	Referencia Bibliográfica
COI	COIf	TCT CCA CCA ACC ATA AAG ATA TTG G	Chen <i>et al.</i> (2009); Pileggi y Mantelatto (2010); Vergamini <i>et al.</i> (2011).
	COIa	TAT ACT TCT GGG TGC CCA AAG AAT CA	
16S	16Sbr	CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T	Schubart <i>et al.</i> (2009)
	16Sar	CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT	

Las secuencias fueron confirmadas por secuenciación de ambas hebras, obteniéndose la secuencia consenso usando el programa MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016).

Las condiciones que se utilizaron para la PCR de ambos genes fueron:

Una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 30 ciclos a 95°C por 45 segundos (desnaturalización), 55° por 45 segundos (hibridación o *annealing*), 72°C por 1 minuto (extensión) y una extensión final por 7 minutos a 72°C.

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Veriti 96 Well thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y para la preparación del master mix para todos los marcadores analizados se utilizó el kit Maximo *Taq* DNA Polymerase (GeneOn GmbH, Nurnberg, Germany) con los siguientes volúmenes y concentraciones: 0.76 µL de 25 mM MgCl₂, 1.0 µL de 10X buffer, 0.5 µL de 2.5 mM dNTPs, 0.1 µL de cada primer a 50 µM, 0.1 µL de 5U. µL⁻¹ de *Taq* polimerasa, 1 µL ADN y el resto de agua PCR para un volumen final de 10 µL.

Para todos los casos, el producto obtenido se visualizó en geles de agarosa al 1%, con un marcador de 1000 pb., usando Gelred como intercalante. El exceso de nucleótidos y primers se eliminó usando las enzimas exonucleasa I y fosfatasa alcalina de langostinos, siguiendo el protocolo establecido por Werle (1994) y posteriormente las amplificaciones fueron enviadas a Macrogen Inc (Rockville, MD) para una secuenciación Sanger, en un analizador genético ABI 3730Cl (Applied Biosystems, Foster City, CA).

2.5.5.4 Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

2.5.5.4.1 Caracterizar la identidad molecular y relaciones filogenéticas de las especies morfológicas del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano, en base al análisis de un fragmento de los genes *COI*, *16S* y *28S*

Para cada gen (*COI*, *16S* y *28S*), se construyó una matriz alineada con todas las secuencias obtenidas para *M. americanum*, *M. digueti*, *M. panamense* y *M. transandicum*. En la misma matriz se consideró secuencias de tres especímenes de *M. gallus* y *M. inca* de cada uno de los ríos muestreados para los análisis de filogeografía, tratando de no repetir haplotipos comunes o compartidos. Se utilizó *P. hancockii* como grupo externo.

El alineamiento múltiple de las secuencias se hizo utilizando el algoritmo Clustal W implementado en el programa MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016). Se editaron manualmente todas las secuencias, corrigiendo errores en las secuencias, eliminando regiones de mala calidad y posiciones mal alineadas.

Análisis de distancias genéticas

La distribución de frecuencias de las diferencias pareadas entre secuencias se determinó con el programa MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016), utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2-P, que considera las diferencias en las tasas de sustitución entre transiciones y transversiones e incluyendo en el análisis secuencias de *P. hancockii* como grupo externo.

Se calcularon las distancias genéticas intrapoblacionales y las distancias pareadas interpoblacionales, evaluándose la distancia genética expresada en porcentaje de divergencia genética, siendo la especie la unidad de análisis.

Relaciones Filogenéticas

Las relaciones filogenéticas fueron realizadas de manera separada para los tres genes usando los métodos de Máxima Parsimonia (MP) e Inferencia Bayesiana (BI), implementados en PAUP 4.0 (Swofford, 2002) y MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2011), respectivamente; previa obtención del modelo

evolutivo a través del programa Jmodeltest v. 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012; Guindon y Gascuel, 2003), con el criterio de información criterio de información Akaike (AIC) y el Bayesiano (BIC) (Posada y Crandall, 1998).

Para el árbol de máxima parsimonia, que considera en su análisis que los gaps pueden ser incorporados como transformaciones durante el proceso de evaluación del cladograma y codifican como un quinto carácter, se usaron para calcular la confianza de cada nodo, 1000, 1000 y 1000000 réplicas *bootstrap*, para *COI*, *16S* y *28S*; respectivamente.

El análisis de Inferencia Bayesiana está basado en un modelo probabilístico de evolución de las secuencias que contiene eventos de inserción y delección, así como eventos de sustituciones (Palero y Crandall, 2009). Se llevó a cabo en MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2011), ejecutando dos análisis independientes con 4 cadenas de Markov de diferente temperatura bajo el algoritmo de Metropolis-Hasting (MCMC). Los análisis se ejecutaron con 1 millón de generaciones y se registraron árboles cada 100 generaciones, hasta que la desviación estándar promedio de las frecuencias fuera inferior a 0,01. Se descartó el 25% de los árboles como *burn-in* (*burn-in* inicial del 25%). Los árboles se visualizaron con FigTree 1.4.2. (Rambaut, 2014).

Así mismo, con la finalidad de conseguir que algunas relaciones evolutivas indeterminadas a nivel de árboles individuales se resuelvan al combinar la señal de varios genes, permitiendo que la señal filogenética, pueda emerger mejor al sumarse varias fuentes de información, se concatenaron para las seis especies de *Macrobrachium* trabajadas las secuencias de *COI-16S*, de *COI-28S* y *16S-28S*; respectivamente, usando el programa SeaView versión 4.5.4 (Gouy *et al.*, 2010). Con las matrices concatenadas obtenidas, se volvió a

realizar el mismo procedimiento que con las matrices no concatenadas, a fin de obtener los árboles correspondientes.

2.5.5.4.2 Relaciones Filogenéticas del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano con especies de *Macrobrachium* de la vertiente del Atlántico

Se trabajaron secuencias propias del gen *16S* para *M. panamense*, *M. americanum*, *M. digueti*, *M. transandicum*, *M. inca* y *M. gallus*, obtenidas con los primers *Sar - Sbr* (Tabla 4). Las secuencias fueron alineadas en una matriz juntamente con secuencias obtenidas del Genbank para esos genes de *M. amazonicum*, *M. carcinus*, *M. olfersii* y *M. surinamicum* obtenidas (Pileggi *et al.*, 2014), con la finalidad de comprobar la relación de gemelaridad entre **a) *M. americanum* – *M. carcinus*** **b) *M. digueti* – *M. olfersii*** **c) *M. panamense* – *M. amazonicum*** y **d) *M. transandicum* – *M. surinamicum*** (Holthuis, 1952). Para el cálculo de la distancia genética se consideró tanto a *C. caementarius* como a *P. hancockii* como grupo externo. Además, se obtuvieron otras secuencias de Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov, Anexo 03) como grupos internos, para robustecer la posición filogenética de las especies entre ellas.

Con el programa MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016), usándose el modelo de sustitución Kimura 2-parámetros (Tamura *et al.*, 2013), con un *bootstrap* de 10000, se determinaron las distancias genéticas a pares, intraespecífica e interespecífica, bajo dos situaciones:

- Los datos ingresados especie por especie.
- Los datos ingresados agrupando las especies gemelas como un solo grupo (intra e intersibling).

Igualmente, las secuencias fueron analizadas bajo el Criterio de Información Akaike (AIC) determinado con el programa JMODELTEST v. 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012; Guindon y Gascuel, 2003) para encontrar el mejor modelo de sustitución nucleotídica. Con ello se realizó el análisis de Máxima Parsimonia (MP) e Inferencia Bayesiana (BI), implementados usando PAUP 4.0 (Swofford, 2002) y MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2011), respectivamente.

Las estadísticas básicas de las secuencias tales como composición nucleotídica, sitios conservados, sitios variantes, sitios parsimoniosamente informativos, proporción de transiciones y transversiones, singletons y composición de aminoácidos, se determinaron usando el programa MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016), teniendo en cuenta la posición 1, 2 y 3 del codón de inicio para el gen *COI* debido a que es un gen codante. Para ello, se tomó la secuencia de aminoácidos de *M. rosenbergii* del Genbank (AY659990.1) como secuencia de referencia para determinar la correcta posición del codón de inicio. Igualmente, se evaluó a través del mantenimiento del marco de lectura ubicando el primer codón y la correspondiente traducción al lenguaje usado, la posibilidad de haberse amplificado un pseudogen, por aparición de codones *stop* prematuros.

Se valoró también el grado de saturación de las sustituciones de las secuencias del *COI* como marcador codante, por análisis de la distribución de los sitios variables y el grado de variabilidad genética por sitio a lo largo de las matrices de secuencias de ambos genes mediante un análisis de entropía en el programa DAMBE 6 (Xia y Lemey, 2009).

Tiempo de Divergencia

El tiempo de divergencia, es decir el tiempo de separación entre las especies gemelas, fue calculado para el gen *16S*, de dos maneras:

a) Con el programa Beast 1.7.4 (Drummond *et al.*, 2012): Se hicieron varias corridas ensayándose varias estrategias de partición y número de taxones. Se obtuvo el archivo .xml generado en BEAUTi 1.7.4 (Drummond *et al.*, 2012) para cada porcentaje de tasa mutacional del gen y con la estrategia escogida, con 30^7 generaciones, con un muestreo de 1000 generaciones y un 10% de *burn-in*. El archivo generado se analizó en Tracer 1.5 para confirmar la convergencia, para calcular el promedio y el 95% del intervalo de densidad posterior mayor. Se generó un árbol consenso con TreeAnnotator 1.7.4.

b) Con la distancia genética

En ambos casos se consideró la tasa mutacional del gen *16S* para decápodos de 0,6% y 0,9 % Ma (Schubart *et al.*, 2000; Pileggi *et al.*, 2014) y tomando a *C. caementarius* como grupo externo.

El tiempo de divergencia para *COI*, fue calculado en base a la distancia genética, considerando la tasa mutacional de 0.7 % Ma (Knolwton y Weight, 1998). Para ambos genes, se usaron secuencias de *C. caementarius* como grupo externo.

2.6 RESULTADOS

2.6.1. Fuente de Secuencias de ADN: Colección de especies

La distribución de las especies no coincide totalmente con la reportada por Amaya y Guerra (1976) ya que *M. americanum* muestra una distribución más amplia, encontrándose un ejemplar muy grande en canales de regadío del río Virú, mientras que los autores mencionados sólo reportaron su distribución para el Perú en el río Zarumilla.

Así mismo, hay una notable reducción en la distribución de *M. gallus*, especie que sólo fue encontrada en los ríos Tumbes y Zarumilla, “desapareciendo” de los demás ríos costeros en los que la especie había sido reportada. *M. transandicum*, reportada como nueva especie para Perú por Amaya y Guerra (1976), con distribución hasta el río Tumbes, fue encontrada también en los ríos Chira y Virú.

2.6.2 Análisis de la identidad morfológica de las especies del género *Macrobrachium*

Taxonómicamente, se lograron identificar seis de las ocho especies de camarones *Macrobrachium* reportados por Amaya y Guerra (1976). Se identificaron de la siguiente manera (Méndez, 1981): (Fotos 1-9, Anexo 04).

Tabla 5: Distribución de los camarones *Macrobrachium* en los ríos del Pacífico peruano (de octubre del 2013 a febrero del 2016). En azul, nueva distribución

Río/especie	<i>M. americanum</i>	<i>M. panamense</i>	<i>M. transandicum</i>	<i>M. digueti</i>	<i>M. inca</i>	<i>M. gallus</i>	<i>P. hancockii</i>	<i>C. caementarius</i>
Zarumilla	+ (8)	-	11	+ (20)	+	+	-	
Tumbes	-	+ (26)	22	+ (2)	+	+	+ (3)	
Chira	-	-	+ (3)	-	+	-	+ (5)	
Juana Ríos	-	-	-	-	+	-	-	
Zaña	0	-	-	-	+	-	-	
Chicama	-	-	-	-	+	-	-	
Moche	-	-	-	-	+	-	-	+
Virú	+ (1)	-	+ (2)	+ (5)	+	-	-	
Chao	-	-	-	-	+	-	-	3
Santa	-	-	-	-	+	-	-	+
Lacramarca	-	-	-	-	+	-	-	
Nepeña	-	-	-	-	+	-	-	+ (2)
Fortaleza	-	-	-	-	+	-	-	+
Supé	-	-	-	-	+	-	-	
Pativilca	-	-	-	-	+	-	-	+

Tabla 6: Clasificación taxonómica de camarones del género *Macrobrachium* identificados morfológicamente, capturados de los ríos del Pacífico peruano, de octubre del 2013 a febrero del 2016

Clase	Orden	Familia	Nombre Científico	Nombre común
<i>Malacostraca</i>	<i>Decapoda</i>	<i>Palaemonidae</i>	<i>M. panamense</i> Rathbun, 1912	Camarón, langostino
			<i>M. americanum</i> Bate, 1868	Camarón, chicama
			<i>M. digueti</i> Bouvier, 1895	Camarón
			<i>M. gallus</i> Holthuis, 1952	Camarón blanco, chicama
			<i>M. inca</i> Holthuis, 1952	Camarón
			<i>M. transandicum</i> Holthuis, 1950	Camarón

2.6.3 Caracterizar la identidad molecular y relaciones filogenéticas de las especies morfológicas del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano, en base al análisis de un fragmento de los genes *COI*, *16S* y *28S*

Alineamiento de las Secuencias

Las matrices alineadas con el programa MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016) están conformadas por:

- Una matriz de 83 secuencias del gen *COI* de las seis especies del género *Macrobrachium*, de 634 nc, con 0 *indels*.
- Una matriz de 93 secuencias del gen *16S* de las seis especies del género *Macrobrachium*, de 506 nc, con 04 *indels*.
- Una matriz de 28 secuencias del gen *28S* de las seis especies de *Macrobrachium*, con muchos *indels* por efecto del alineamiento, de 691 nc con 79 *indels*.

Características de las secuencias

En el análisis comparativo de las características de las secuencias de los tres genes (Tabla 7) puede verse que el tamaño de las secuencias de *28S* es un 27% más grande que *16S* y 8.2% que *COI*. Así mismo, tiene alrededor de 33.5% más de sitios variables (SV) y parsimoniosamente informativos (PI) que *16S* y 3% más de SV que *COI*; aunque con respecto a los sitios PI, el gen *COI* tiene 1.4% más que *28S*. Con respecto al porcentaje de nucleótidos, puede verse que los genes mitocondriales tienen mayor contenido de pares AT y el gen ribosomal nuclear mayor contenido de pares CG.

En los genes mitocondriales el ratio ta:tv indica que las transiciones son mayores que las transversiones, siendo lo contrario para el gen nuclear, donde las transversiones se presentan en número ligeramente mayor a las transiciones. Estas características son coincidentes para estos genes, según lo reportado por Chen *et al.* (2009); Zhang *et al.* (2009), además de la mayor proporción AT vs GC para los genes mitocondriales (Sun *et al.*, 2016).

Tabla 7: Estadísticas para el set de datos de las secuencias de los genes *COI*, *16S* y *28S* para las seis especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano

	<i>COI</i>	<i>16S</i>	<i>28S</i>
Características			
Largo de la secuencia (bp)	634	506	691
Sitios Conservados	403	349	449
Sitios Variables	231	158	238
Sitios Parsimoniosamente informativos	217	143	214
Composición de Nucleótidos			
Adenina	25.5	34.1	23
Timina	28.1	28.1	23.8
Citosina	26.5	24.6	21.4
Guanina	19.9	13.1	31.8
Sustituciones			
Transiciones	252	131	172
Transversiones	110	62	174
N°total de sustituciones	362	193	346
Ratio ta/tv	2.29	2.11	0.99

Filogenia de las especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano

Los árboles filogenéticos elaborados para las seis especies identificadas morfológicamente, con ambos programas bioinformáticos para el gen *COI*, mostraron sólo cinco ramas, agrupándose de manera clara las secuencias de *M. inca* (Mi), *M. gallus* (Mg), *M. americanum* (Ma), *M. panamense* (Mp) y el grupo externo *P. hancockii* (Ph). Sin embargo, las especies *M. digueti* (Md) y *M. transandicum* (Mt) se agrupan en un solo clado (Fig. 5). Los modelos de sustitución se incluyen en el Anexo 05.

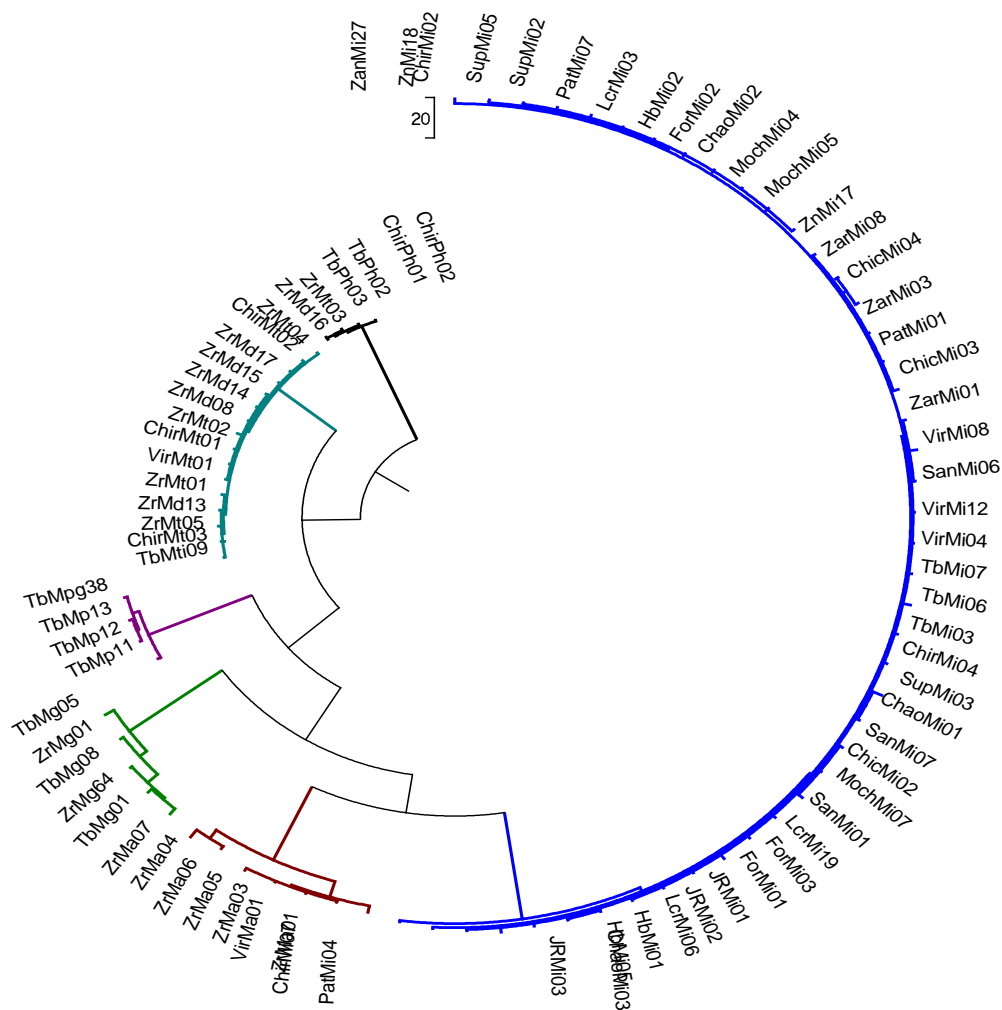


Fig. 5: Árbol filogenético construido con el algoritmo de Máxima Parsimonia (MP), a partir de las 83 secuencias del gen *COI* para las seis especies de *Macrobrachium*, considerando a *P. hancockii* como grupo externo
Mt: *M. transandicum*; **Mp:** *M. panamense*; **Mi:** *M. inca*; **Mg:** *M. gallus*; **Ma:** *M. americanum*; **Md:** *M. digueti*; **Ph:** *P. hancockii*

Las secuencias parciales del gen *COI* de *M. inca* y *M. americanum* en el árbol, se agrupan coincidiendo con su característica de rostrum corto y similitud en la forma del segundo par de periópodos de ambas especies, no sucediendo con *M. gallus* y *M. panamense*, especies que comparten la característica del rostrum largo.

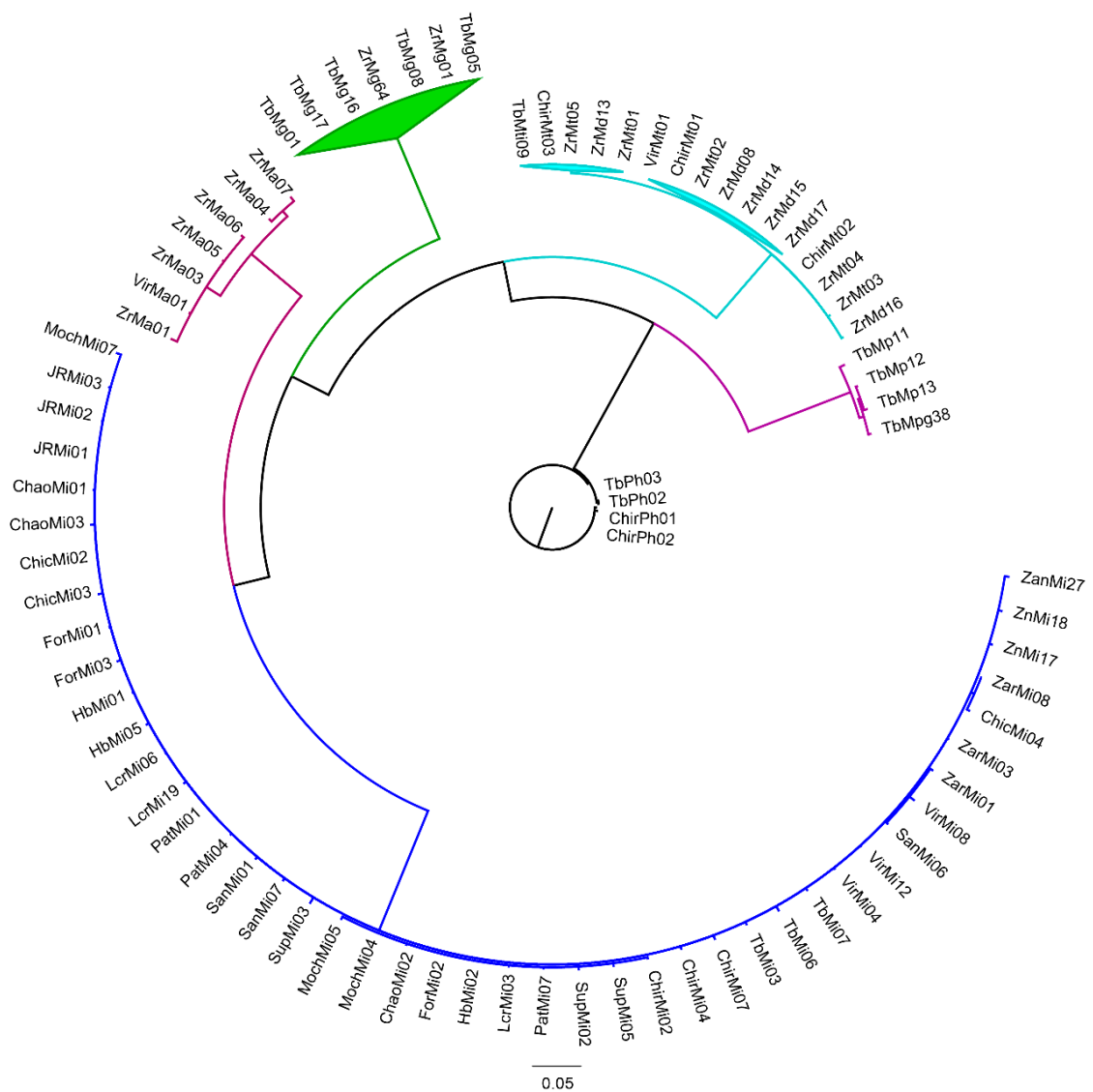


Fig 6: Árbol filogenético construido con análisis de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G, a partir de las 83 secuencias del gen *COI* para las seis especies de *Macrobrachium*, considerando a *P. hancockii* como grupo externo

Mt: *M. transandicum*; **Mp:** *M. panamense*; **Mi:** *M. inca*; **Mg:** *M. gallus*; **Ma:** *M. americanum*; **Md:** *M. digueti*; **Ph:** *P. hancockii*

Con respecto a la distancia genética, los valores de la distancia intrapoblacional calculada con secuencias de *COI*, demuestra que la variación dentro de la población de cada especie es baja (Tabla 8), y en donde las poblaciones de *M. digueti*, *M. transandicum* y *M. inca* presentan los menores valores, mientras

que *M. gallus* y *M. americanum* presentan mayores distancias genéticas, entre las secuencias.

Tabla 8: Distancias genéticas intrapoblacional del gen *COI* para las especies de *Macrobrachium* en los 15 ríos del Pacífico peruano, basados en el modelo Kimura 2-P con 10000 bootstrap

	Distancia Genética (d)	Error Estandar
<i>M. inca</i>	0.007875916	0.001348432
<i>M. gallus</i>	0.016703893	0.002978309
<i>M. panamense</i>	0.009035682	0.002716602
<i>M. transandicum</i>	0.004338227	0.0015591
<i>M. digueti</i>	0.006141983	0.001761096
<i>M. americanum</i>	0.017789742	0.003291708
<i>P. hancocki</i>	0.003437498	0.001656147

La distancia genética entre poblaciones calculada con secuencias de *COI* (Tabla 9), presenta distancia en el rango de 0.5% y 23.9%, con una diferencia de 23.4% entre el máximo y menor valor. La menor distancia es la que se presenta entre las poblaciones de *M. transandicum* y *M. digueti* 0.5%, coincidiendo con los árboles que agrupan a estas dos especies en un solo clado. Analizando las distancias de *M. inca*, se ve que es con *M. americanum* con quien presenta la menor distancia (17.9%), por el contrario, la distancia que presenta *M. gallus* es con *M. panamense* con quien presenta la mayor distancia (23.6%).

En los árboles obtenidos con las secuencias de *16S* de las seis especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano, puede notarse que también se agrupan de manera clara las especies *M. inca*, *M. americanum* y el grupo externo *P. hancockii*, no ocurriendo lo mismo con las dos únicas secuencias de *M. panamense* (TbMp16 y TbMp17), que se incluyen en el clado junto a

secuencias de *M. inca*. Igualmente, como en *COI*, las especies *M. digueti* y *M. transadicum* se agrupan en una sola rama (Figs. 7 y 8).

Tabla 9: Distancias genéticas interpoblacional del gen *COI* para las especies de *Macrobrachium* en los 15 ríos del Pacífico peruano, basados en el modelo Kimura 2 parámetros con 10000 *bootstrap*. En rojo las distancias entre *M. americanum* – *M. inca* y *M. gallus* - *M. panamense*

<i>M. inca</i>		0.017348	0.020433	0.021025	0.020447	0.019419	0.022040
<i>M. americanum</i>	0.179606		0.018468	0.017899	0.018470	0.018310	0.021414
<i>M. digueti</i>	0.238992	0.188721		0.019072	0.001463	0.017165	0.019316
<i>M. panamense</i>	0.228502	0.186465	0.203847		0.019046	0.021432	0.021106
<i>M. transadicum</i>	0.237390	0.188609	0.005268	0.202176		0.017119	0.019351
<i>M. gallus</i>	0.213766	0.198608	0.189913	0.236212	0.187403		0.021735
<i>P. hancockii</i>	0.262074	0.238108	0.211475	0.241439	0.210927	0.253760	

En los árboles obtenidos con las secuencias de *16S* de las seis especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano, puede notarse que también se agrupan de manera clara las especies *M. inca*, *M. americanum* y el grupo externo *P. hancockii*, no ocurriendo lo mismo con las dos únicas secuencias de *M. panamense* (TbMp16 y TbMp17), que se incluyen en el clado junto a secuencias de *M. inca*. Igualmente, como en *COI*, las especies *M. digueti* y *M. transadicum* se agrupan en una sola rama (Figs. 7 y 8).

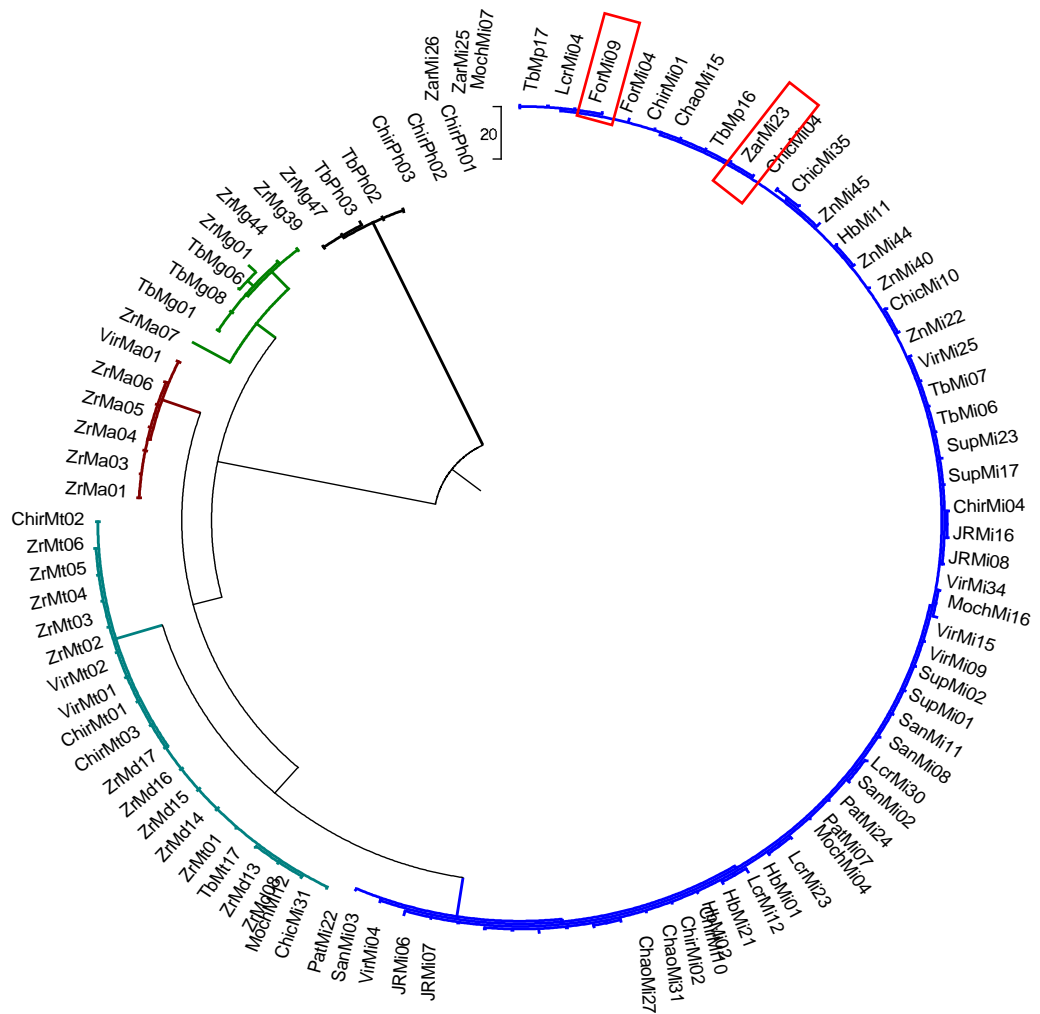


Fig. 7: Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima Parsimonia (MP), a partir de las 93 secuencias del gen *16S* para las seis especies de *Macrobrachium*, considerando a *P. hancockii* como grupo externo
 Mt: *M. transandicum*; Mp: *M. panamense*; Mi: *M. inca*; Mg: *M. gallus*; Ma: *M. americanum*; Md: *M. digueti*; Ph: *P. hancockii*

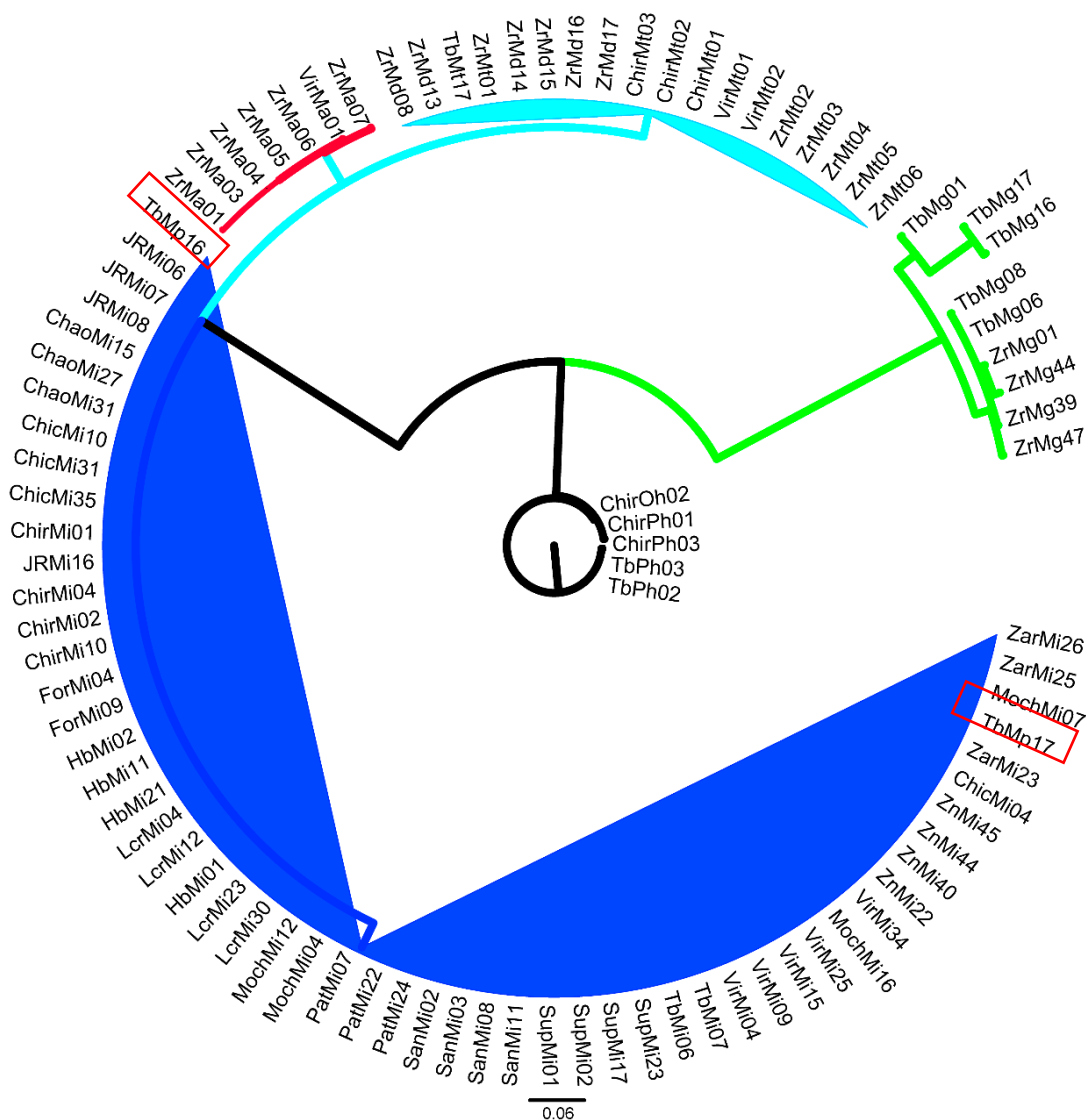


Fig. 8: Árbol filogenético construido con el análisis de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: K80+I+G, a partir de las 93 secuencias del gen *16S* para las seis especies de *Macrobrachium*, considerando a *P. hancockii* como grupo externo

Mt: *M. transandicum*; Mp: *M. panamense*; Mi: *M. inca*; Mg: *M. gallus*; Ma: *M. americanum*; Md: *M. digueti*; Ph: *P. hancockii*

Con *16S*, la distancia intrapoblacional es aún más baja que la encontrada con *COI*, no sobrepasando en ninguna de las especies el 1% (Tabla 10). La distancia genética entre poblaciones (Tabla 11), presenta distancia en el rango de 0.189 y 11.76%, con una diferencia de 11.57% entre el máximo y menor valor.

Igualmente, la distancia genética calculada entre *M. transandicum* y *M. digueti* coincide con los árboles que agrupan a estas dos especies en un solo clado.

Tabla 10: Distancias genéticas intrapoblacional del gen *I6S* para las especies de *Macrobrachium* en los 15 ríos del Pacífico peruano, basados en el modelo Kimura 2-P con 10000 bootstrap

	Distancia Genética (d)	Desviación Estandar
<i>M. inca</i>	0.005080317	0.001149334
<i>M. americanum</i>	0.001143241	0.00077876
<i>M. digueti</i>	0.002001609	0.001112749
<i>M. panamense</i>	0.004003013	0.002731773
<i>M. transandicum</i>	0.001942077	0.000888224
<i>M. gallus</i>	0.007245067	0.002351216
<i>P. hancockii</i>	0.002803217	0.001658205

Se menciona que los especímenes de *M. panamense* secuenciados con *COI*, no son los mismos que para el gen *I6S*, y a diferencia de lo que se presentó en *COI* con la distancia genética en esta especie, la presentada entre las secuencias de *M. inca* y *M. panamense*, también es bastante baja (0.5%), debido a que las secuencias de *M. panamense* se incluyen en el clado de *M.inca*. (Figs. 7 y 8). Además, la distancia intrapoblacional es muy parecida en ambos grupos (0.58% y 0.40%, respectivamente) (Tabla 10).

Se nota además que *M. inca* con *M. americanum* y *M. gallus* con *M. panamense*, no presentan su menor distancia entre sí (Tabla 11).

Tabla 11: Distancias genéticas interpoblacional del gen *I6S* para las especies de *Macrobrachium* en los 15 ríos del Pacífico peruano, basados en el modelo Kimura 2 parámetros con 10000 *bootstrap*. En rojo las distancias entre *M. americanum* – *M. inca* y *M. gallus* - *M. panamense*

<i>M. inca</i>		0.014232	0.012861	0.001992	0.012809	0.014017	0.023743
<i>M. americanum</i>	0.098973		0.014303	0.014626	0.014328	0.013072	0.023497
<i>M. digueti</i>	0.077575	0.095831		0.013265	0.000785	0.015049	0.023423
<i>M. panamense</i>	0.005348	0.101574	0.079840		0.013213	0.014356	0.024126
<i>M. transandicum</i>	0.077179	0.096172	0.001891	0.079458		0.015013	0.023423
<i>M. gallus</i>	0.102915	0.092403	0.117623	0.104548	0.117217		0.024178
<i>P. hancockii</i>	0.209718	0.207972	0.216827	0.213408	0.216353	0.229778	

Se considera que el gen nuclear *28S* resuelve la historia evolutiva en estas especies con los marcadores usados, pues según la topología de los árboles MP y MB, las secuencias de cada especie se agrupan juntas como clado. Las 28 secuencias de este gen, agrupa todos los especímenes de *M. panamense* en un clado diferente al de *M. inca*, haciéndose notar, que las secuencias de los especímenes TbMp16-TbMp17 cuyas secuencias de *I6S* se habían incluido en el mismo clado con *M. inca*, también presentaron secuencias de *28S* (de color lila en las Figs 9 y 10) y se agrupan todas juntas, separadas de *M. inca*.

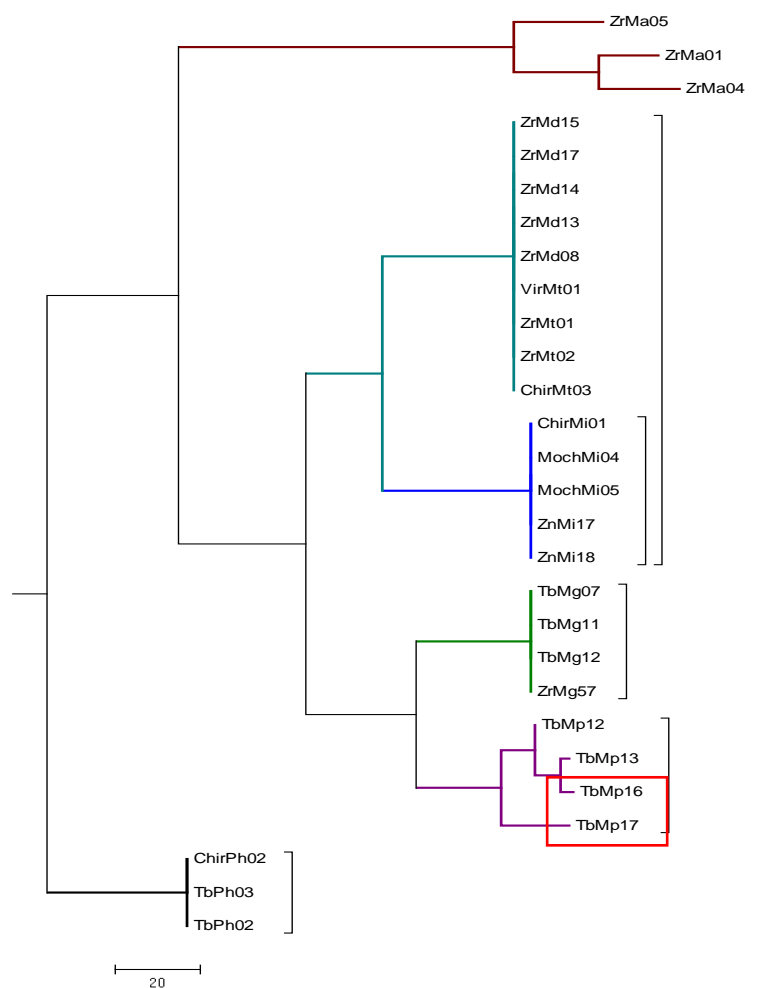


Fig. 9: Árbol filogenético construido con el algoritmo de Máxima Parsimonia (MP), usando el modelo de sustitución AIC a partir de las 28 secuencias del gen 28S para las seis especies de *Macrobrachium*, considerando a *P. hancockii* como grupo externo

Mt: *M. transandicum*; Mp: *M. panamense*; Mi: *M. inca*; Mg: *M. gallus*; Ma: *M. americanum*; Md: *M. digueti*; Ph: *P. hancockii*

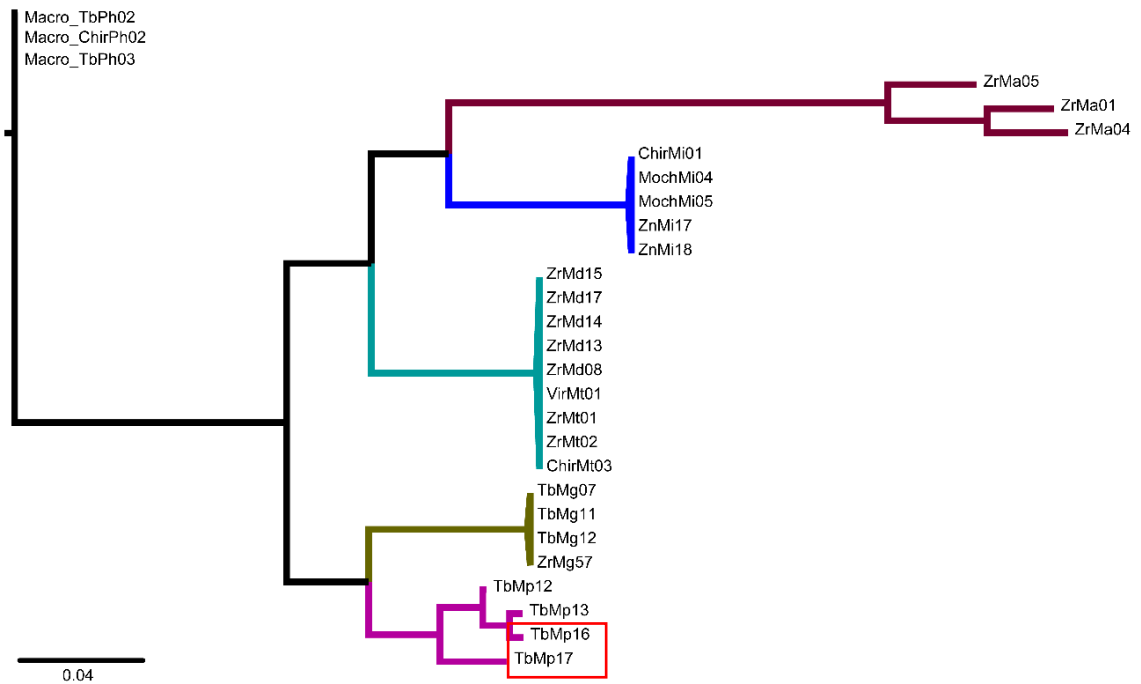


Fig. 10: Árbol filogenético construido con el análisis de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I, a partir de las 28 secuencias del gen 28S para las seis especies de *Macrobrachium*, considerando a *P. hancockii* como grupo externo
Mt: *M. transandicum*; **Mp:** *M. panamense*; **Mi:** *M. inca*; **Mg:** *M. gallus*; **Ma:** *M. americanum*; **Md:** *M. digueti*; **Ph:** *P. hancockii*

Las secuencias parciales de este gen, agrupa como clados hermanos a *M. panamense* con *M. gallus*, y *M. inca* con *M. americanum*; especies que, entre sí, comparten básicamente la característica del rostro largo y corto, y segundo par de periópodos largos y robustos; respectivamente.

Las distancias genéticas entre poblaciones, esclarece las inconsistencias encontradas en las secuencias de 16S para *M. panamense*, encontrándose una distancia de alrededor del 12% entre *M. inca* y *M. panamense* para el gen 28S. Por otro lado, este gen confirma lo encontrado para las especies *M. transandicum* y *M. digueti*, al agrupar las secuencias de estas dos especies en el mismo clado, con una distancia genética interpoblacional de 0,000 (Tabla 13).

La distancia genética entre poblaciones calculada con secuencias de 28S (Tabla 13), presenta distancia en el rango de 0.0% y 21.39%, con una diferencia de 21.39% entre el máximo y menor valor. La menor distancia es la que se presenta entre las poblaciones de *M. transandicum* y *M. digueti*, pero en este caso con 0.0%, coincidiendo con los árboles que agrupan a estas dos especies en un solo clado, como ocurrió con los otros dos genes.

Tabla 12: Distancias genéticas intrapoblacional del gen 28S para las especies de *Macrobrachium* en los 15 ríos del Pacífico peruano, basados en el modelo Kimura 2-P con 10000 bootstrap

	Distancia Genética (d)	Desviación Estandar
<i>M. americanum</i>	0.072173333	0.008788746
<i>M. digueti</i>	0	0
<i>M. transandicum</i>	0	0
<i>M. gallus</i>	0	0
<i>M. inca</i>	0	0
<i>M. panamense</i>	0.021090406	0.004236636
<i>P. hancockii</i>	0	0

Se nota además que *M. inca* con *M. americanum* no presentan su menor distancia interpoblacional (19.9%), mientras que sí lo es entre *M. gallus* con *M. panamense*, con una distancia de 7.7% (Tabla 13).

Las secuencias concatenadas: *COI-16S*, *16S-28S* y *COI-28S* soportan los resultados encontrados con los marcadores trabajados de manera individual. Debe mencionarse, sin embargo, que la situación de las dos secuencias de *M. panamense*, no pudo ser resuelta con la concatenación de los genes *COI-16S*, debido a que no se encontraron secuencias comunes de esta especie para los dos genes (Figs. 11,12 y 13 - Anexo 02).

Tabla 13: Distancias genéticas interpoblacional del gen 28S para las especies de *Macrobrachium* en los 15 ríos del Pacífico peruano, basados en el modelo Kimura 2-P con 10000 bootstrap. En rojo las distancias entre *M. americanum* – *M. inca* y *M. gallus* - *M. panamense*

<i>M. americanum</i>		0.018854	0.018854	0.019530	0.019097	0.019233	0.020815
<i>M. digueti</i>	0.198629		0.000000	0.014078	0.013348	0.013639	0.016511
<i>M. transandicum</i>	0.198629	0.000000		0.014078	0.013348	0.013639	0.016511
<i>M. gallus</i>	0.213409	0.114759	0.114759		0.013662	0.010068	0.015985
<i>M. inca</i>	0.199487	0.112660	0.112660	0.112873		0.013677	0.016695
<i>M. panamense</i>	0.213907	0.117536	0.117536	0.077443	0.123234		0.014860
<i>P. hancockii</i>	0.224814	0.143690	0.143690	0.135800	0.155865	0.129517	

2.6.4 Relaciones Filogenéticas del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano con especies de *Macrobrachium* de la vertiente del Atlántico

Las matrices alineadas con el programa MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016) están conformadas por:

Una matriz de 21 secuencias del gen *COI* de dos especies del género *Macrobrachium* del Pacífico y dos del Atlántico, de 569 nc, con 34 *indels*.

Una matriz con 68 secuencias del gen *16S* de las seis especies del género *Macrobrachium* del Pacífico y 04 del Atlántico, de 529 nc, con múltiples *indels*.

El análisis más completo se hizo con el gen *16S* debido a que es con el que más secuencias positivas se obtuvo, mientras que con el gen *COI*, sólo se obtuvo secuencias de *M. americanum*. Se tiene entonces que los análisis de distancia con *16S* revelaron que el porcentaje de variación intraespecífica (Tabla 14) fue más bajo que la variación interespecífica (Tabla 15), notando además que la variación interespecífica fue menor entre las especies gemelas (resultado con

rojo en la Tabla 15) que las no gemelas. En la misma Tabla se resalta también que las especies del género *Macrobrachium* presentan mayor distancia con *C. caementarius* que con *P. hancockii*.

Tabla 14: Distancias genéticas intraespecífica del gen *I6S* para las especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano y las especies gemelas de la vertiente del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

	Muestra (N°)	Distancia Genética	Error Estandar
<i>M. panamense</i>	06	0.02773508	0.004474717
<i>M. inca</i>	11	0.00218533	0.000867808
<i>M. gallus</i>	10	0.00186721	0.001164672
<i>M. americanum</i>	05	0.00080000	0.000771085
<i>M. digueti</i>	09	0.00200402	0.001174079
<i>M. transandicum</i>	11	0.01881899	0.002821495
<i>M. amazonicum</i>	04	0.00839360	0.002818661
<i>M. surinamicum</i>	01	n/c	n/c
<i>M. carcinus</i>	05	0.00240241	0.00133068
<i>M. olfersii</i>	04	0.00100000	0.000954285
<i>P. hancockii</i>	02	0.00000000	0
<i>C. caementarius</i>	02	0.00199900	0.00195189

Debido a la relación que se considera entre las diferentes especies gemelas, al considerar cada par de especies como una unidad, se encuentra que la variabilidad genética dentro de cada una de ellas (*intrasibling*, Tabla 16), es menor que cuando se considera entre gemelas (*intersibling*, Tabla 17), donde existe un promedio de alrededor del 10% de distancia genética.

Tabla 15: Distancias genéticas interespecífica del gen *16S* para las especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano y las especies gemelas del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap* y con *C. caementarius* y *P. hancockii* como grupos externos. Los números en rojo resaltan que los menores valores corresponden entre especies consideradas gemelas

<i>M. panamense</i>		0.016	0.014	0.016	0.017	0.016	0.012	0.016	0.016	0.016	0.021	0.140
<i>M. inca</i>	0.123		0.014	0.014	0.012	0.012	0.015	0.015	0.014	0.014	0.021	0.129
<i>M. gallus</i>	0.114	0.097		0.013	0.015	0.015	0.014	0.015	0.014	0.016	0.023	0.150
<i>M. americanum</i>	0.132	0.091	0.084		0.015	0.014	0.016	0.015	0.007	0.014	0.021	0.125
<i>M. digueti</i>	0.135	0.078	0.112	0.090		0.002	0.016	0.012	0.015	0.006	0.021	0.117
<i>M. transandicum</i>	0.134	0.077	0.114	0.092	0.011		0.016	0.011	0.014	0.006	0.021	0.114
<i>M. amazonicum</i>	0.081	0.109	0.101	0.123	0.122	0.122		0.015	0.015	0.015	0.023	0.123
<i>M. surinamicum</i>	0.128	0.097	0.112	0.095	0.064	0.069	0.107		0.014	0.011	0.021	0.123
<i>M. carcinus</i>	0.136	0.093	0.097	0.027	0.097	0.099	0.117	0.085		0.013	0.021	0.125
<i>M. olfersii</i>	0.136	0.091	0.113	0.091	0.022	0.029	0.115	0.055	0.084		0.021	0.116
<i>P. hancockii</i>	0.200	0.198	0.216	0.195	0.204	0.204	0.212	0.193	0.203	0.204		0.117
<i>C. caementarius</i>	1.219	1.164	1.226	1.141	1.116	1.111	1.159	1.146	1.147	1.103	1.122	

Tabla 16: Distancias genéticas (d) *intrasibling* del gen *16S* para las especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano unidas a las especies sibling del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

	Distancia	S
Gm1: AmxCar	0.0152992 (0.0-0.03)	0.00406698
Gm2: dgxolf	0.01074140 (0.0 - 0.022)	0.00299781
Gm3: pnxamz	0.04894958 (0.006-0.085)	0.00705060
Gm4: trnxsur	0.015444527 (0.002-0.08)	0.00327305
<i>P. hancockii</i>	0	0

Tabla 17: Distancias genéticas (d) intersibling del gen 16S para las especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano unidas a sus especies gemelas del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 bootstrap

	Gm3: pnxamz	Gm1: AmxCar	Gm2: dgxolf	Gm4: trnxsur	<i>Outgroup</i>
Gm3: pnxamz		0.014	0.014	0.014	0.020
Gm1: AmxCar	0.126		0.013	0.013	0.021
Gm2: dgxolf	0.125	0.090		0.003	0.021
Gm4: trnxsur	0.124	0.094	0.014		0.020
<i>P. hancockii</i>	0.199	0.195	0.197	0.196	

El árbol filogenético obtenido por MP, e IB, considerando a otros miembros del género *Macrobrachium*, reveló la fortaleza que tienen las secuencias obtenidas en este estudio, para considerarlas según lo establecido por Holthuis (1952), como especies gemelas (Figs. 14 y 15). Igualmente, hace evidencia que las secuencias parciales del gen 16S de *M. inca* y *M. gallus* no se agrupan con ninguna de las secuencias de las especies del Atlántico. Además de ello, la relación entre las especies gemelas está soportada también por sus características morfológicas sobre todo a lo relacionado a la forma del rostrum (Pilegui y Rossi, 2014) y a la forma y tamaño del segundo par de periópodos.

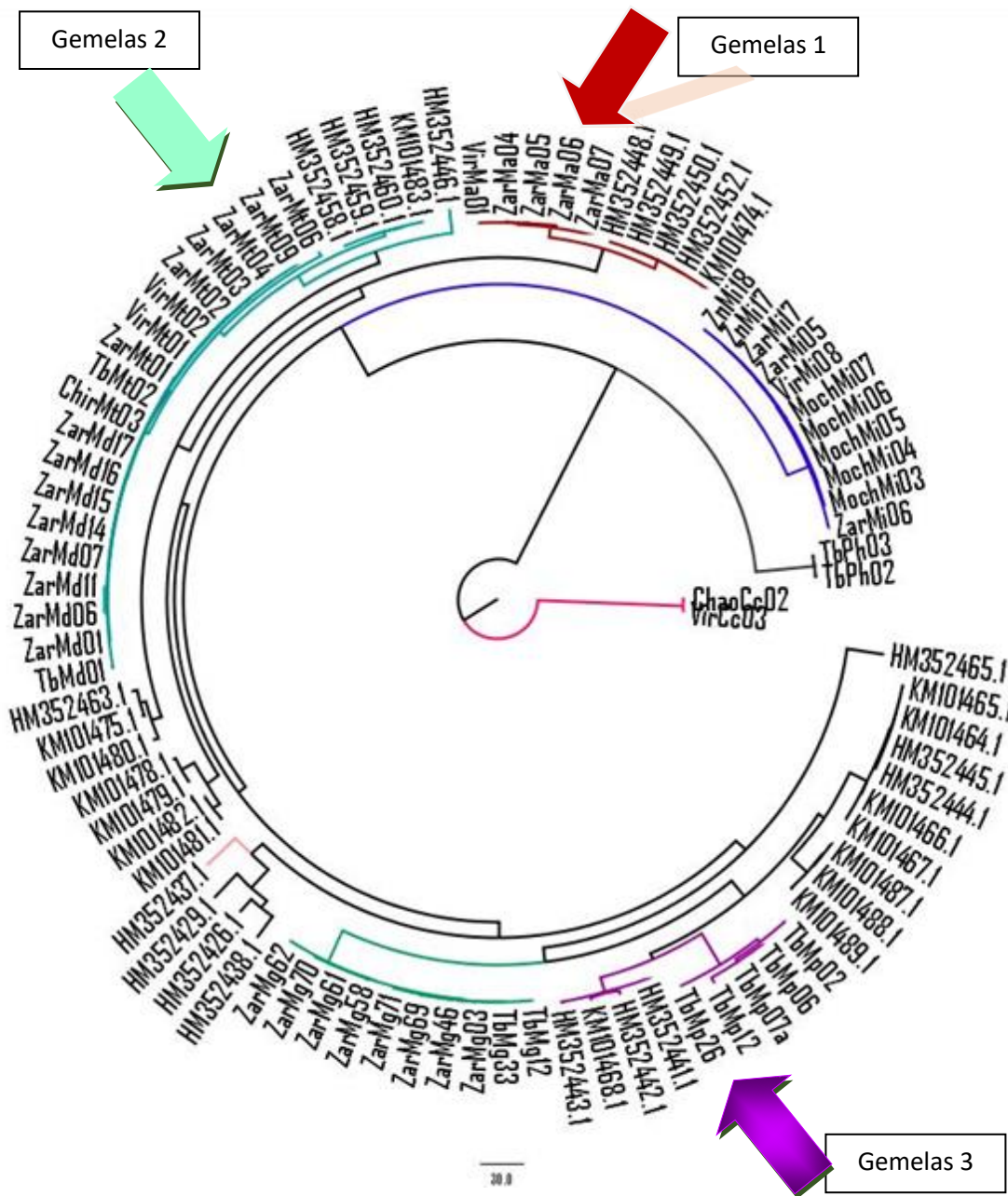


Fig 14: Árbol filogenético de especies del género *Macrobrachium*: 16S construido con el algoritmo Máxima Parsimonia (MP), considerando *P. hancockii* y *C. caementarius* como grupos externos

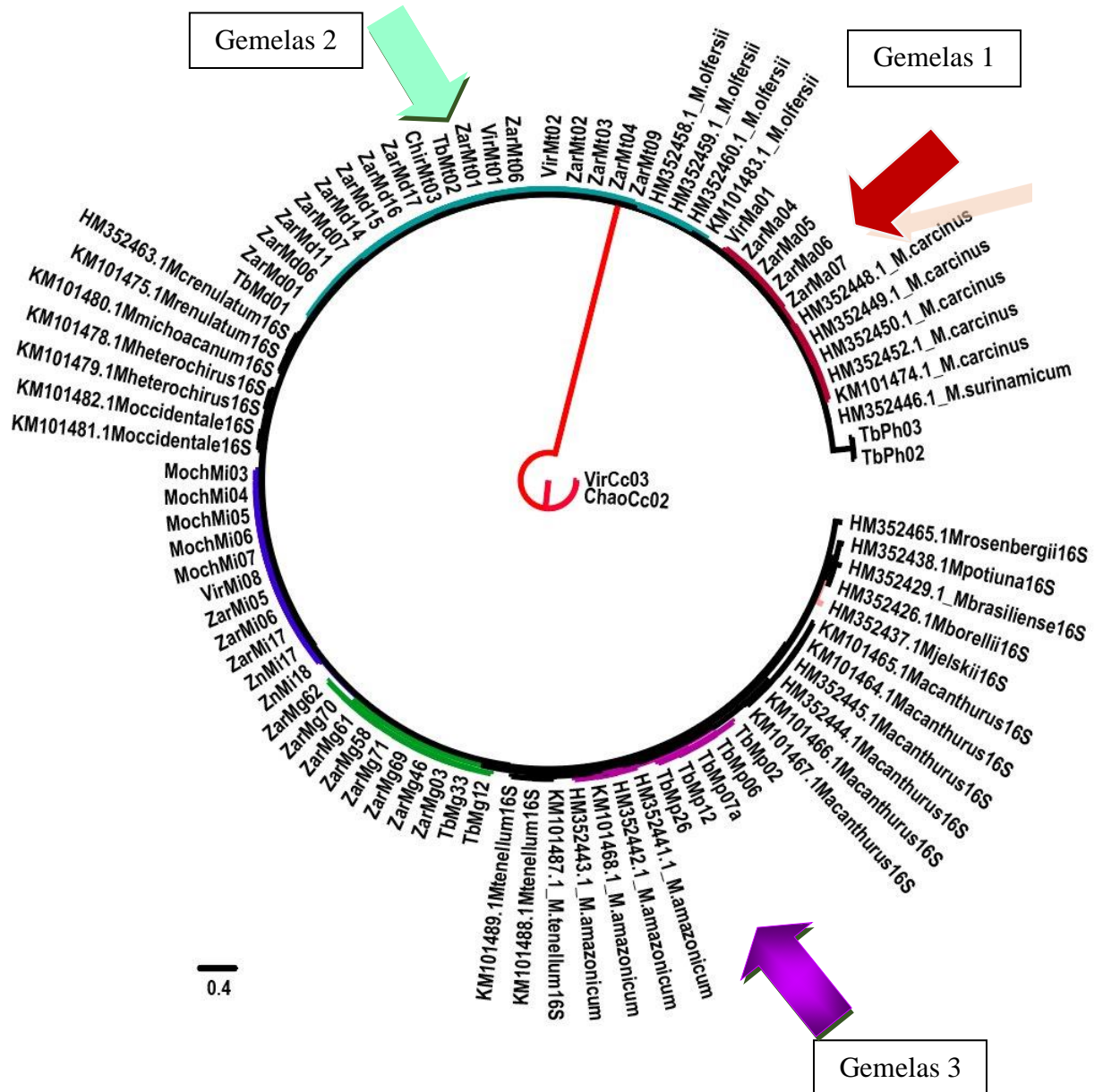


Fig 15: Árbol filogenético de especies del género *Macrobrachium*: 16S construido con el análisis de Inferencia Bayesiana (BI), con el modelo de sustitución HKY+I+G y considerando a *P. hancockii* y *C. caementarius* como grupos externos

Tiempo de Divergencia

La divergencia genética analizada con el gen 16S, mostró la separación de los grupos gemelos entre sí y de otras secuencias de especies de *Macrobrachium*

consideradas, encontrando que el grupo Gemela 1 (*M. americanum* x *M. carcinus*), se separó entre 4.44 a 4.04 Ma, el grupo Gemela 2 (*M. digueti* x *M. olfersii*) entre 2.33 a 1.81 Ma y el grupo Gemela 3 (*M. panamense* x *M. amazonicum*) de 5.00 a 3.65 Ma. (Tabla 18, Figs. 16 y 17).

Los valores entre paréntesis son los datos del tiempo de divergencia calculados en base a las distancias genéticas, con *C. caementarius* como grupo externo, mientras que los valores en negrita son los calculados con el programa Beast.

Tabla 18: Tiempo de Divergencia entre las especies del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano y especies de la vertiente del Atlántico, basado en el gen *16S*

Grupo Gemelo	Tiempo de Divergencia (Ma)	Relación con el modelo general del cierre del istmo de Panamá
<i>M. americanum</i> x <i>M. carcinus</i> (Gm1)	4.43 – 4.04 (2.48 a 1.65)	Antes (después)
<i>M. digueti</i> x <i>M. olfersii</i> (Gm2)	2.34 – 1.81 (1.87 a 1.25)	Después (después)
<i>M. panamense</i> x <i>M. amazonicum</i> (Gm3)	5.00 – 3.65 (6.69 a 4.46)	Antes (antes)

Así mismo puede notarse en el recuadro rojo de las Figs 16 y 17, el tiempo en el que habría ocurrido la separación entre *M. gallus* y el ancestro que dio origen posteriormente a *M. panamense* y *M. amazonicum*, hace 7.5597 a 5.4577 Ma; mencionándose que las características de las tres especies es la presencia de rostrum alargado y quelas largas y delgadas. La separación de *M. inca*, es más antigua (recuadro anaranjado), separándose como especie hace 10.5694 y 7.6178 Ma.

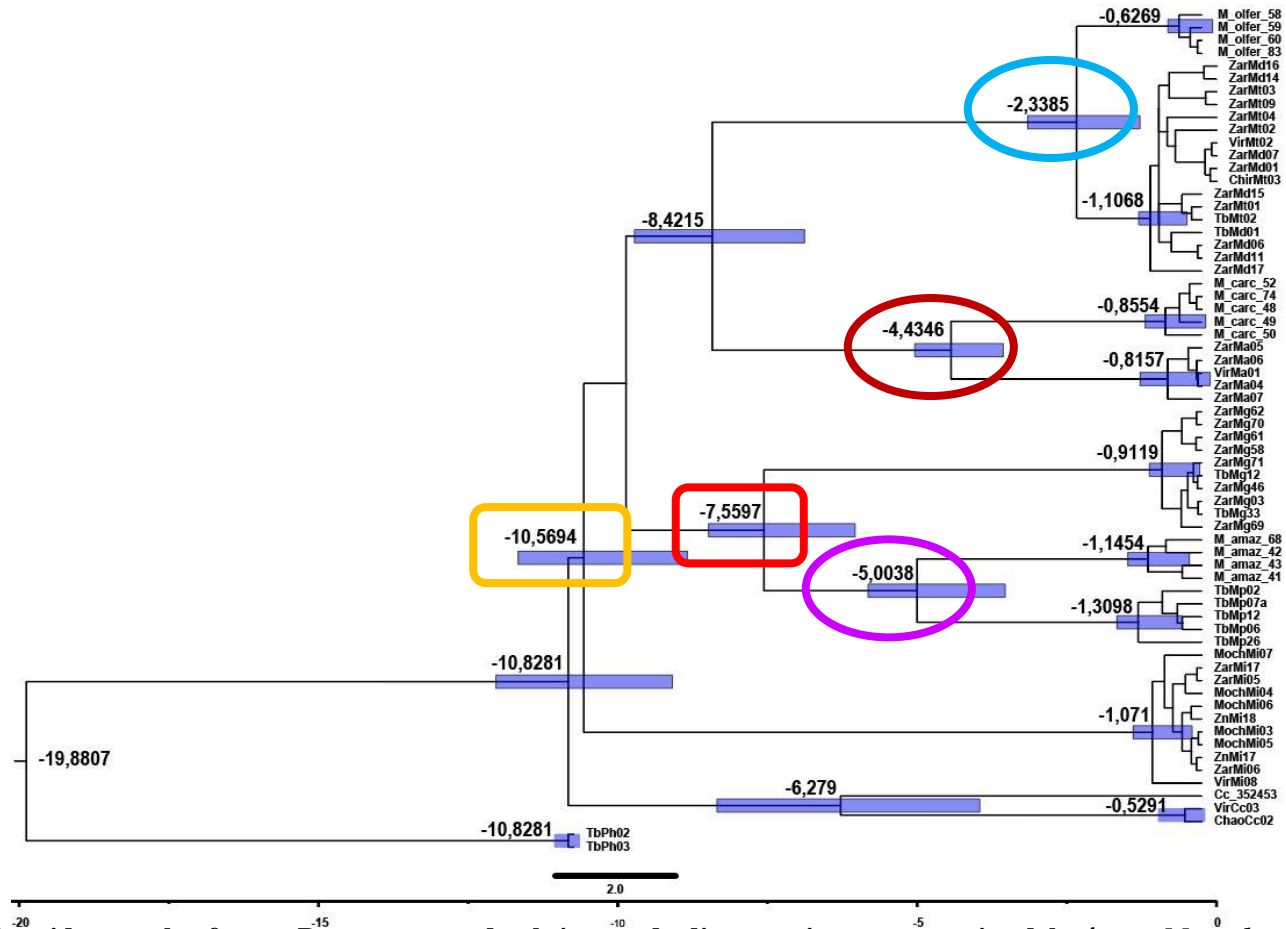


Fig. 16: Timetree obtenido por el software BEAST mostrando el tiempo de divergencia entre especies del género *Macrobrychium*, considerando una tasa de mutación del 0.9% Ma, para el gen *16S*

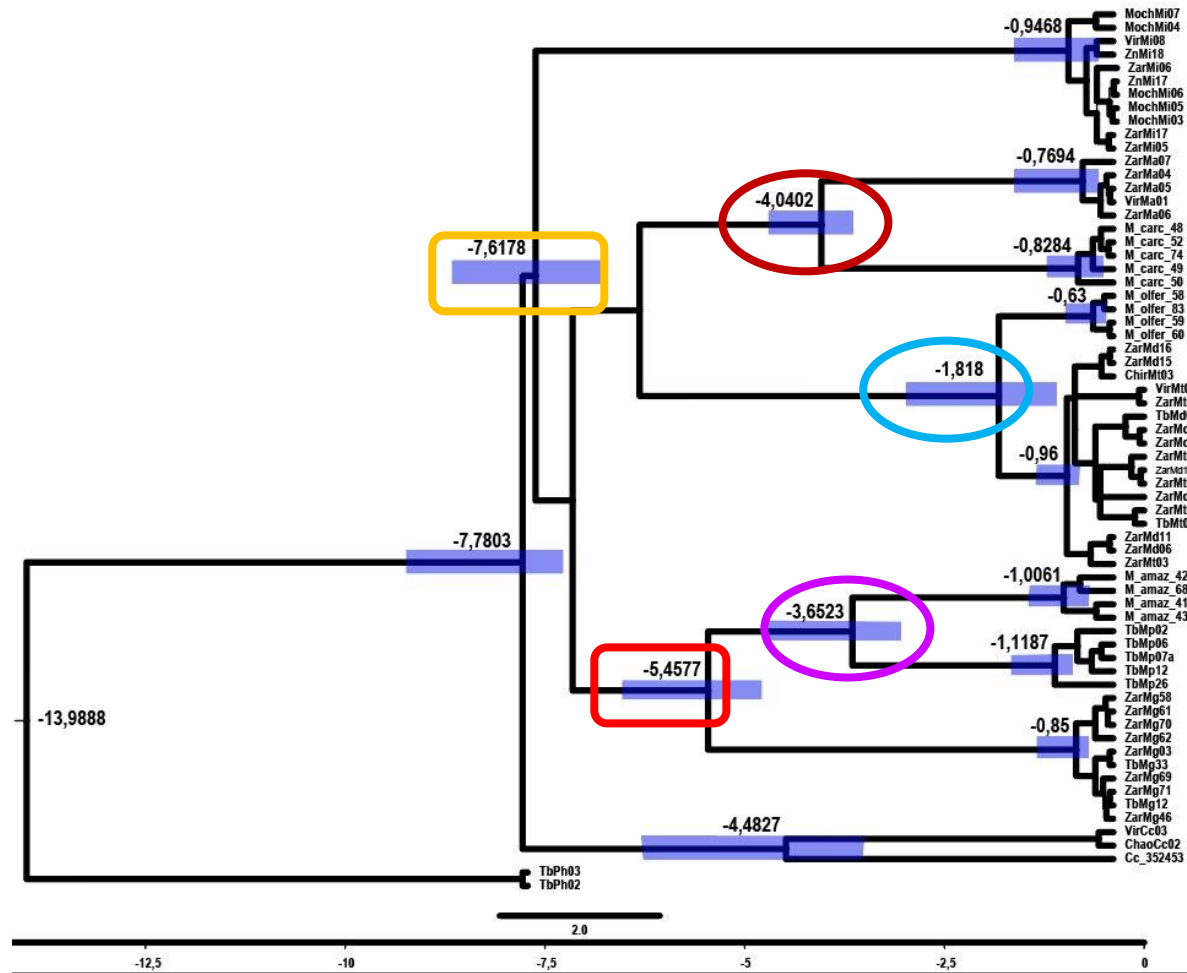


Fig. 16: Timetree obtenido por el software Beast mostrando el tiempo de divergencia entre especies del género *Macrobrachium*, considerando una tasa de mutación del 0.6% Ma, para el gen *16S*

Así mismo puede notarse en el recuadro rojo de las Figs 16 y 17, el tiempo en el que habría ocurrido la separación entre *M. gallus* y el ancestro que dio origen posteriormente a *M. panamense* y *M. amazonicum*, hace 7.5597 a 5.4577 Ma; mencionándose que las características de las tres especies es la presencia de rostrum alargado y quejas largas y delgadas. La separación de *M. inca*, es más antigua (recuadro anaranjado), separándose como especie hace 10.5694 y 7.6178 Ma.

Con respecto al gen *COI*, sólo se obtuvieron amplificaciones positivas con *M. americanum*, por ello, es que con este gen se analizará el par gemela 1 (*M. americanum* x *M. carcinus*). Al igual que para el gen *16S*, los análisis de distancia revelaron también que el porcentaje de variación intraespecífica (Tabla 19) fue más bajo que la variación interespecífica (Tabla 20), notando además que la variación interespecífica fue menor entre las especies gemelas (resaltado con rojo en la Tabla 20) que la no gemelas. Además de ello, puede observarse que la variación interespecífica entre las especies gemelas es mayor para *COI*, que la variación de *16S* para estas especies.

Por otro lado, en mérito a la relación que se considera entre las diferentes especies gemelas, al considerar cada par como una unidad, se encuentra que la variabilidad genética dentro de cada una de ellas (Tabla 21, Anexo 01), es menor que cuando se considera entre gemelas (Tabla 22, Anexo 01), donde alcanza 19 % de distancia genética.

Tabla 19: Distancias genéticas intraespecífica del gen *COI* para especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano y las especies gemelas del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

Especie	Distancia	Error Standar
<i>M. americanum</i>	0.001865672	0.00120396
<i>M. digueti</i>	0.014925373	0.004898012
<i>M. carcinus</i>	0.061878109	0.007302024
<i>M. olfersii</i>	0.004477612	0.00175818
<i>C. caementarius</i>	n/c	n/c

Tabla 20: Distancias genéticas interespecífica del gen *COI* para especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano y las especies gemelas del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

<i>M. americanum</i>		0.0161	0.0088	0.0140	0.0160
<i>M. digueti</i>	0.1898		0.0157	0.0156	0.0166
<i>M. carcinus</i>	0.0738	0.2038		0.0137	0.0150
<i>M. olfersii</i>	0.1496	0.1660	0.1593		0.0155
<i>C. caementarius</i>	0.1926	0.2183	0.1861	0.1761	

Para este gen, el árbol filogenético con Inferencia Bayesiana (BI), considerando sólo secuencias propias de las especies gemelas, las agrupa según lo establecido por Holthuis (1952) (Fig. 18) para la especie gemela 1. Las secuencias de *M. digueti* y *M. olfersii*, se usaron sólo para poder separar las secuencias en el árbol.

El tiempo de divergencia genética analizada para este gen, sólo se analizó para el par hermano *M. americanum* – *M. carcinus* (Tabla 23), separándose este par de especies hace 5.1 Ma, calculados con la tasa mutacional del gen de 0.7% Ma (Knolwton y Weigt, 1998).

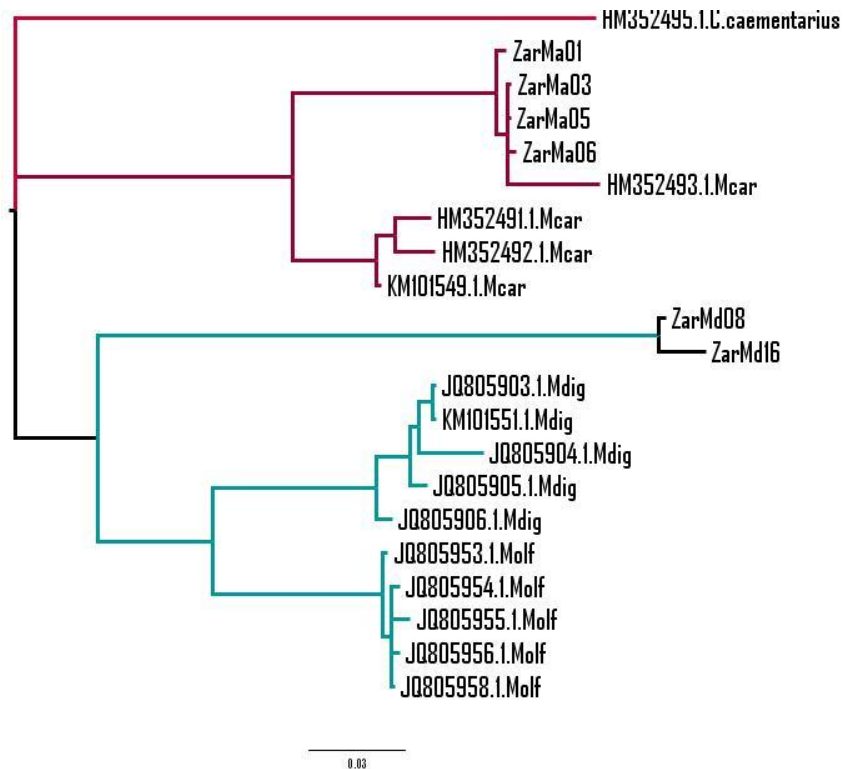


Fig. 18: Árbol filogenético de especies del género *Macrobrachium*: *COI* construido con el análisis Inferencia Bayesiana (BI), considerando secuencias de *M. digueti* del Genbank y *C. caementarius* como grupo externo

Tabla 23: Tiempo de Divergencia entre las especies del género *Macrobrachium* del Pacífico peruano y especies del Atlántico, basado en el gen *COI*

Grupo Gemelo	Tiempo de Divergencia (Ma)	Relación con el modelo general del cierre del istmo de Panamá
<i>M. americanum</i> x <i>M. carcinus</i> (Gm1)	5.16	Antes

2.7 DISCUSIÓN

2.7.1 Identidad morfológica de las especies del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano

La biodiversidad de crustáceos decápodos, específicamente en los ambientes continentales de América del Sur está caracterizada por 7 familias, siendo una de ellas, la familia *Palaemonidae*. En territorio peruano se encuentran reportadas 12 especies de esta familia, de las cuales ocho (08) pertenecen al género *Macrobrachium* (Amaya y Guerra, 1976) y de ellas, *M. inca* y *M. gallus*, se consideran endémicas para el Perú (Zacarías y Yépez, 2008); mientras que *M. transandicum*, *M. digueti*, *M. panamense*, *M. americanum*, *M. tenellum* y *M. hancockii*, presentan mayor rango de distribución hacia la parte central del Pacífico americano (Hendrickx y Wicksten, 2011; Valencia y Campos, 2007; Villalobos, 1968; Holthuis, 1952, 1950).

El muestreo realizado en el presente estudio, durante casi dos años, ha permitido encontrar que los ríos Zarumilla y Tumbes (departamento de Tumbes) albergan todas las especies reportadas para el Perú, mientras que, de las dos especies consideradas endémicas para el Perú, es *M. inca* la que mantiene aún su distribución en casi todos los ríos reportados por Amaya y Guerra (1976); en tanto que, *M. gallus*, sólo ha podido ser adquirida en los ríos del departamento de Tumbes, y según lo encontrado en el presente estudio, habría desaparecido como especie en los demás ríos (Tabla 5); mencionándose además que Ruiz (2016) en un estudio sobre diversidad de crustáceos en el río Moche, no registró a esta especie en sus capturas.

La especie *M. americanum*, con distribución hasta el río Chira (Amaya y Guerra, 1976; Valencia y Campos, 2007; Holthuis, 1952, 1950), fue encontrada también

en canales que drenan el río Virú, aunque un solo espécimen de gran tamaño, suponiendo que fue traído por el ingreso de aguas cálidas en un Fenómeno El Niño, permaneciendo por ello en la zona. No se pudo obtener especímenes de *M. tenellum* y *M. hancockii*, de distribución en los ríos de los departamentos de Piura y Tumbes, según lo reportado por Amaya y Guerra (1976). Así mismo, *M. transandicum* amplió su distribución hasta el río Virú.

Los camarones *Macrobrachium* presentan poca variabilidad fenotípica, son morfológicamente conservados (Holthuis, 1952) por lo que su clasificación suele ser muy complicada, creando muchas dificultades taxonómicas dentro del género (Pileggi y Mantelatto, 2010; Murphy y Austin, 2003,2004; Pereira, 1997; Villalobos, 1968; Holthuis, 1952). A pesar de ello, por las características consideradas en las claves de identificación (Méndez, 1983, Valencia y Campos, 2007) fue posible establecer una identificación morfológica de las especies obtenidas.

Se menciona, a pesar de ello, que se presentaron algunos inconvenientes en la identificación morfológica de *M. transandicum*, al momento de decidir si las quelas eran totalmente diferentes en forma, como se presenta de una manera muy evidente en *M. digueti*. Sin embargo, tal como se observa en el Anexo 4, fue determinante, para la identificación de los especímenes como *M. transandicum*, al hecho de que tanto Valencia y Campos (2007) como Méndez (1983), consideran que los machos de *M. digueti* si presentan quelas fuertemente diferentes en forma y tamaño. La fórmula rostral fue diferente a la reportada por Valencia y Campos (2007), de 9 a 11 dientes vs. 14-16/2-4. Se aprecia también que los dientes de *M. transandicum* son más pronunciados que los de *M. digueti*.

Se ha observado, además, que las características de las quelas de *M. transandicum* son similares a las de la hembra de *M. digueti*, morfotipo *michoacanus*, reportado por García (2014). Sin embargo, en las muestras identificadas como *M. transandicum*, se encuentran individuos hembras y machos, sexados por la ubicación del gonoporo, que presentan quelas con las mismas características en ambos sexos (Anexo 4). Se requiere de mayor muestreo y considerar otros caracteres morfológicos a fin de determinar con certeza la presencia de esta especie en los ríos peruanos, reportada por Amaya y Guerra (1976) en su momento, como especie nueva para el Perú.

La experiencia adquirida en la identificación de los especímenes colectados en el presente estudio, corrobora lo manifestado por Pileggi y Mantelatto (2010) que, de acuerdo a la revisión taxonómica, los caracteres usados como forma, largo y dentición en el rostro; espinas y forma del telson; morfología del segundo par de periópodos, no son suficientes para resolver muchos de los problemas que se presentan para la separación de las especies de *Macrobrachium*. Esas características, además, no se mantienen a lo largo de toda la vida de los animales y tampoco es común en ambos sexos.

La identificación morfológica requiere de individuos completos, machos y adultos, y tal como encontró Hernández (2007), en el presente estudio muchos de los organismos se presentaron incompletos, por ello es que el referido autor plantea identificar a través del registro del color de los ejemplares, aunque como él mismo señala, no es confiable hacer la identificación morfológica basada en el color, pues la coloración puede variar para la misma especie según la alimentación, condición del hábitat (oscuro o iluminado) o estadio de vida, además de ser muy subjetivo de acuerdo al personal encargado de la recolecta.

Se concluye que se ha realizado una pre-identificación morfológica de seis de las ocho especies de *Macrobrachium* reportadas para el Perú según Amaya y Guerra (1976); las restantes: *M. tenellum* y *M. hancockii* no se identificaron al no haberse obtenido especímenes en el muestreo realizado. La logística desplegada por los autores mencionados fue más grande que la realizada en el presente estudio, por lo que para confirmar que aún se encuentran en los ríos peruanos, se requiere de muestreo adicional y con mayor logística.

2.7.2 Identidad molecular y relaciones filogenéticas de las especies morfológicas del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano, en base al análisis de un fragmento de los genes *COI*, *16S* y *28S*

Identidad Molecular

Las especies de camarones presentes en los ríos del Pacífico peruano no han sido muy bien estudiadas, mencionándose que los muestreos permanentes realizados por IMARPE desde 1996, están relacionados a *C. caementarius*, debido al monitoreo de su población realizada para el establecimiento de la veda reproductiva (Zacarías y Yépez, 2008), veda que es además aplicable a los miembros del género *Macrobrachium*. A nivel molecular, se tiene conocimiento de que *C. caementarius* ha sido estudiada en su variabilidad genética, aunque sin datos publicados.

En ese sentido, luego de la pre - identificación taxonómica, el presente estudio constituye el primer acercamiento a nivel molecular para definir la condición como tal, de las especies del género *Macrobrachium* que han sido reportadas por el trabajo más completo en diversidad de camarones en Perú, realizado por Amaya y Guerra (1976). El uso de secuencias de ADN tiene la gran ventaja de permitir la creación de una filogenia que es capaz de testear la hipótesis

sistemática basada en morfología (Murphy y Austin, 2003) y puede potencialmente superar alguna de las dificultades encontradas a través del uso de caracteres morfológicos (Murphy y Austin, 2004 a, b). Se menciona además que se adopta en el presente trabajo, el concepto de especie categorial, no operacional propuesto por de Quiroz (2007), que indica que las especies son segmentos de linajes (constituyendo una línea ancestro-descendiente) evolutivos de nivel poblacional.

Los resultados moleculares expresados en las distancias genéticas y en la topología de los árboles obtenidos con las secuencias parciales de los genes *COI*, *16S* y *28S*, confirman el estatus taxonómico o categoría de especie de *M. americanum*, *M. inca*, *M. gallus*, *M. panamense* y *M. digueti* como especies válidas a partir de análisis de individuos muestreados en ríos que desembocan en el Pacífico peruano. Con respecto a *M. transandicum*, esta especie presentó secuencias similares a *M. digueti*, obteniéndose distancias genéticas interespecíficas muy cercanas a cero (Tablas 9, 11 y 13), así como la organización de las secuencias en la misma rama del árbol; por lo que, se considera en el presente trabajo, que ambas especies pre - identificadas morfológicamente como especies diferentes, representarían una sola entidad o linaje a nivel de especie, por lo que podrían ser tratadas como la misma especie. En tal sentido, la hipótesis planteada al respecto en el presente estudio sólo es aceptada para *M. americanum*, *M. inca*, *M. gallus*, *M. panamense* y *M. digueti*; en tanto que *M. transandicum* forma un linaje común con *M. digueti*.

Casos similares han sido reportados por otros autores: Murphy y Austin (2004b) estudiando a *M. australiense* con secuencias parciales de *16S*, encontraron que, si bien había diferencia morfológica entre individuos de diferentes localidades - por lo que se reportaban como especies diferentes- la divergencia genética entre

ellos estuvo entre 0.2 – 1.6%, como el presentado entre *M. digueti* y *M. transandicum*. Los autores además refieren que la discordancia existente entre la taxonomía basada en características morfológicas y data molecular que se presenta en algunos casos obedece probablemente a que la clasificación taxonómica comúnmente está basada en los trabajos ampliamente difundidos de Holthuis (1950, 1952).

Villalobos (1968), comenta que la vertiente atlántica de América, desde Florida hasta el norte de Argentina y la vertiente del Pacífico, desde Baja California hasta Ecuador, contiene en sus cuencas hidrográficas un grupo de especies del género *Macrobrachium*, cuya especie representante, *M. olfersii*, ha dado una serie de rasgos que más o menos modificados, son el denominador común del grupo. De Grave (2013) menciona que *M. transandicum* es conocida a partir de tres ríos de Colombia, así como en un río del sistema de ríos de Perú, considerándola una especie pobremente conocida y cuya distribución realmente es desconocida, y que la data que existe sobre ella es insuficiente.

Por su parte, García (2014) encontró en un estudio realizado con especies del género *Macrobrachium* del Pacífico mexicano con *16S*, que *M. digueti* también presenta un segundo morfotipo denominado *michoacanus*, el que inicialmente había sido descrito como una especie diferente. El ejemplar hembra descrito por el referido autor muestra cierto parecido con la hembra de *M. transandicum*; sin embargo, en las muestras obtenidas en el presente estudio, hemos podido identificar por la posición del gonoporo, ejemplares hembras y machos (Anexo 4, Fotos 1-4), por lo que se descartó que lo que se identificó como *M. transandicum*, pudiera ser la hembra de *M. digueti*. Por su parte, Rossi y Mantelatto (2013) con datos de *H3*, también encuentran a *M. digueti* agrupado en el mismo clado con *M. olfersii* y *M. faustinum*, por lo que proponen la

existencia de un complejo *olfersii* integrado por varias subespecies; complejo al que se propone debe incluirse *M. transandicum*.

Relaciones Filogenéticas

Actualmente, las relaciones filogenéticas de las especies se realizan con herramientas moleculares, en un proceso al que Lee (2004) llamó “la molecularización de la taxonomía”, jugando un rol fundamental en la definición del linaje a nivel de especie. El principal objetivo de un análisis filogenético molecular es el de inferir la historia evolucionaria de un conjunto de especies y representarlas en un diagrama jerárquico de ramas, denominado árbol filogenético, cuya topología refiere la información en el orden de las relaciones (Palero y Crandall, 2009).

Los marcadores moleculares utilizados en el presente trabajo, *COI* y *16S* fueron usados debido a que tienen alta tasa mutacional (Rossi y Mantelatto, 2013), incluyéndose además al gen nuclear *28S*, gen que recientemente comenzó a ser usado en estudios filogenéticos de crustáceos, por tener una tasa evolucionaria similar o más baja que *18S* (Chen *et al.*, 2009).

Las distancias genéticas obtenidas entre las especies *Macrobrachium* peruanas (Tablas 9, 11 y 13) muestra grados diferentes para las secuencias de los tres genes usados. Sin considerar los valores cercanos a cero que se presentan para los tres genes entre *M. transandicum* y *M. digueti*, por las razones ya expuestas en párrafos anteriores, es con el gen *COI* con el que se presentan las mayores distancias interespecíficas, aún por encima del gen nuclear *28S*, por lo que *COI* se confirma como el mejor candidato para identificar molecularmente las especies del género *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano, y por lo tanto para el establecimiento de relaciones filogenéticas más resolutivas.

Nuestros resultados son coincidentes con los de Toon *et al.* (2009) quienes refieren que el gen codante mitocondrial *COI* es altamente variable entre especies lo que lo hace un buen candidato a niveles taxonómicos bajos. Zhang *et al.* (2009) con secuencias de *COI*, otorgó estatus de especie a tres especies *Macrobrachium* (*M. rosenbergii*, *M niponense* y *M. qilianensis*) con distancias genéticas que van de 19.87% a 23.84%. Así mismo, Lefébure *et al.* (2006) en un estudio con una serie de taxones de crustáceos con *COI* y *16S*, encontraron que las secuencias de *COI* son marcadores apropiados para varios niveles taxonómicos, pero más adecuado particularmente a nivel de especie.

Sin embargo, Toon (2009) y Schubart (2009) consideran algunas desventajas en el uso de mDNA en general; por ejemplo, al ser simple *locus*, cuando son usados solos, pueden no representar el verdadero árbol de las especies. Un problema de algunos genes mitocondriales codantes como *COI*, es la presencia de pseudogenes, común en algunas especies de decápodos (Schubart, 2009; Song *et al.*, 2008), pero que en las secuencias usadas para determinar la filogenia de los camarones peruanos no se evidenciaron, probado a través de la comparación con la secuencia de aminoácidos de *M. rosenbergii* del Genbank (AY659990.1) como secuencia de referencia para determinar la correcta posición del codón de inicio.

Otro problema que puede presentar *COI* debido a su rápida evolución es la saturación de nucleótidos, la que según Toon (2009) se ha encontrado que puede presentarse por encima del nivel de familia, pero que sin embargo debe ser testeado en cualquier análisis filogenético. El análisis de saturación realizado a las secuencias de *COI* (Anexos 4 y 7), garantizan que la data utilizada no presentó saturación, por lo que las relaciones filogenéticas establecidas con *COI* se consideran aceptables.

La aparente conservación morfológica dentro del género *Macrobrachium* comentada al hacer el análisis morfológico (Holthuis, 1950, 1952) no se refleja en los niveles de divergencia genética entre las especies. En el presente estudio para *16S*, se encontró un valor máximo de distancia genética de 11.76% entre *M. digueti* y *M. gallus* y un mínimo de 0.1% entre *M. digueti* y *M. transandicum*, que hace que, en el árbol, las secuencias de ambas especies se ubiquen en la misma rama. El también bajo valor de 0.5% presentado entre *M. inca* y *M. panamense*, se explica al estar las dos únicas secuencias de *M. panamense* incluidas junto con las de *M. inca*. Se concluye en el presente estudio, que salvo el caso de *M. panamense* mencionado, está demostrado la utilidad del gen *16S* como marcador para estudios filogenéticos.

Los resultados con las secuencias parciales del gen *16S* del presente estudio, son coincidente con Chan *et al.* (2008), quienes mencionan que, si se esperaba que existiera un alto grado de divergencia con *COI* por su alto grado de evolución, también se presenta con *16S* a pesar de ser uno de los genes mitocondriales más conservados, aceptándose que el rango de divergencia para este gen es a partir de 3.5% entre especies (Schubart, 2009). Murphy y Austin (2004) en las 30 especies de *Macrobrachium* estudiadas concluyen que las relaciones filogenéticas están parcialmente resueltas usando *16S*, lo que puede ser en parte debido al alto grado de divergencia entre las especies.

Estudios filogenéticos basados enteramente en el mDNA han comenzado a ser criticados por algunas desventajas (Schubart, 2009), resumidas en que básicamente los genes están ligados y son heredados como una sola molécula y en consecuencia ellos tienen una historia evolucionaria común y no pueden proporcionar una inferencia filogenética independiente (Chu *et al.*, 2009). El uso de genes nucleares en adición a los genes mitocondriales aumenta el número de

marcadores independientes en un juego de datos, incrementando la posibilidad de una verdadera filogenia de especies (Toon *et al.*, 2009; Garrick *et al.*, 2010) de diversos grupos taxonómicos, dentro de ellos los artrópodos (Garrick *et al.*, 2010).

En este contexto, la sistemática molecular con genes nucleares de decápodos ha experimentado incorporar en adición a los genes rDNA mitocondriales, genes rDNA nucleares, los cuales evolucionan a una tasa más baja que los mitocondriales (Chu *et al.*, 2009). Con respecto a camarones *Macrobrachium*, Chen *et al.* (2009) encontraron en un estudio realizado con los genes ribosomales *16S* y *28S*, que *28S* presentó ciertas ventajas con respecto que al ribosomal mitocondrial: secuencia de mayor tamaño, un 64.6% mayor en distancia genética que el mitocondrial y 53% más en sitios variables y parsimoniosamente informativos, mayor contenido de GC con respecto a AT y un ratio ta:tv favorable a las transiciones (Porter *et al.*, 2005; Crandall *et al.*, 2000; Jarman *et al.*, 2000).

Ello coincide parcialmente con lo encontrado para las secuencias de estos genes en camarones peruanos, para las cuales las secuencias del gen *28S* fueron un 27% más largas que *16S* y 8% más que *COI*, y con mayor contenido de pares GC; aunque el ratio ta:tv fue 0.99, es decir ligeramente favorable a las tranversiones. Incrementar el tamaño de la secuencia, como lo señala Chen *et al.* (2009) aumenta el número de sitios informativos que mejora la resolución de los análisis filogenéticos.

Además de ello, el inconveniente presentado con las dos únicas secuencias de *M. panamense* (TbMp16 y TbMp17), para el gen *16S* que se incluyeron junto con las secuencias de *M. inca* (Fig.7 y 8), fue resuelto con el árbol obtenido con

el gen 28S, el que ubica en un clado aparte todas las secuencias de *M. panamense* (Figs. 9 y 10), incluidas las secuencias de los especímenes catalogados como TbMp16 y TbMp17. En el árbol construido con las secuencias de este gen, con IB (Fig. 10), se puede notar, además, que las especies que comparten caracteres morfológicos semejantes, se agrupan en clados hermanos: *M. inca* – *M. americanum* (rostro mediano, y segundo par de periópodos de tamaño diferente), y *M. gallus* – *M. panamense* (rostro alargado y segundo par de periópodos largos y delgados); en tanto que con MP (Fig. 09), esta condición se encuentra sólo para *M. gallus* – *M. panamense*.

Este hecho podría apoyar la hipótesis planteada, de que *M. inca* y *M. gallus* están relacionadas con *M. americanum* y *M. panamense*, respectivamente; sin embargo, esta premisa no ha sido soportada por los tres genes, en donde debería de esperarse que las secuencias entre estos dos pares de especies presenten un patrón definido, con las distancias genéticas entre sí, más baja que con las otras especies de *Macrobrachium* estudiadas. Con las secuencias parciales del gen *COI*, puede notarse esta relación entre *M. americanum* y *M. inca*, pero no entre *M. gallus* y *M. panamense* (Figs. 5 y 6). Si es importante resaltar lo que sugiere el Timetree (Figs. 16 y 17), donde se observa que *M. gallus* tiene el mismo antecesor que el grupo *M. panamense* – *M. amazonicum*, destacando las características comunes a las tres especies: rostrum largo y quelas largas y delgadas. La divergencia de *M. inca*, con las especies con las que comparte características morfológicas (rostro pequeño y quelas robustas y dimórficas) es más ancestral.

Si bien una buena estimación de la filogenia depende en última instancia de una data robusta, es decir muchas secuencias y además secuencias grandes, una potencialmente poderosa aproximación, es el análisis de las secuencias de todos

los genes usados, como un todo concatenado o meta secuencia, el que podría ser usado solamente cuando existe una sustancial evidencia de un consistente modelo evolucionario a través de todos los genes (Palero y Crandall, 2009). Los datos concatenados de los genes usados en el presente estudio soportan los resultados en el análisis individual, resolviendo además la posición de *M. panamense* como entidad taxonómica, cuyas secuencias del gen *16S* habían sido incluidas en el mismo nodo con secuencias de *M. inca*.

La topología de los árboles construidos con los dos métodos de reconstrucción filogenética usados, muestran que las especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano, forman un grupo monofilético (Figs. 5-10), como también resultó para estas especies, pero en territorio mexicano por Acuña *et al.* (2013) y por Pileggi y Mantelatto (2010) para camarones americanos. Para otros *Macrobrachium* australianos a través del uso de *16S* como marcador molecular, Murphy y Austin (2004a) no pudieron encontrar evidencia que las especies *Macrobrachium* endémicas se habrían originado a partir de un mismo antecesor común, y que por lo tanto evolucionaron a partir de varios orígenes. Lui *et al.* (2007) encontró monofilia para la mayoría de especies *Macrobrachium* estudiadas, aunque otras fueron parafiléticas. Anger (2013) concluye que ya sea que la monofilia o la parafilia se asuma para el género, todas las especies *Macrobrachium* del Neotrópico, se originaron a partir de un antecesor común, diversificando como parte del proceso evolutivo.

2.7.3 Filogenia de las especies de *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano con las especies de la Vertiente del Atlántico

Si bien un reloj molecular proporciona potencialmente una perspectiva temporal en modelos de cambio evolucionario, la calibración es a menudo un problema

para taxas que carecen de registro fósil y cuando éste no está disponible, son usados a menudo, eventos biogeográficos o geológicos. El cierre final del camino marino en América Central es el punto de calibración más ampliamente usado para grupos taxonómicos marinos (Marko, 2002).

El istmo de Panamá representa una completa, relativamente reciente y bien documentada barrera, en lo que fue un gran ambiente marino neotropical (Craig *et al.*, 2004; Knolwton y Weigt, 1998; Knolwton *et al.*, 1993), y constituye uno de los eventos más influenciados en los últimos millones de años en la historia de la tierra, que cambió el clima y las condiciones oceanográficas en ambos lados, dividiendo al entonces océano continuo en dos regiones ecológicamente diferentes (Fortunato, 2008) y proporcionando además un gran puente de tierra entre Norte y Sur América, para que las faunas migren en ambas direcciones.

Esta barrera, cerrada en el Plioceno tardío, hace aproximadamente 3.5 Ma (Coates y Stallard, 2013; Coates *et al.*, 1992), y que según la distribución de las foraminíferas tuvo algún grado de conectividad tan tarde como hace 3.1 Ma (Fortunato, 2008; Knolwton y Weigt, 1998), permitió la separación de poblaciones de continuo flujo previo, gatillando la diversificación de muchas especies en el Neotrópico y creando dos grupos de especies extantes (Pileggi *et al.*, 2014; Fortunato, 2008; Knolwton y Weigt, 1998; Knolwton *et al.*, 1993). Para el caso de los camarones *Macrobrachium*, Anger (2013) reporta que, de las 27 especies identificadas para América, 14 especies viven exclusivamente en ríos que drenan en el Pacífico, 11 especies son exclusivas de los ríos del Atlántico y sólo dos especies (*M. hobbsi* y *M. olfersii*) han sido reportadas a ambos lados del istmo de Panamá, lo que refleja la enorme significancia biogeográfica de esta barrera.

Estas especies, llamadas pares de especies gemelas (Jordan, 1908; Miura, 2010), son típicamente identificadas basadas en similitud morfológica, representando cada una de un lado en oposición a otro lado opuesto de una barrera, son ampliamente usadas para inferir tasas de evolución molecular (Marko, 2002; Craig *et al.*, 2004;), y han proporcionado un sistema modelo de estudio para comprobar la hipótesis respecto a los efectos de la interrupción del flujo génico en un ambiente alopatrico (Craig *et al.*, 2004).

Diversos estudios de evolución molecular asumen que el cese de flujo genético entre las poblaciones de organismos acuáticos entre el Atlántico oeste y el Pacífico este se dio al final de que se cerrara el camino marino (Miura, 2010; Bermingham y Lessios, 1993; Chevaldonné *et al.*, 2002). Bajo esa premisa, la cantidad de divergencia que se presenta entre especies gemelas puede ser usada para estimar la tasa a la cual los genes divergieron (Lessios, 1998; Bermingham y Lessios, 1993; Knowlton *et al.*, 1993), reconociéndose las ventajas del istmo para estudios evolucionarios y empleándose las especies gemelas como ejemplo de separación vicariante y separación geográfica (Lessios, 1998).

Los resultados en el presente estudio, con secuencias parciales del gen *16S* de especímenes capturados en ríos del Pacífico peruano, sí confirman la gemelaridad de tres pares de especies del género *Macrobrachium*, propuestas por Holthuis (1952) como especies gemelas: *M. americanum* - *M. carcinus*; *M. panamense* - *M. amazonicum* y *M. digueti* - *M. olfersii*, conforme a la topología de los árboles obtenidos con MP e IB (Figs. 14 y 15). Esto a diferencia de los resultados de Pileggi *et al.* (2014), que no confirman la gemelaridad entre *M. panamense* - *M. amazonicum*, sino que lo establecen como un grupo del par formado por *M. tenellum* y *M. acanthurus*. En el caso de las secuencias de *COI*,

al amplificar sólo las secuencias de *M. americanum* con los primers Coia y Coif, se pudo establecer la gemelaridad de *M. americanum* – *M. carcinus*.

Así mismo, como puede observarse en las Figs. 14 y 15, elaborada considerando otras especies de *Macrobrachium* para hacer más robusta la topología, *M. jelskii*, que en los resultados obtenidos por Pileggi *et al.* (2014) se agrupa junto a *M. panamense* y otras especies más; en el árbol obtenido según nuestros datos, *M. jelskii* se separa totalmente de *M. panamense*; concordante con la característica de *M. jelskii* de presentar una forma de vida de crecimiento larval abreviado. Al respecto, Acuña *et al.* (2013) en una investigación con camarones mexicanos, encontró una clara separación entre las especies con desarrollo larval extendido y las de desarrollo larval abreviado; por lo que se considera que el árbol obtenido por Pileggi *et al.* (2014) merece una nueva revisión.

Con respecto al tiempo de divergencia, ha sido generalizado considerar el cierre del istmo de Panamá como la barrera ecológica cuyo cierre ocurrido en la mitad del Plioceno, hace aproximadamente 3.5 Ma (Coates y Stallard, 2013; Coates *et al.*, 1992) es usado como el evento geológico para inferir tasas de divergencia nucleotídica en secuencias de ADN, de especies consideradas transistmisanas, siempre y cuando la divergencia encontrada sea posterior a la antigüedad del cierre completo, generalmente aceptado.

En tal sentido, los tiempos de divergencia encontrados en el presente estudio con secuencias parciales del gen *16S*, se considerarían sólo transistmisanos para el par *M. digueti* – *M. olfersii*, cuyo tiempo de divergencia calculado es de 2.33 a 1.81 (Tabla 18), mientras que para los pares *M. americanum* – *M. carcinus* y *M. panamense* – *M. amazonicum*, la divergencia o separación como especies (por encima de 4 Ma) fue anterior al cierre del corredor marino propuesto,

coincidiendo con lo encontrado por Pilegui *et al.* (2014) para el par *M. americanum* – *M. carcinus*, proponiendo una especiación por simpatría, al aceptar estos autores, que el efecto del istmo de Panamá en la especiación fue al cierre del corredor marino y que el hecho ocurrió aproximadamente hace 3.5 Ma. Así mismo Deepak y Harikrishnan (2018) encontraron un tiempo de divergencia con *COI* de 4.81 Ma para el par *M. americanum* – *M. carcinus*, cercano a nuestro dato, de 5.1 Ma (Tabla 23).

Debe considerarse, sin embargo, que si bien el cierre del istmo de Panamá, fue la culminación de un extenso proceso geológico, cuyo desarrollo en el Mioceno tardío hace 7-6 Ma permitió inicialmente la formación de numerosas cuencas interconectadas como un extenso archipiélago, posteriormente reducido a un istmo discontinuo con dos o tres corredores marinos, proponiéndose que el cierre completo ocurrió en la mitad del Plioceno alrededor de 3.5 Ma; es también claro que la aparición del istmo se convirtió en una barrera ecológica mucho más temprano (Coates y Obando, 1996; Knolwton *et al.*, 1993). Esta propuesta ha sido aparentemente confirmada para los langostinos del género *Alpheus* y sugerido por fósiles de foraminíferos (Knolwton *et al.*, 1993). Por ello, es probable que los efectos causados por la aparición del istmo fueron diferentes para diferentes taxas, de acuerdo con sus características ecológicas e historia de vida (Coates y Obando, 1996).

Por su parte, Beu (2001), considera que las extinciones asociadas con el cierre del istmo, pudieron ocurrir de una manera gradual y no de forma abrupta, iniciándose hace más de 10 Ma; por lo que la especiación de *M. panamense* – *M. amazonicum* y *M. americanus* – *M. carcinus* con tiempos de divergencia como los encontrados en el presente estudio, mayores a los considerados para la propuesta general del cierre del istmo, si se consideran que habrían sido

afectados por los acontecimientos ocurridos durante el desarrollo, si bien no, por el cierre mismo del istmo.

Además de lo mencionado, una nueva propuesta sobre la antigüedad del istmo de Panamá ha sido considerada recientemente por Montes *et al.* (2015), quienes basándose en geocronología de plomo de uranio en zircones detritales en el norte de los Andes, correlacionado el momento de este cierre con los eventos globales oceanográficos, atmosféricos y bióticos de Plio-Pleistoceno, proponen un istmo con un inicio de formación tan antiguo como en el Eoceno. A través de estos hallazgos demuestran una conexión fluvial entre ambos continentes y por lo tanto la ausencia de una intervención del corredor marino, entre el arco de Panamá y América del Sur en la época del Mioceno medio; es decir el corredor marino de Centroamérica ya había desaparecido en ese momento.

Por la misma ruta, Bacon *et al.* (2013) estudiando la ruta de dispersión de palmeras de los géneros *Copernicia* y *Pritchardia*, de Norte a Sud América y en una revisión del modelo de evolución del istmo de Panamá, no concuerdan con Montes *et al.* (2015) de un istmo del Eoceno, sino que manifiestan que sus inferencias y análisis son consistentes con una evolución entre el Oligoceno temprano al Mioceno temprano. Bacon *et al.* (2015) en base a análisis moleculares y de fósiles, demuestran ondas de dispersión de organismos terrestres de entre 20 a 6 Ma, y eventos correspondientes de separación de organismos marinos de 23 a 7 Ma, por lo que el cierre del istmo sería entre 10 y 6 Ma; es decir, un evento más antiguo que el propuesto en los 70s. Así mismo, basado en estos hallazgos, Bacon *et al.* (2016) sostienen que el tiempo del Gran Intercambio Americano, no es coincidente al cierre del istmo, sino en respuesta a un período de glaciación en el hemisferio Norte, por lo que la edad de los

fósiles encontrados y con los cuales se asociaba el cierre del istmo de Panamá no son congruentes.

O'Dea *et al.* (2016) en una revisión minuciosa de las pruebas presentadas por Bacon *et al.* (2015) para la propuesta de un istmo antiguo, concluyen que la evidencia para esta aseveración no es concluyente, por lo que toman con precaución una aceptación no crítica e incondicional del cierre del istmo de Panamá antes del Plioceno, remarcando su posición en los datos de registros fósiles de grandes mamíferos, aunque estos datos soporten pocas migraciones a través del istmo, antes del Plioceno tardío (Bacon *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre la filogenia de los camarones *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano, estarían validando con el gen *16S* que *M. americanum* – *M. carcinus*; *M. digueti* - *M. olfersi* y *M. panamense* - *M. amazonicum*, son especies gemelas, lo que demuestra la importancia de los eventos alopátricos vicariantes en la historia evolucionaria de las especies de *Macrobrachium* en esta parte del continente.

Así mismo, ante los nuevos y discrepantes modelos propuestos sobre la formación y tiempo del cierre del istmo de Panamá mencionadas en los párrafos anteriores, se concuerda en el presente estudio, con lo manifestado por Coates y Obando (1996); Knolwton *et al.* (1993) de que la aparición del istmo se convirtió en una barrera ecológica muy temprano y lo propuesto por Beu (2001) de que las extinciones asociadas con el cierre del istmo de Panamá, pudieron ocurrir de una manera gradual y no de forma abrupta. En tal sentido se concluye que las especies gemelas *M. americanum* – *M. carcinus*; *M. digueti* - *M. olfersi* y *M. panamense* - *M. amazonicum*, son consecuencia de la emergencia y cierre del

istmo de Panamá, soportando además nuestros resultados el modelo de un istmo más antiguo.

Con respecto a las secuencias del gen *COI*, en el presente trabajo, sólo ha sido posible confirmar la relación de gemelaridad para el par *M. americanum* - *M. carcinus*, que presentó un tiempo de divergencia en base a la distancia genética, de 5.16 Ma. No hubo amplificación positiva para *M. panamense*, y las dos secuencias obtenidas de *M. digueti*, mostraron una delección de 32pb, no habiéndose podido encontrar la correcta posición del codón de inicio, por lo que se presume que las secuencias obtenidas son pseudogenes (Schubart, 2009; Gislasoni *et al.*, 2013).

Finalmente, si bien no es motivo de objetivos en el presente estudio, se menciona también que se encontró una clara separación de *Macrobrachium* con los otros géneros considerados como grupos externos: *Palaemon hancockii* y *Cryphiops caementarius* (Fig. 14), a diferencia de lo encontrado por Pileggi y Mantelatto (2010), quienes reportan que *C. caementarius* se encontró posicionado entre las especies de *Macrobrachium*, iniciando con esta conclusión, una fuerte corriente a considerar a *C. caementarius* como integrante del género *Macrobrachium*.

2.8 CONCLUSIONES

El muestreo realizado en el presente estudio permitió identificar seis morfoespecies del género *Macrobrachium* en los ríos del Pacífico peruano: *M. inca*, Holthuis 1950; *M. gallus* Holthuis 1952; *M. transandicum* Holthuis 1950; *M. digueti* Bouvier, 1895; *M. panamense* Rathbun 1912 y *M. americanum* Bate 1868; no se encontró según la logística empleada, especímenes de *M. tenellum* y *M. hancockii*, registradas también para nuestro país.

Los resultados moleculares expresados en las distancias genéticas y en la topología de los árboles obtenidos con las secuencias parciales de los genes *COI*, *16S* y *28S*, confirman el estatus taxonómico o categoría de especie de *M. americanum*, *M. inca*, *M. gallus*, *M. panamense* y *M. digueti* como especies válidas a partir de análisis de individuos muestreados en ríos que desembocan en el Pacífico peruano. Sin embargo, la especie identificada morfológicamente como *M. transandicum*, presentó secuencias similares a *M. digueti*, con distancias genéticas interespecíficas muy cercanas a cero, así como la organización de las secuencias en la misma rama del árbol; por lo que, que esta especie pre - identificada morfológicamente como *M. transandicum*, representarían la misma entidad o linaje a nivel de especie, proponiéndose que *M. transandicum* sea también incluida al complejo *olfersii*.

Por otro lado, se confirma al gen *COI*, seguido del gen *28S*, como los mejores candidatos para identificar especies molecularmente y, por lo tanto, para el establecimiento de relaciones filogenéticas más resolutivas. Así mismo, las secuencias del gen *28S*, fueron determinantes para resolver la posición de *M. panamense* como entidad taxonómica.

La hipótesis de que *M. inca* y *M. gallus* están relacionadas con *M. americanum* y *M. panamense*, respectivamente, está soportada sólo por las secuencias del gen *28S*,

ya que el árbol construido con las secuencias de este gen con IB, agrupa en clados hermanos a *M. inca* – *M. americanum* (rostro mediano, y segundo par de periópodos de tamaño diferente), y a *M. gallus* – *M. panamense* (rostro alargado y segundo par de periópodos largos y delgados); mientras que con las secuencias de COI, esta condición se encuentra sólo para *M. inca* – *M. americanum*.

Si es importante resaltar lo que sugiere el Timetree, que *M. gallus* tendría el mismo antecesor que el grupo *M. panamense* – *M. amazonicum*, destacando las características comunes a las tres especies: rostrum largo y quelas largas y delgadas. La divergencia de *M. inca*, con las especies con las que comparte características morfológicas (rostro pequeño y quelas robustas y dimórficas) si es más ancestral.

Los dos métodos de reconstrucción filogenética: Máxima Parsimonia (MP) e Inferencia Bayesiana (BI) presentaron topologías parecidas y fueron altamente congruentes en genes *COI*, *16S* y *28S*, mostrando que las especies *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano forman un grupo monofilético.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre la filogenia de los camarones *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano, con secuencias parciales del gen *16S* validan la hipótesis de que *M. americanum* – *M. carcinus*; *M. digueti* - *M. olfersii* y *M. panamense* - *M. amazonicum*, son especies gemelas, lo que comprueba la importancia de los eventos alopátricos vicariantes en la historia evolucionaria de las especies de *Macrobrachium*.

Ante la discrepancia actual relacionada con el tiempo del cierre del istmo de Panamá, se concuerda en el presente estudio, de que el istmo de Panamá a lo largo de su formación fue causando especiación por vicarianza de manera gradual en las especies del género *Macrobrachium* que se encuentran en los ríos de ambas vertientes de Centro y Suramérica.

3.0 CAPÍTULO II

ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *MACROBRACHIUM INCA* Y *MACROBRACHIUM GALLUS*, BASADA EN LAS SECUENCIAS PARCIALES DE LOS GENES CITOCROMO OXIDASA I (*COI*) Y *16SRDNA (16S)*

En la revisión general de los Palaemonide de las Américas que hizo Holthuis en 1952, no sólo hizo referencia a la cercana relación entre especies de la vertiente del Pacífico y la del Atlántico, cuyos resultados para muestras de camarones *Macrobrachium* de los ríos del Pacífico peruano, ya fueron analizados en el Capítulo I, sino que también refirió que sólo dos especies conocidas para el lado oeste de América - *M. inca* y *M. gallus* - no son directamente comparables con formas del Este, proponiendo un origen más reciente para estas dos especies.

El rango de distribución de *M. inca* y *M. gallus* es relativamente pequeño, comparándolo con el de las otras especies de *Macrobrachium* que también habitan nuestros ríos, pero que según la prospección antigua de Amaya y Guerra (1976) muestran mayor rango de distribución en territorio peruano, llegando hasta el río Huaura, en el departamento de Lima, sugiriendo los autores un posible proceso de expansión. Esa simpatría entre las dos especies en el mismo rango de distribución, podrá proporcionar una réplica para inferir eventos históricos comunes actuando en esa región de distribución, usando para ello múltiples marcadores genéticos que permiten replicar muestras de la historia demográfica de las especies en particular (Eytan, 2010).

El rango de distribución de estos camarones considerados endémicos, no es reconocido por información un tanto reciente, como el caso de Anger (2013) que reporta que la distribución de *Macrobrachium* en las costas peruanas, sólo se

circunscriben hasta el departamento de Piura, señalando que su prácticamente ausencia a lo largo de las costas de Perú y Chile, son congruentes con zonas áridas y ausencia de aportes de cursos de agua dulce; además de la ausencia de corrientes de aguas cálidas (Fig. 20).

La historia del ciclo de vida de *M. inca* y *M. gallus* como la de todas las especies de camarones que habitan las costas cercanas al mar, las define como anfídromas, con extendidos períodos larvales marinos, cuya mayor ventaja es la dispersión hacia regiones adyacentes y algunas veces distantes corrientes y ríos, o masas de tierra muy distantes (Bauer, 2011). Llama la atención lo manifestado por Anger (2013) sobre *M. gallus*, al mencionar lo escrito por Holthuis (1952), que al no haberse hallado hembras ovígeras es incierto el modo de reproducción de esta especie. Sin embargo, Tagle (1981) realizó trabajos de desarrollo larval de esta especie llegando a determinar 10 estadios larvales, aunque sin completar el desarrollo larvario y Gómez *et al.* (1991) lograron obtener juveniles de *M. gallus* en laboratorio a partir de hembras ovígeras obtenidas del medio natural.

Por otro lado, un reciente estudio realizado sobre langostinos del género *Macrobrachium* por García *et al.* (2013), no incluye a *M. inca* y *M. gallus*, lo que indica un total desconocimiento de las especies que son nativas y/o con mayor distribución en los ríos peruanos. Puede observarse que esta distribución compromete sólo 8° de latitud: de 3° a 11° LS (Tabla 1), por ello, teniendo en cuenta el papel dispersor de los estadios larvales y observando además en la Fig. 4, la cercanía de muchos de los ríos de la costa norte del Perú es posible inferir que estas dos especies presentan una única población, es decir no habría subestructuras poblacionales, lo que implicaría una baja a moderada diversidad genética, sin asociación con la distribución geográfica.



Fig. 19: Distribución biogeográfica de *Macrobrachium* en las costas de América (tomado de Anger, 2013). Nótese que la Corriente Peruana ha sido desviada en su recorrido a la altura de Ica, cuando realmente ésta continúa hasta Piura, encontrándose en una zona de congruencia con la Corriente El Niño, de aguas cálidas

Por otro lado, un reciente estudio realizado sobre langostinos del género *Macrobrachium* por García *et al.* (2013), no incluye a *M. inca* y *M. gallus*, lo que indica un total desconocimiento de las especies que son nativas y/o con mayor distribución en los ríos peruanos. Puede observarse que esta distribución compromete sólo 8° de latitud: de 3° a 11° LS (Tabla 1), por ello, teniendo en cuenta el papel dispersor de los estadios larvales y observando además en la Fig. 4, la cercanía de muchos de los ríos de la costa norte del Perú es posible inferir que estas dos especies presentan una única población, es decir no habría subestructuras poblacionales, lo que implicaría una baja a moderada diversidad genética, sin asociación con la distribución geográfica.

Según el estudio realizado por Amaya y Guerra (1976), *M. inca* estuvo presente en casi todos los ríos muestreados (desde Tumbes hasta el río Pativilca), en tanto que si bien según los autores mencionados, *M. gallus* también tuvo la misma distribución que *M. inca*, el mayor número de individuos se registró en los ríos de Tumbes, dando la población la apariencia de estar en proceso de expansión hacia el sur. Además de ello, se tiene el trabajo realizado por Dávila *et al.* (2013) sobre crecimiento y sobrevivencia de postlarvas de *M. inca* alimentadas con ensilado biológico; el de Acosta (2015), sobre crecimiento de *M. inca*, alimentado con dietas comerciales para langostinos, el de Ruiz (2016) sobre diversidad de crustáceos en la cuenca baja del río Moche; el de Cerdán y Sánchez (2014) sobre crecimiento de *M. inca* en policultivo con tilapia; y otros estudios mencionados en el Capítulo I.

3.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Teniendo en cuenta entonces que *M. inca* y *M. gallus* son especies con relativo pequeño rango de distribución, a las que no se les ha estudiado su diversidad poblacional usando marcadores moleculares, se formula el siguiente planteamiento:

Problema de Investigación

¿Cuál es la estructura de las poblaciones de *M. inca* y *M. gallus* en los ríos del Pacífico peruano?

Hipótesis de Investigación

M. inca y *M. gallus* de manera independientemente, son especies que presentan una única población, con baja o moderada diversidad genética, sin asociación con la distribución geográfica y que se encuentra en expansión.

3.2 MARCO TEÓRICO

3.2.1 BASES TEÓRICAS

3.2.1.1 Antecedentes de la investigación

3.2.1.1.1 El uso de Marcadores Mitocondriales en Estructura de Poblaciones

Existen una serie de artículos relacionados con el uso de marcadores mitocondriales en estructura de poblaciones de camarones palaemónidos en el amplio rango de su distribución (de Bruyn *et al.*, 2004; Crandall *et al.*, 1999; Schubart *et al.*, 2000; Munashinge *et al.*, 2003; Page *et al.*, 2008; Pilegui y Mantelatto, 2010, etc.) El uso de esos marcadores moleculares obedece básicamente al hecho de que el mADN presenta un extenso polimorfismo y alta tasa mutacional, con una tasa evolutiva de hasta 10 veces el ADN nuclear (Brown *et al.*, 1982)

3.2.1.1.2 Población

Según Amaya y Guerra (1976), las especies de *Macrobrachium* que más abundaron en los ríos de la vertiente del Pacífico peruano fueron *M. gallus* y *M. inca*, presentando el primero, 1022 individuos en 39 muestras (coeficiente de abundancia relativa de 26), mientras que de *M. inca* se obtuvieron 1693 individuos en 76 muestras (coeficiente de abundancia relativa 22). Por su parte, Ruiz (2016) en el estudio sobre diversidad realizado en la cuenca baja del río Moche, en cuatro estaciones de muestreo, si bien fue el crustáceo de mayor abundancia, presenta de todas maneras una baja abundancia numérica.

3.2.2 Marco Teórico o Teoría Sustantiva

3.2.2.1 Filogeografía es un término introducido por Avise en 1987 en *Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics* y se define en sentido estricto, como el análisis espacial de los linajes génicos (Avise, 2009) que se aplica a niveles infraespecíficos o de especies cercanamente emparentadas. Surgió en virtud del progreso que han tenido dos aspectos de la biología evolutiva moderna: uno tecnológico, gracias al cual se comenzó a disponer de datos de variabilidad intraespecífica en la forma de secuencias de ADN, y otro conceptual o teórico, que implicó la aplicación de la teoría de la coalescencia al estudio de procesos microevolutivos.

Dado que enfatiza los aspectos históricos de la actual distribución de los linajes génicos, la filogeografía, puede considerarse como una subdisciplina de la biogeografía histórica, que integra conceptos y técnicas de genética molecular, genética de poblaciones, demografía, sistemática filogenética, etología y paleontología (Avise *et al.*, 1994; Bermingham y Martin, 1998). Dos campos de estudio tradicionalmente separados tanto en sus enfoques teóricos como metodológicos, como son la genética de poblaciones y la sistemática, han encontrado puntos de coincidencia en el enfoque filogeográfico (Avise *et al.*, 1987); al comparar las relaciones evolutivas de líneas genéticas con sus locaciones geográficas, se puede conseguir un mejor entendimiento de qué factores han sido los que más han influenciado en la distribución de la variación genética (Freeland, 2005).

Un requisito fundamental para poder establecer genealogías génicas es el uso de marcadores genéticos o secuencias de ADN que no recombinen. Si se

trabaja con muestras de genes nucleares provenientes de individuos entre los cuales existe o existió alguna vez flujo génico, es altamente probable que haya habido recombinación genética durante el apareamiento de cromosomas homólogos en la meiosis, llegando a desvirtuar profundamente las verdaderas genealogías de las secuencias, por lo que, en la mayoría de los trabajos de filogeografía se utilizan marcadores de herencia citoplasmática no mendeliana, como el ADN de las mitocondrias (ADNmt) y de los cloroplastos (ADNcp), o marcadores nucleares en donde se haya constatado que existe poca o ninguna recombinación genética (Bermingham y Martin, 1998; Avise, 2009).

3.2.2.2 Diversidad Genética

La diversidad genética que es uno de los más importantes atributos de una población, se define como la cantidad de variación genética medible que está contenida dentro de una población o especie (Freeland, 2005) y es una de las características más importantes en cualquier estudio de genética de poblaciones, siendo esencial para su adaptación a cambios en el medio ambiente, sobrevivencia a largo plazo y evolución (Nei y Kumar, 2000).

La diversidad genética está influenciada por una serie de factores que varían considerablemente entre poblaciones: deriva génica, cuellos de botella, selección natural y métodos de reproducción (Freeland, 2005).

La diversidad genética también puede ser descrita por dos estimadores: π (π) y θ (teta). π está referida a la diversidad nucleotídica, es decir el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar. θ es calculado de manera indirecta considerando el número de sitios segregantes en las secuencias estudiadas. Del análisis de los dos estimadores se deduce

que π se ve afectada por la frecuencia del alelo más común y es independiente del tamaño de la muestra, y θ se ve afectada por el tamaño de la muestra y por los alelos poco frecuentes (Eguiarte *et al.*, 2007).

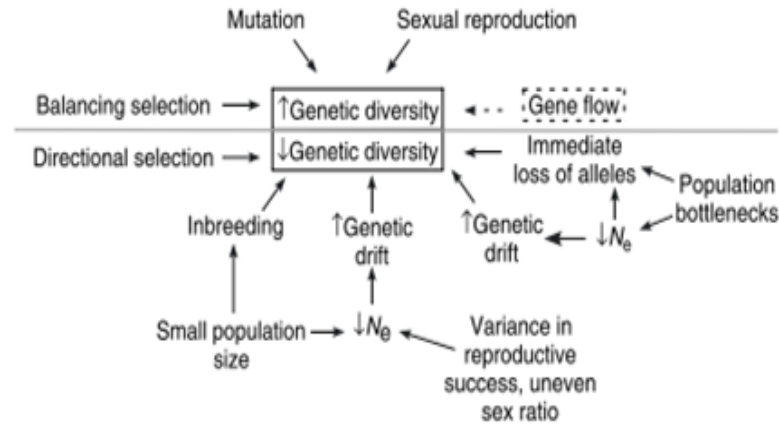


Figura 20: Principales factores que influyen los niveles de variabilidad genética dentro de una población. Tomado de Freeland (2005)

3.2.2.3 Estructura Poblacional

Un principal desafío en el análisis genético de un set de datos es explorar si los datos provienen de una población homogénea o provienen de una población con subgrupos que son genéticamente diferentes. El entendimiento de la estructura genética de una población, que se vuelve importante para el investigador, es el descubrimiento de la historia demográfica de la población en estudio (Sloan *et al.*, 2009; Patterson *et al.*, 2006).

La estructura genética entre las poblaciones está constituida por las diferencias en las frecuencias alélicas, de tal modo que cuando se habla de que una especie tiene alta estructura genética, se refiere a que se pueden detectar fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones. En contraste, en una especie con baja estructura genética, las

subpoblaciones que la constituyen son casi idénticas, con nulas o muy pocas diferencias en las frecuencias alélicas (Eguiarte *et al.*, 2010).

El análisis de la estructura asume que cada población es caracterizada por un set específico de frecuencias alélicas para un grupo de *loci* analizados, siendo posteriormente los individuos asignados probabilísticamente a una o varias poblaciones dependiendo de los datos obtenidos a partir de su genotipo (Pritchard *et al.*, 2000).

Entender las causas de la estructura genética, es decir, las diferencias en las frecuencias alélicas, es la principal labor de la genética de poblaciones experimental. En términos generales, si las poblaciones de una especie tienen una alta estructura genética, indica que los tamaños de las poblaciones han sido pequeños (es decir que ha habido intensa deriva génica) y/o que ha existido poco flujo génico (migración) entre estas poblaciones por mucho tiempo. La selección natural también puede causar las diferencias, pero sólo en los genes relacionados con las adaptaciones o en genes muy ligados a ellos (Eguiarte *et al.*, 2013; Bohonak, 1999).

Existen varios métodos para estimar la diferenciación y estructura genética poblacional, siendo los métodos más sencillos los que simplemente comparan estadísticamente las diferencias en las frecuencias alélicas. Otros métodos se basan en estimar la proporción de variación genética que se encuentran dentro y entre las poblaciones, usualmente empleando el estadístico F_{ST} de Wright o sus análogos (Eguiarte *et al.*, 2010). Respecto al marcador, el ADNm es un marcador particularmente útil para estudios filogeográficos o de estructura de poblaciones, por su alta tasa mutacional que generalmente involucra sustituciones nucleotídicas.

Métodos recientes en genética de poblaciones, pueden proporcionar información precisa del pasado demográfico de una población, necesario para interpretar correctamente el desequilibrio de ligamiento, reconocer regiones del genoma que están bajo selección, o ayudar a desarrollar buenas estrategias de conservación. Estos métodos están implementados en programas que han crecido grandemente en pocos años y muchos de ellos están basados en estimaciones bayesianas o de máxima verosimilitud que utilizan métodos de Cadenas de Markov – Monte Carlo (Excoffier y Heckel, 2006).

3.2.3 Definición de palabras claves

Haplotipo: Combinación específica o única de marcadores genéticos presentes en un cromosoma, sea nuclear o mitocondrial (Hartl y Clark, 1997). Los haplotipos o variantes del ADNm, registran la historia matrilineal de eventos mutacionales, y pueden conectarse filogenéticamente en un filograma, el cual puede a su vez sobreponerse a la distribución geográfica del grupo de estudio, a fin de interpretar los procesos evolutivos responsables de la distribución actual de la especie o grupo de especies (Avice, 2009).

3.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El recurso “camarón de río” constituye el único recurso hidrobiológico de los ríos costeros peruanos que soporta una pesquería comercial, aunque ella es de tipo artesanal y centrada fundamentalmente en la extracción de *Cryphiops caementarius* en los ríos Ocoña, Majes-Camaná y Tambo, sumándose a esta especie varias otras del género *Macrobrachium*, como *M. americanum*, *M. inca* y *M. gallus*, que representan el grupo faunístico de mayor interés pesquero en los ríos de la costa del Perú (Wasiw y Yépez, 2017).

Esta pesquería, realizada desde las civilizaciones pre hispánicas, ha mostrado de manera significativa, especialmente en las dos últimas décadas, un descenso en sus volúmenes de captura respecto a sus máximos históricos; lo cual ha devenido en un problema socio económico en las zonas donde su ejecución es económicamente importante (Wasiw y Yépez, 2017), debido básicamente al amplio uso del agua de los ríos con fines agrícolas, y de generación de energía hidroeléctrica (Viacava *et al.*, 1978), así como construcción de reservorios en las cuencas de los ríos donde habita el “camarón de río”, sin considerar mitigaciones como consecuencia del desequilibrio que causa en el ecosistema, como es el caso particular de Gallito Ciego, que afectó la población de camarones en el río Jequetepeque.

Además de lo mencionado, la excesiva extracción muchas veces con métodos irracionales e ilegales de captura hace que en la actualidad el recurso “camarón de río” sea casi inexistente en los ríos peruanos de escaso o irregular caudal de la vertiente occidental de los Andes, lo que no permite que se efectúe una apropiada renovación poblacional. A nivel gubernamental, la protección se ha basado en el establecimiento de períodos de veda, basada en el estudio poblacional de *C. caementarius*.

La investigación de este capítulo permitirá evaluar por primera vez las condiciones genéticas en las que se encuentran las poblaciones de *M. inca* y *M. gallus*, luego de más de 40 años del trabajo realizado por Amaya y Guerra (1976), que puedan servir de sustento real para las Resoluciones Ministeriales que PRODUCE emite para la protección del recurso en general, las cuales como se ha manifestado línea arriba, están sustentadas en prospecciones realizadas básicamente en los ríos del sur para *Cryphiops* bajo la justificación que es donde se localiza más del 80% de las poblaciones de camarones de los ríos del Pacífico peruano.

Permitirá además conocer la variabilidad genética y estructura poblacional de *M. inca* y *M. gallus*, especies consideradas como nativas de los ríos peruanos, de importancia para planteamientos de planes de manejo y conservación.

3.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

a) Objetivo General

- Establecer la estructura genética de las poblaciones de *M. inca* y *M. gallus* de los ríos del Pacífico peruano, basada en secuencias parciales de los genes *COI* y *16S*.

b) Objetivos Específicos

- Determinar la variabilidad genética de las poblaciones de *M. inca* y *M. gallus* de los ríos del Pacífico peruano basada en secuencias parciales de los genes *COI* y *16S*.
- Determinar la estructura poblacional de las poblaciones de *M. inca* y *M. gallus* de los ríos del Pacífico peruano, basada en secuencias parciales de los genes *COI* y *16S*.
- Analizar la demografía histórica de *M. inca* y *M. gallus* de los ríos del Pacífico peruano basada en secuencias parciales de los genes *COI* y *16S*.

3.5 METODOLOGÍA

3.5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

La estructura poblacional de *M. inca* y *M. gallus* de los ríos del Pacífico peruano será resuelta a través de un diseño de investigación descriptiva, de tipo correlacional comparativa (Tresierra, 2010; Hernández *et al.*, 1998).

3.5.2 POBLACIÓN

La población está conformada por los camarones de las especies *M. inca* y *M. gallus* de los ríos del Pacífico peruano, desde Tumbes hasta Supe, y susceptibles de ser extraídos.

3.5.3 MUESTRA

La muestra consistió en 476 especímenes de *M. inca* y 114 especímenes de *M. gallus* tomados entre octubre del 2013 y junio del 2016, obtenidos en 14 ríos y una quebrada, desde Tumbes hasta Supe.

Si bien el cálculo de especímenes necesarios que confirme un poder del 2%, para detectar una diferencia de 0,0500 entre las diferentes poblaciones, con un nivel de significancia de 0.05, determina que de cada especie debe de obtenerse un mínimo de diez especímenes, se procuró contar con en lo posible al menos 30 individuos por cada especie. La posición geográfica de los lugares donde se obtuvieron los especímenes, y el número de individuos colectados por fecha de muestreo para el estudio de la estructura genética de las poblaciones de estas dos especies, se presentan en la Tabla 24 (Anexo 01).

3.5.4 Tabla 24: Operacionalización de Variables

Variables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Operacionalización de Variables			
			Indicador	Valores Finales	Tipo de variable	Fuente
La estructura genética poblacional de las especies <i>M. inca</i> y <i>M. gallus</i> de los ríos del Pacífico peruano						
Variabilidad genética de las poblaciones de las especies <i>M. inca</i> y <i>M. gallus</i> de los ríos del Pacífico peruano	Es uno de los más importantes atributos de una población y se define como la cantidad de variación genética medible que está contenida dentro de una población o especie	Determinación del número de haplotipos en cada población (río) muestreada	Haplotipos comunes y haplotipos únicos Red de haplotipos Diversidad nucleotídica	Número de haplotipos Porcentaje de cada haplotipo Índice de diversidad nucleotídica	Numérica Gráfica Numérica	ADN de músculo de pleópodo
Estructura poblacional de las poblaciones de <i>M. inca</i> y <i>M. gallus</i> de los ríos del Pacífico peruano a través de los genes mitocondriales citocromo oxidasa I (COI) y 16S.	La estructura genética entre las poblaciones está constituida por las diferencias en las frecuencias alélicas, de tal modo que cuando se habla de que una especie tiene alta estructura genética, se refiere a que se pueden detectar fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones	Árbol filogenético Determinación del AMOVA Distancias genéticas intra e interpoblacional	Variación intragrupo o intergrupo con un nivel de significancia	AMOVA positivo y $p < 0,05$	Gráfica Numérica	ADN de músculo de pleópodo
Tiempo de inicio de expansión Número efectivo de hembras Patrones históricos demográficos	El tamaño efectivo, cuya definición exacta no existe, es un parámetro que está asociado al tamaño poblacional, relevante en términos evolutivos, por ser éstos los que contribuyen a la siguiente generación en términos demográficos y genéticos (Moreno, 2007)	Determinación del tiempo de expansión, test de neutralidad, prueba de distribución mismatch	Valores de <i>tau</i> Valores de Tajima y Fu'S Distribución mismatch uni o polimodal	Valores de Tajima y Fu'S negativos Mismatch unimodal	Numérica Gráfica	ADN de músculo de pleópodo

3.5.5 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS DE LA INVESTIGACIÓN

3.5.5.1 Fuente de Secuencias de ADN: Colección de especies

Aproximadamente 30 especímenes frescos de *M. gallus* y *M. inca* fueron colectados/río, haciendo uso de atarraya de 1 mm de abertura de malla, calcales de mano o por tamizado de vegetación marginal y sobre fondos rocosos del cauce y estuario de los ríos Tumbes, Zarumilla, Chira, Zaña, Chicama, Moche, Virú, Chao, Santa, Lacramarca, Nepeña (Huambacho), Pativilca, Fortaleza, Supe y de la Quebrada Juana Ríos (Chongoyape). Se obtuvieron ejemplares de *Palaemon hancockii* para ser utilizados como grupo externo.

Una vez obtenidos, los ejemplares fueron preservados inmediatamente en alcohol de 96°, rotulados según río y fecha de muestreo y transportados al laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción de la Universidad Nacional del Santa, para su identificación, cambio de alcohol y rotulación permanente.

Los especímenes fueron identificados morfológicamente de manera individual, siguiendo la clave propuesta por Méndez (1981), etiquetados con una clave relacionada a: río, especie y número, y almacenados en la matriz respectiva.

3.5.5.2 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

De cada uno de los especímenes preservados, se extrajo el ADN genómico total a partir de tejido muscular de los pleópodos, usando el kit comercial de extracción de ADN Genomic DNA Purification de Thermo Scientific.

En un equipo marca Epoch spectrophotometer (Bioteck instrument, Singapore) se midió la cantidad de ADN en ng.mL^{-1} por espectrofotometría, así como el ratio 260/280 para verificar la calidad del extracto. La calidad también se observó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (80V y 125 de intensidad de corriente), usando Gelred como intercalante.

Se usaron los genes *16S* y *COI* como marcadores, con los siguientes primers:

Tabla 25: Secuencias de primers utilizados en estructura poblacional de *M. inca* y *M. gallus* de los ríos del Pacífico peruano

Gen	Primer	Secuencia (5' -- 3')	Referencia Bibliográfica
<i>COI</i>	Col6bF	ACAAATCATAAAGATATYGG	Schubart y Heber (2006)
	COH6R	TADACTTCDGGRTGDCCAAARAAYCA	
<i>16S</i>	1471	CCT GTT TAN CAA AAA CAT	Munashinge (2010); Lui <i>et al.</i> (2007)
	1472	AGA TAG AAA CCA ACC TGG	

Las condiciones que se utilizaron para la PCR fueron:

- **Para *COI*:** Una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 45 segundos (desnaturalización), 42° por 1 minuto (hibridación o *annealing*), 72°C por 1 minuto (extensión) y una extensión final por 6 minutos a 72°C.
- **Para *16S*:** Una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 30 ciclos a 95°C por 1 minuto (desnaturalización), 40° por 1 minuto (hibridación o *annealing*), 72°C por 1 minuto (extensión) y una extensión final por 10 minutos a 72°C.

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Veriti 96 Well thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y para la preparación del master mix para todos los marcadores analizados se utilizó el kit Maximo *Taq* DNA Polymerase (GeneOn GmbH, Nurnberg, Germany)

con los siguientes volúmenes y concentraciones: 0.76 μL de 25 mM MgCl_2 , 1.0 μL de 10X buffer, 0.5 μL de 2.5 mM dNTPs, 0.1 μL de cada primer a 50 μM , 0.1 μL de 5U. μL^{-1} de *Taq* polimerasa, 1 μL ADN y el resto de agua PCR para un volumen final de 10 μL .

Para todos los casos, el producto obtenido se visualizó en geles de agarosa al 1%, con un marcador de 1000 pb., usando Gelred como intercalante. El exceso de nucleótidos y primers se eliminó usando las enzimas exonucleasa I y fosfatasa alcalina de langostinos, siguiendo el protocolo establecido por Werle *et al.* (1994) y posteriormente las amplificaciones fueron enviadas a Macrogen Inc (Rockville, MD) para una secuenciación Sanger, en un analizador genético ABI 3730Cl (Applied Biosystems, Foster City, CA), para secuenciación de la hebra forward.

3.5.5.3 TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

3.5.5.3.1 Análisis de Secuencias:

Las secuencias parciales obtenidas de los genes *COI* y *16S* para *M. inca* y *M. gallus* fueron revisadas y editadas manualmente para escoger los cromatogramas con el menor ruido posible, corrigiendo algún error de secuenciación. Las secuencias editadas se alinearon con *Clustal W 2.2* implementada en MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016), construyéndose de este modo una matriz de secuencias o datos, debidamente alineados.

Las secuencias de *COI* no tuvieron *gaps* o *indels* cuando fueron alineadas, a diferencia de *16S* para *M. gallus*, que presentaron abundantes *gaps*. En todos los casos, las secuencias ambiguas fueron removidas.

Las estadísticas básicas de las secuencias tales como composición nucleotídica, sitios conservados, sitios variantes, sitios parsimoniosamente informativos, proporción de transiciones y transversiones, singletons y composición de aminoácidos, se determinaron usando el programa MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016), teniendo en cuenta la posición 1, 2 y 3 del codón de inicio para el gen *COI* debido a que es un gen codante. Para ello, se tomó la secuencia de aminoácidos de *M. rosenbergii* del Genbank (AY659990.1) como secuencia de referencia para determinar la correcta posición del codón de inicio.

Con el mismo programa se evaluó a través del mantenimiento del marco de lectura ubicando el primer codón y la correspondiente traducción al lenguaje usado, la posibilidad de haberse amplificado un pseudogen, por aparición de codones *stop* pre-maturos.

Se valoró también el grado de saturación de las sustituciones de las secuencias del *COI* como marcador codante, por análisis de la distribución de los sitios variables y el grado de variabilidad genética por sitio a lo largo de las matrices de secuencias de ambos genes mediante un análisis de entropía en el programa DAMBE 6 (Xia y Lemey, 2009).

3.5.5.3.2 Análisis de Haplotipos

Con el programa DnaSP 5.10.01 (Rozas *et al.*, 2003) se calculó de cada río muestreado: el número de haplotipos (h), la diversidad de haplotipos (H_d), el número de sitios segregantes o variantes (S) y el índice de diversidad nucleotídica (π); con los que se generó una matriz de haplotipos y frecuencias para cada gen y para ambas especies. Con esta matriz fue posible la fácil

identificación de los haplotipos más comunes (1°, 2°, 3° y 4° más común), los haplotipos únicos y los haplotipos compartidos (entre dos o tres poblaciones).

Con la matriz generada y usando el programa NETWORK 5.0.0.1, mediante el empleo del algoritmo *Median Joining Network* (Bandelt *et al.*, 1999), se realizó el análisis de las redes filogeográficas, construyendo una red de relaciones entre los haplotipos, Network, para conectar las poblaciones. Para el caso específico de *COI* y *16S* para *M. inca*, se trabajó con un límite de conexión fijado en 70, lo que, si bien reduce la confianza del network resultante, el principal propósito además de visualizar la tendencia de la distribución es visualizar el número de mutaciones presentadas entre poblaciones. Así mismo, los diferentes haplotipos fueron analizados con la fecha en la que se hizo la obtención de los especímenes, para encontrar alguna relación geo-temporal.

3.5.5.3.3 Análisis de Distancias Genéticas

La distribución de frecuencias de las diferencias pareadas entre secuencias se determinó con el programa MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016), utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2-P, que considera las diferencias en las tasas de sustitución entre transiciones y transversiones e incluyendo en el análisis secuencias parciales de *P. hancokii* como grupo externo.

Se calcularon las distancias genéticas intrapoblacionales y las distancias pareadas interpoblacionales, evaluándose la distancia genética expresada en porcentaje de divergencia genética, siendo la población la unidad de análisis.

3.5.5.3.4 Reconstrucción Demográfica

Se usaron los genes *COI* y *16S* para inferir los patrones de historia demográfica de *M. inca* y *M. gallus*. Con el programa DnaSP 5.10.01 (Rozas *et al.*, 2003) se calculó el test de neutralidad basado en la distribución de sitios segregantes: Tajima's D (Tajima, 1989) y en la distribución de haplotipos: F_s de $Fu'S$ (Fu, 1997), para determinar si las mutaciones eran selectivamente neutrales y si se ajustaban o no a un modelo de expansión poblacional.

Así mismo, para investigar la posibilidad de crecimiento poblacional se utilizó la prueba de distribución *mismatch* con el programa bioinformático Dnasp 5.10.01 (Rozas *et al.*, 2003) y ARLEQUIN v. 3.5.2.2 (Excoffier *et al.*, 2006) para obtener los parámetros demográficos: teta inicial (θ_i) y teta final (θ_f). Valores de τ por cada población muestreada se usó para estimar el tiempo (T) de expansión de ambas especies en los ríos del Pacífico peruano, con la ecuación: Rogers y Harpending (1992).

Cálculo del tiempo transcurrido desde que se dio expansión:

$$T = \tau/2 \text{ u generaciones}$$

Donde:

$$u = 2 \mu k$$

μ = tasa de mutación por nucleótido

k = número de nucleótidos de la secuencia

- Se asumió una generación de un año, como tiempo necesario para que las especies alcancen su primera madurez sexual.
- Se consideró un tiempo de divergencia para *COI* de 1.4% Ma para carideos (Knolwton y Weigt, 1998).

- Se consideró un tiempo de divergencia para *16S* de 0.9% Ma (Sturmbauer *et al.*, 1996).

- El tiempo de divergencia es dos veces la tasa de mutación.

Además, se calculó el número efectivo de hembras con el que se dio inicio a la expansión:

$$N_t = \theta_i/2u$$

3.5.5.3.5 Análisis Filogenético

La filogenia de las secuencias de *M. inca* y *M. gallus* fue construida utilizando los métodos de Máxima Parsimonia (MP) e Inferencia Bayesiana (IB), de acuerdo a lo establecido en el acápite 2.5.5.4.1. Para *M. inca* se evaluó como variable la relación filogenética con el haplotipo como unidad de análisis, mientras que para *M. gallus* se trabajaron todas las secuencias parciales obtenidas.

Se concatenaron las secuencias de los genes *COI* y *16S* para *M. inca* y *M. gallus* usando el programa Sea View versión 4.5.4 (Gouy *et al.*, 2010). Con las matrices concatenadas obtenidas, se volvió a realizar el mismo procedimiento que con las matrices no concatenadas, a fin de obtener los árboles correspondientes.

3.5.5.3.6 Estructura Poblacional

Con el software ARLEQUIN v. 3.5.2.2 se calculó la divergencia haplotípica usando el índice de fijación F_{ST} (Excoffier *et al.*, 2006) el cual considera información de la frecuencia de haplotipos y distancia genética.

Con el mismo software, se hizo un análisis de varianza molecular (AMOVA) para estimar la cantidad de variabilidad genética dentro y entre las poblaciones muestreadas y testear la hipótesis de *M. inca* y *M. gallus* son especies que presentan una única población. El AMOVA calcula la proporción de variación entre grupos (CT), entre poblaciones dentro de los grupos (SC) y dentro de poblaciones (ST). Para *M. inca*, las poblaciones muestreadas se trabajaron: como una población única, de manera individual y agrupadas de la siguiente manera:

a) En dos grupos: Zarumilla, Tumbes y Chira; Zaña, Juana ríos, Chicama, Moche, Virú, Chao, Santa, Lacramarca, Nepeña, Fortaleza, Pativilca y Supe

b) En cuatro grupos: Zarumilla, Tumbes; Chira, Zaña y Juana Ríos; Chicama, Moche, Virú, Chao, Santa, Lacramarca y Nepeña; Fortaleza, Pativilca y Supe; considerando una posible cercanía geográfica.

Para *M. gallus*, el AMOVA se aplicó a los dos ríos considerados como una sola población, y luego cada río por separado.

3.6 RESULTADOS

3.6.1 Obtención de la Muestra

Entre octubre del 2013 y febrero del 2016, se obtuvieron un total de 476 especímenes de *M. inca* y 114 especímenes de *M. gallus*, además de 08 especímenes de *Palaemon hancockii*, especie considerada como grupo externo (Tabla 26).

Tabla 26: Número total de especímenes de *M. inca* y *M. gallus* obtenidos entre octubre 2013 a febrero 2016

Río/especie	<i>M. inca</i>	<i>M. gallus</i>	TOTAL
Zarumilla	27	71	98
Tumbes	20	43	64
Chira	11	0	11
Juana Ríos	19	0	19
Zaña	33	0	45
Chicama	58	0	58
Moche	33	0	33
Virú	47	0	47
Chao	42	0	42
Santa	34	0	34
Lacramarca	39	0	39
Nepeña	36	0	36
Fortaleza	12	0	12
Fortaleza	12	0	12
Supe	31	0	31
TOTAL	476	114	

En la Tabla 27 (Anexo 01) están considerados los ejemplares de cada río por fecha de muestreo.

3.6.2 Análisis Morfológicos y Distribución

Taxonómicamente, los camarones adquiridos recibieron su identidad morfológica, (Méndez, 1981). La distribución de las especies no coincide

totalmente con la reportada por Amaya y Guerra (1976) ya que hay una notable reducción en la distribución de *M. gallus*, que sólo fue encontrada en los ríos Tumbes y Zarumilla, “desapareciendo” según el presente estudio de los demás ríos costeros. Además de ello, *M. inca* ha reducido su rango de distribución, al encontrarse sólo hasta el río Supe, y no hasta el río Huaura, a pesar de haber sido este río considerado en el muestreo.

3.6.3 Alineamiento de las secuencias

Las matrices alineadas con el programa MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016) están conformadas por:

- Una matriz de 326 secuencias de 634 nucleótidos (nc), sin *indels* (*id*) para el gen *COI* de *M.inca*.
- Una matriz de 334 secuencias de 506 nc, sin *id* para el gen *16S* de *M.inca*.
- Una matriz de 40 secuencias de 616 nc, sin *id* para el gen *COI* de *M.gallus*.
- Una matriz de 37 secuencias del gen *16S* de *M.gallus*, de 502 nc, con 01 *id*.

3.6.4 Estructura Poblacional de *M. inca* basada en secuencias parciales de los genes Citocromo oxidasa I (*COI*) y *16SrDNA* (*16S*)

3.6.4.1 Estadísticas básicas de las secuencias:

En las Tablas 28 y 29 puede verse la composición nucleotídica del gen *COI* y *16S* para *M. inca*, respectivamente, donde se observa que el par AT está en mayor proporción que el par C-G y sin *indels* al alinear las secuencias en ambos genes. Así mismo, en todas las poblaciones muestreadas, las transiciones fueron más frecuentes que las transversiones, con un total de 125:27 y 44:15 de transiciones:transversiones; respectivamente. Debe notarse

un promedio de 1.8 transversiones/río, para *COI*, a diferencia de un promedio de 1.0 transversiones/río para *16S*, respectivamente.

3.6.4.2 Diversidad Genética

En la Tabla 30 se muestra que los valores de los parámetros que determinan la diversidad genética para *COI* son altos, como la diversidad haplotípica, que en todos los casos es muy cercano a 1, encontrándose el menor valor de 0.714 en el río Chira y el mayor valor de 1.00 en el río Fortaleza, en donde, cada secuencia es un haplotipo diferente. Para estas mismas poblaciones, las secuencias del gen *16S* presentan un valor menor de 0.426 en el río Chao y el mayor valor de 0.867 en el río Chira, río que, con sólo 6 secuencias, mostró 4 haplotipos (Tabla 31).

Los valores de diversidad de nucleótidos (π) en términos generales es bajo para ambos genes: para *COI*, en la población total es de 0.00576, y en cada río, el valor más bajo se presentó en el río Chira con 0.00391 y el más alto en el río Nepeña (Huambacho) con 0.0076.

Para el gen *16S* es aún más bajo, con un valor poblacional de 0.0022, y en cada río, los valores extremos se presentaron en los ríos Supe y Pativilca, con 0.0011 y 0.0031, respectivamente.

En la Tablas 28 y 29, también se observa los sitios conservados (SC), sitios polimórficos (SP), sitios parsimoniamente informativos (PI), N° de singletons (NS), número total de mutaciones en cada río muestreado, para los genes *COI* y *16S*, respectivamente. La Tabla 32 (Anexo 01) reporta además los SC, SP, PI, NS, y 0, 2 y 4 degenerados en las tres posiciones del codón de inicio, para el gen *COI*. Los valores de SC, SP, PI y NS fueron los

mismos en las tres posiciones, mientras que los 0, 2 y 4 veces degenerados si mostraron cambios.

El análisis de saturación mutacional realizado en DAMBE para *COI*, mostró que la secuencia de *COI* tiene niveles bajos de saturación, por lo que las secuencias fueron usadas en los análisis posteriores (Xia y Lemey, 2009) (Anexo 06).

En la Tabla 33 (Anexo 01) se muestra la comparación del porcentaje nucleotídico para el total de la secuencia del gen *COI* de *M. inca*, en las diferentes posiciones del codón de inicio, observándose que en la posición 2 y 3 y también en el promedio, el contenido AT es ligeramente superior que el GC, encontrándose que el codón de inicio de las secuencias se encuentran en la tercera posición.

La Tabla 34 muestra la composición de aminoácidos de las secuencias, siendo más frecuente el aminoácido leucina, no estando presente cisteína y lisina. De los 210 aminoácidos que conforman la secuencia, se encontraron 201 sitios conservados, 09 sitios variables, 2 sitios parsimoniosamente informativos y 07 singletons. Se menciona que todas las secuencias consideradas en el presente estudio mostraron porcentajes similares de aminoácidos (datos no mostrados), lo que descarta la amplificación de pseudogenes.

En la Tabla 35 (Anexo 01) se observan los resultados obtenidos de la frecuencia de codones, según la posición 3 de acuerdo al alineamiento realizado con la secuencia de *M. rosenbergii*. Nótese que el codón más frecuente es UUC que codifica para fenilalanina; sin embargo, la presencia de seis codones para leucina con 31.1%, hacen que éste sea el aminoácido más abundante en la proteína citocromo oxidasa subunidad I de esta especie.

Tabla 28: Estadísticas básicas de las secuencias del gen *COI* en *M. inca*, de la población total y de cada río

DATOS MOLECULARES	JR	Chir	Chic	Chao	For	Hb	Lcr	Moch	Pat	San	Sup	Tb	Vir	Zan	Zar	POBLACIÓN TOTAL	
Número de secuencias (n)	18	7	27	30	10	25	26	23	31	23	25	5	26	25	25	326	
Número de sitios polimórficos (s)	21	8	27	35	15	42	26	28	32	24	28	12	30	27	28	133	
Número total de mutaciones	22	8	28	36	15	44	26	31	33	24	28	12	31	28	28	152	
Número de Singletons	18	7	20	27	12	35	25	19	26	18	23	12	21	19	20	54	
Sitios parsimoniosamente informativos	3	1	7	8	3	7	5	9	6	6	5	0	9	8	8	79	
Número de transiciones (Ts)	19	7	26	34	14	40	26	25	32	20	27	10	28	24	26	125	
Número de transversiones (Tv)	3	1	2	2	1	4	0	6	1	4	1	2	3	4	2	27	
Número de Indels	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Composición Nucleotídica	% A	25.23	25.33	25.25	25.1	25.19	25.19	25.22	25.22	25.21	25.23	25.19	25.11	25.2	25.18	25.17	25.21
	% T	27.44	27.42	27.43	27.42	27.41	27.46	27.44	27.4	27.43	27.45	27.44	27.41	27.43	27.44	27.44	27.43
	% C	27.12	27.17	27.15	27.17	27.15	27.14	27.14	27.18	27.14	27.12	27.14	27.16	27.15	27.15	27.12	27.15
	% G	20.21	20.08	20.17	20.23	20.25	20.21	20.20	20.19	20.21	20.20	20.23	20.32	20.21	20.23	20.26	20.21
G+C content	0.474	0.474	0.474	0.474	0.474	0.474	0.474	0.474	0.474	0.474	0.474	0.474	0.474	0.474	0.474	0.474	

Tabla 29: Estadísticas básicas de las secuencias del gen *16S rDNA* en *M. inca*, de la población total y de cada río

DATOS MOLECULARES	JR	Chir	Chic	Chao	For	Hb	Lcr	Moch	Pat	San	Sup	Tb	Vir	Zan	Zar	POBLACIÓN TOTAL	
Número de secuencias (n)	19	6	27	29	10	26	25	31	31	26	24	4	26	27	23	334	
Número de sitios polimórficos (s)	6	4	10	6	4	9	11	11	13	9	4	1	8	8	10	49	
Número total de mutaciones	6	4	10	6	4	9	11	11	13	9	4	1	8	8	10	49	
Número de Singletons	3	3	7	4	2	6	8	7	9	6	2	0	6	5	7	27	
Sitios parsimoniosamente informativos	3	1	3	2	2	3	3	4	4	3	2	1	2	3	3	22	
Número de transiciones (Ts)	4	3	9	5	3	8	9	10	12	7	2	1	7	7	9	44	
Número de transversiones (Tv)	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	0	1	1	1	5	
Número de Indels	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Composición Nucleotídica	% C	24.95	24.95	24.96	24.96	24.95	24.97	24.96	24.95	24.96	24.94	24.96	24.95	24.94	24.96	24.94	24.95
	% T	27.87	27.89	27.88	27.89	27.76	27.89	27.89	27.91	27.85	27.88	27.90	27.92	27.91	27.89	27.87	27.88
	% A	34.06	33.93	34.05	34.07	34.00	34.07	34.02	34.07	34.05	34.04	34.04	33.96	34.09	34.05	34.09	34.05
	% G	13.12	13.23	13.11	13.08	13.29	13.06	13.13	13.08	13.15	13.13	13.10	13.17	13.06	13.10	13.10	13.11
G+C content	0.381	0.382	0.381	0.380	0.382	0.380	0.381	0.380	0.381	0.381	0.381	0.381	0.380	0.381	0.380	0.381	

Tabla 30: Valores de diversidad genética del gen *COI*: *M. inca* para las 326 secuencias y de cada río muestreado

Genetic Diversity	JR	Chir	Chic	Chao	For	Hb	Lcr	Moch	Pat	San	Sup	Tb	Vir	Zan	Zar	POBLACIÓN TOTAL
Number of sequences	18	7	27	30	10	25	26	23	31	23	25	5	26	25	25	326
Number of polymorphic sites	21	8	27	35	15	42	26	28	32	24	28	12	30	27	28	133
Number of haplotypes	12	4	17	23	10	18	16	19	19	17	15	5	18	17	19	171
Haplotype diversity (Hd)	0.895	0.714	0.869	0.945	1	0.907	0.914	0.972	0.895	0.917	0.847	1	0.935	0.903	0.947	0.910
Nucleotide diversity (π)	0.0053	0.00391	0.00556	0.0061	0.00603	0.0076	0.00489	0.0066	0.00533	0.00522	0.00533	0.00757	0.00593	0.00591	0.00562	0.00576

Tabla 31: Valores de diversidad genética del gen *16S rDNA*: *M. inca* para las 334 secuencias y de cada río muestreado

Diversidad Genética	JR	Chir	Chic	Chao	For	Hb	Lcr	Moch	Pat	San	Sup	Tb	Vir	Zan	Zar	POBLACIÓN TOTAL
Número de secuencias	19	6	27	29	10	26	25	31	31	26	24	4	26	27	23	334
Número de sitios polimórficos	6	4	10	6	4	9	11	11	13	9	4	1	8	8	10	49
Número de haplotipos	8	4	9	6	5	11	10	10	14	11	5	2	10	9	10	60
Diversidad de haplotipos (Hd)	0.719	0.867	0.607	0.426	0.756	0.711	0.817	0.546	0.854	0.782	0.435	0.667	0.738	0.650	0.640	0.6890
Diversidad nucleotídica (π)	0.00211	0.00304	0.00234	0.0012	0.0024	0.00204	0.0029	0.0019	0.0031	0.00227	0.0011	0.0013	0.00207	0.0018	0.00274	0.0022

3.6.4.3 Análisis de Haplotipos

Los 15 ríos muestreados presentaron para *COI* un total de 171 haplotipos, con 133 sitios segregantes (S), y una diversidad de haplotipos de 0.91. El haplotipo 7 fue el más común, presente en 95 individuos; el haplotipo 8 fue el segundo más común, con 22 individuos; el haplotipo 50 fue el tercer más común, con 9 secuencias; y el haplotipo 30 fue el cuarto más común, con 7 individuos. 40 individuos tuvieron haplotipos entre dos o tres poblaciones y 153 individuos, es decir el 46.9% presentaron haplotipos únicos (Anexo 07). Todos los ríos presentaron haplotipos únicos (Fig. 21).

Haciendo un análisis de la relación del número de haplotipos presentados en cada río: fecha de captura, en muchos casos, no es posible hacerlo, pues el muestreo fue conseguido en una sola fecha y aún en los ríos donde los especímenes fueron conseguidos en varias fechas, el análisis fue realizado incluyéndolos a todos sin distinción. Lo que sí se evidencia en los haplotipos, es la influencia del número de secuencias por población, como en los ríos Tumbes y Chira, en donde el menor número de secuencias es coincidente con menor variedad de haplotipos compartidos (Tabla 27).

La presencia de un haplotipo común en casi todas las poblaciones sería indicador de flujo genético entre las cuencas de los ríos y además de la fortaleza de ese haplotipo en las diferentes poblaciones; aunque lo que distingue a las poblaciones es la mayor frecuencia de haplotipos únicos. En la Fig. 22 se puede ver de manera general, la diversidad de haplotipos ubicados geográficamente.

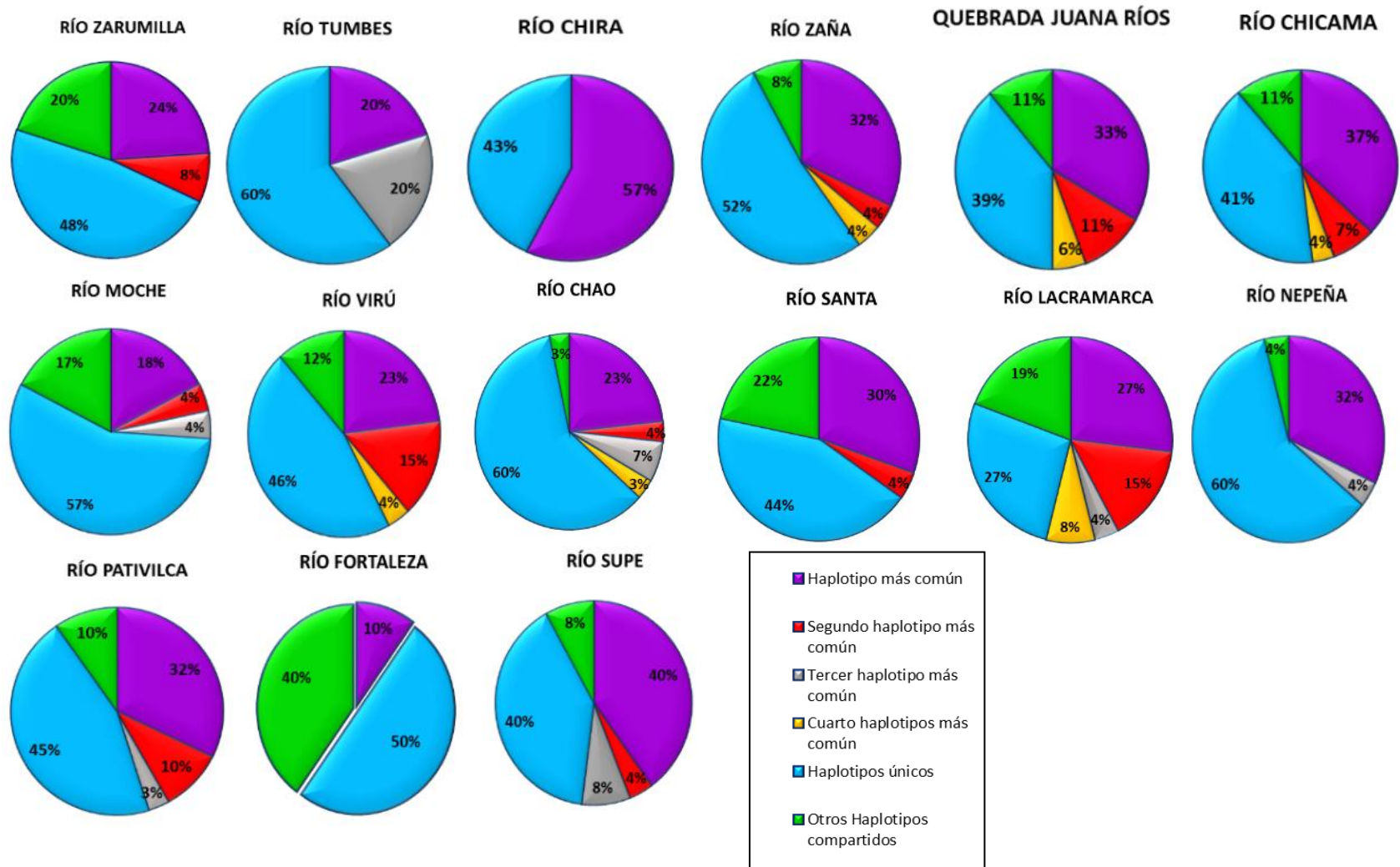


Fig. 21: Representación general de la distribución de haplotipos de los 15 ríos muestreados, para las secuencias parciales del gen *COI* de *M. inca*

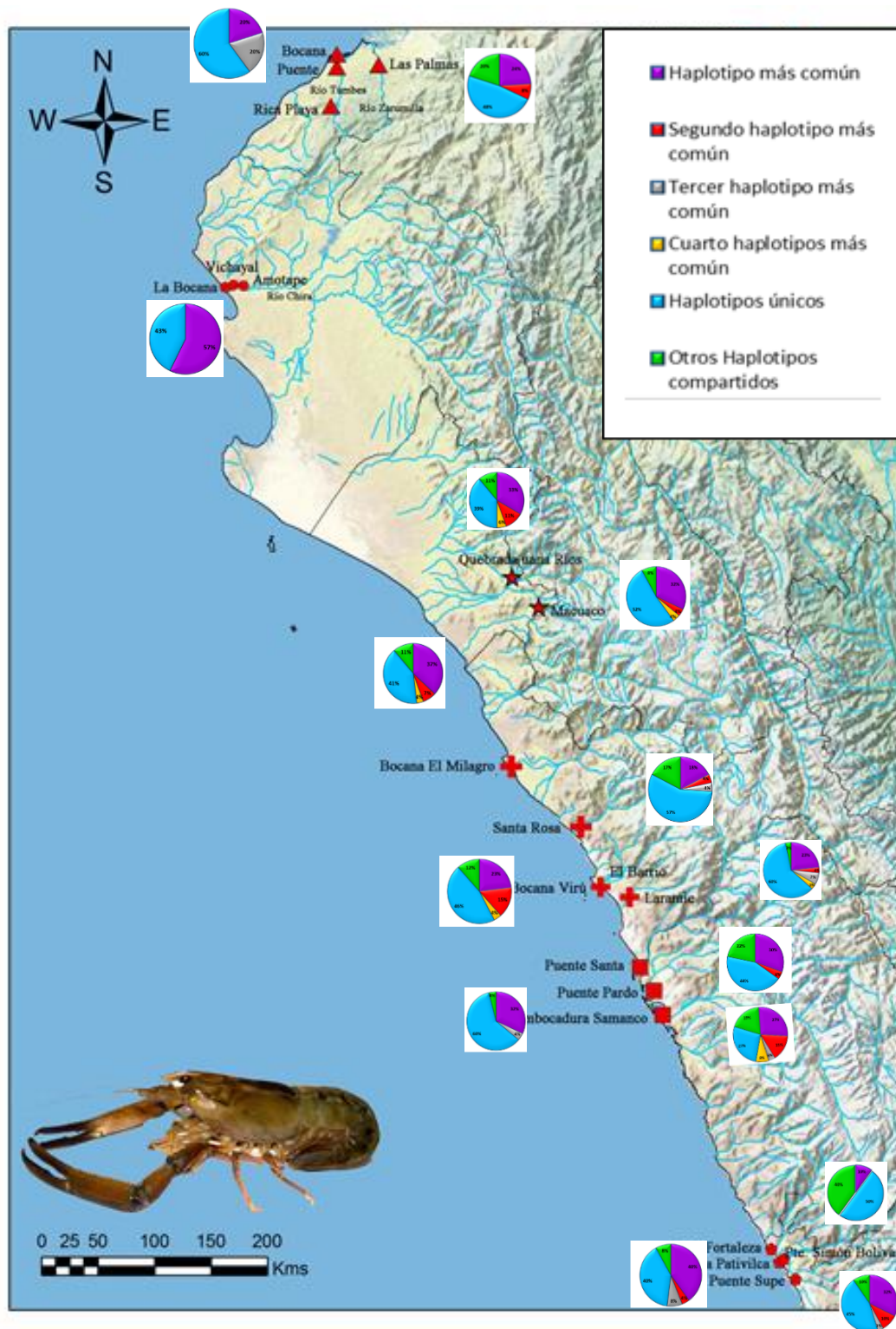


Fig. 22: Mapa general de la distribución de haplotipos de los 15 ríos muestreados, para secuencias del gen *COI* de *M. inca* en relación a su ubicación geográfica

Respecto al gen *16S*, en los 15 ríos muestreados se encontraron un total de 60 haplotipos, y si bien hay haplotipos únicos, no se presentan en los porcentajes tan elevados como para las secuencias del gen *COI*; predominando el haplotipo más común. Se obtuvieron 49 sitios segregantes (S) y una diversidad de haplotipos de 0.698.

El haplotipo 1, fue el más común, en 181 individuos; el haplotipo 5 fue el segundo más común, con 35 individuos; el haplotipo 16 fue el tercer más común, con 23 secuencias y el haplotipo 15 fue el cuarto más común, con 18 individuos. 34 individuos tuvieron haplotipos compartidos entre dos o tres poblaciones y 43 individuos, presentaron haplotipos únicos (Anexo 08). El río Tumbes no presentó haplotipos únicos y el río Fortaleza no presentó el haplotipo más común (Fig. 23).

Haciendo un análisis de la relación del número de haplotipos presentados en cada río: fecha de captura, en muchos casos, no es posible hacerlo, pues el muestreo fue conseguido en una sola fecha, y aún en los ríos donde los especímenes fueron conseguidos en varias fechas, al igual que para las secuencias del gen *COI*, el análisis fue realizado incluyéndolos a todos sin distinción. La presencia de un haplotipo común con alta frecuencia en casi todas las poblaciones, sería indicador de fuerte flujo genético entre las cuencas de los ríos y además de la fortaleza de ese haplotipo en las diferentes poblaciones. En la Fig. 24, se puede ver de manera general, la diversidad de haplotipos ubicados geográficamente.

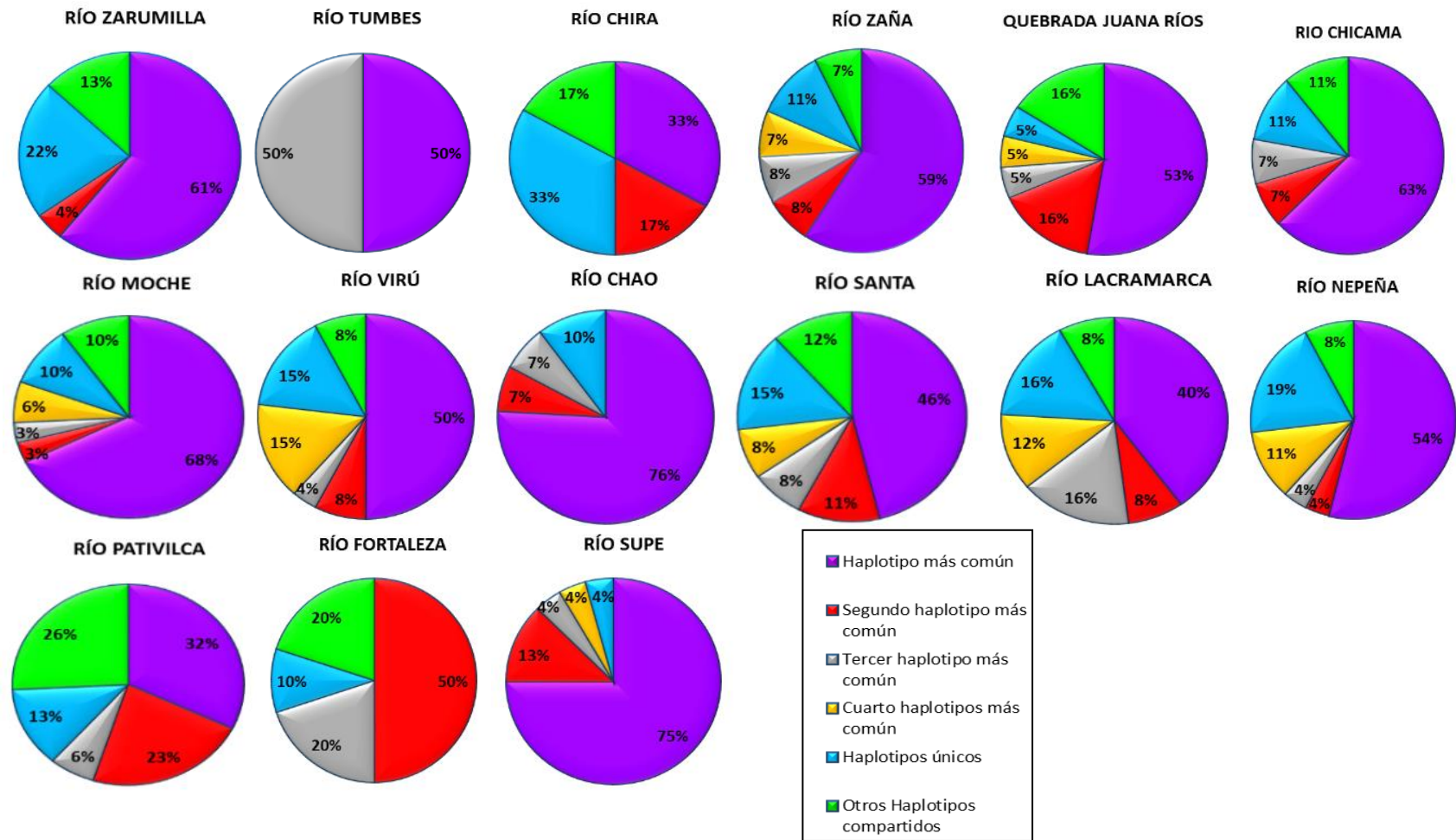


Fig. 23: Representación general de la distribución de haplotipos de los 15 ríos muestreados, para el gen *16S* de *M. inca*

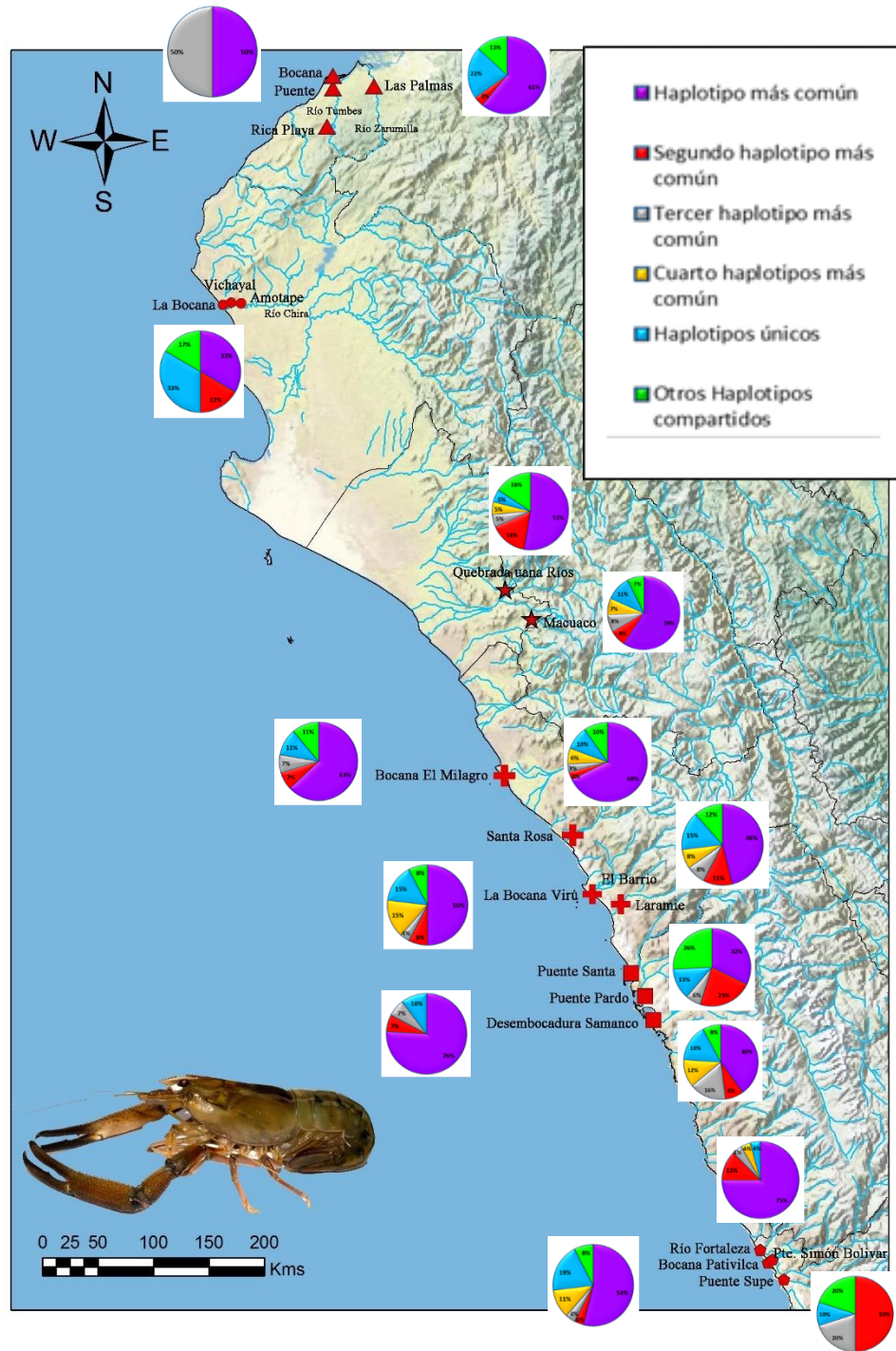


Fig. 24: Mapa general de la distribución de haplotipos de los 15 ríos muestreados, para el gen 16S de *M. inca* en relación a su ubicación geográfica

La red de haplotipos producida con el algoritmo Median Joining Network, muestran los 171 y 60 haplotipos, representados en el gráfico por

circunferencias (Fig. 25 y 26, para los genes *COI* y *16S*, respectivamente), donde el tamaño de cada circunferencia es proporcional a la frecuencia en cada una de las poblaciones muestreadas.

La distribución en estrella de los haplotipos en ambas figuras es característica de que ambos genes indican que la población de *M. inca* se encuentra en expansión reciente, luego de haber sufrido un cuello de botella.

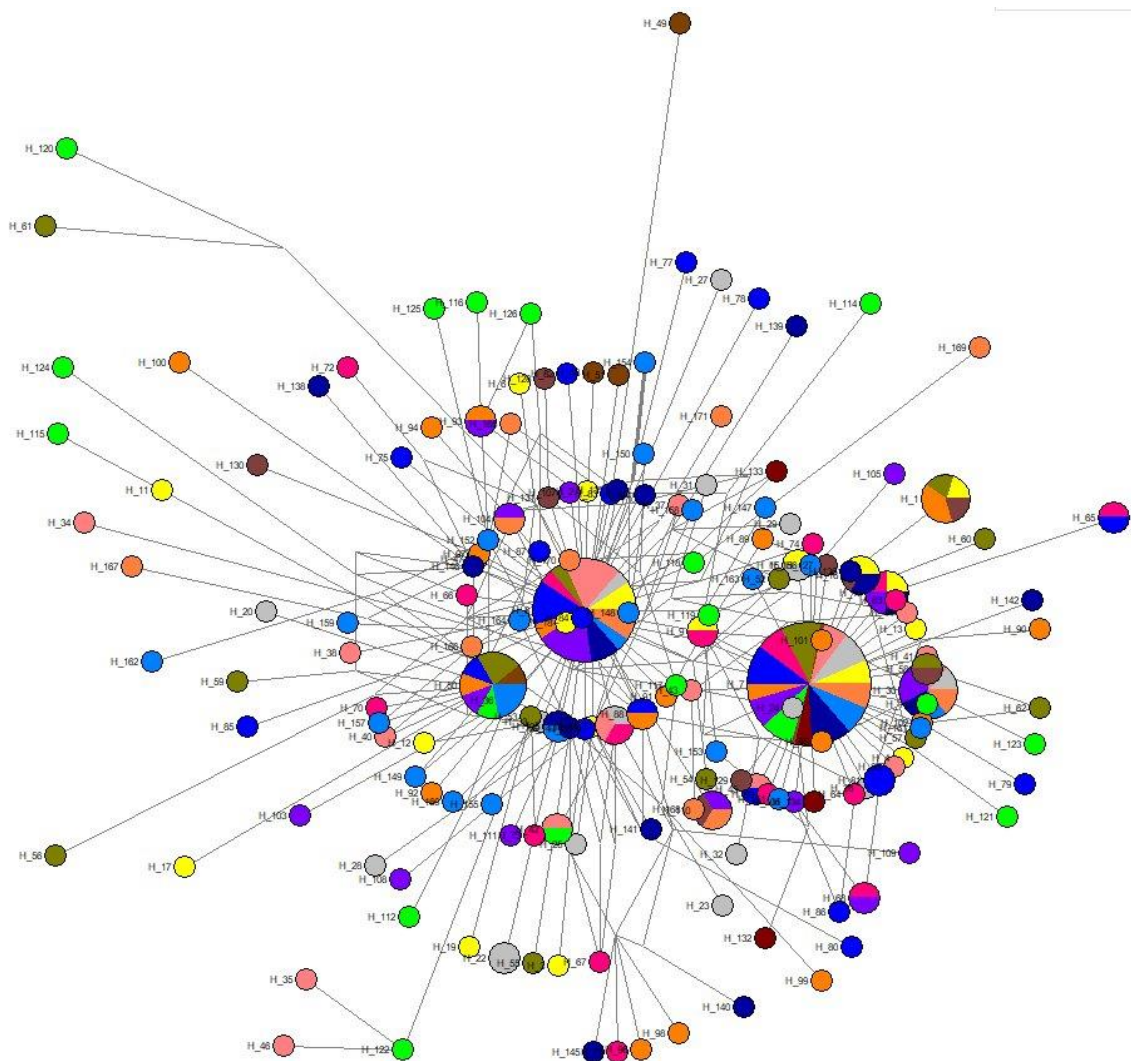


Fig. 25: Red de haplotipos del gen *COI* *M. inca*, generada por el algoritmo Median Joining Network

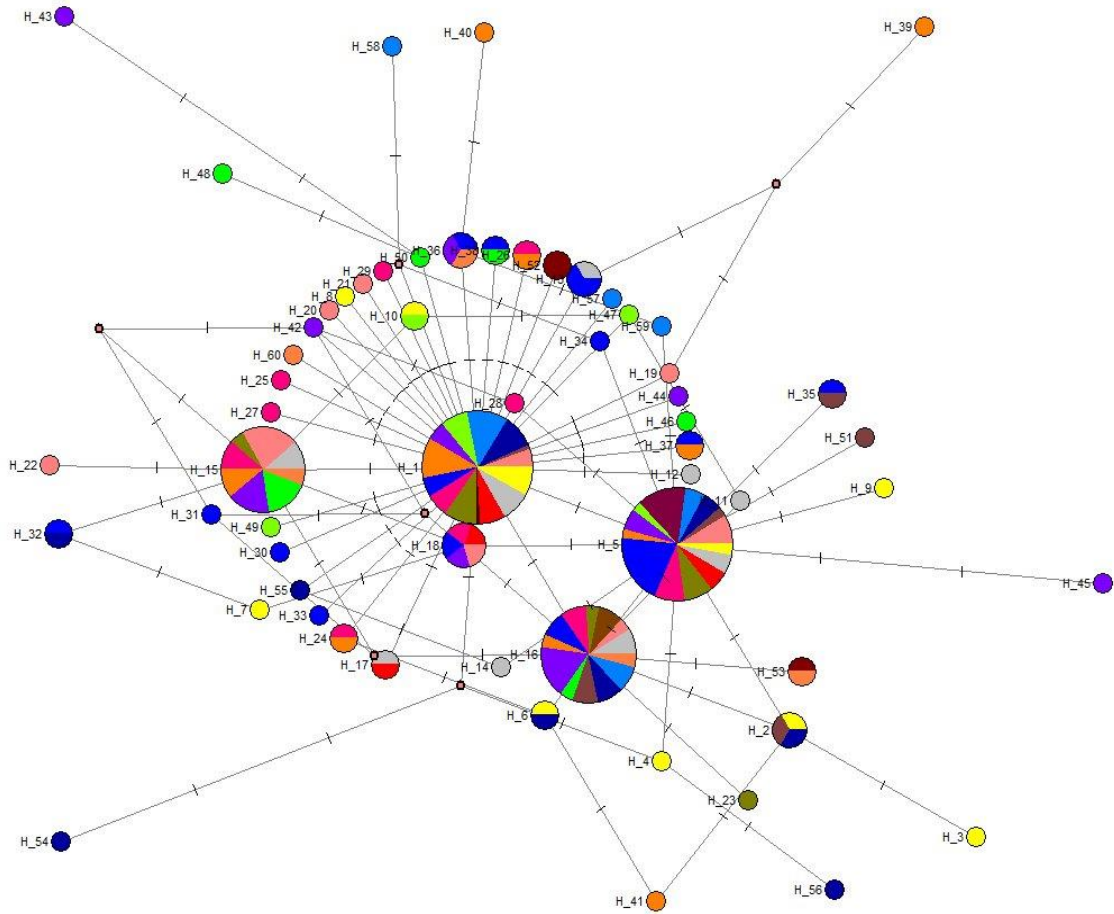


Fig. 26: Red de haplotipos del gen 16S *M. inca*, generada por el algoritmo Median Joining Network

LEYENDA



3.6.4.4 Análisis de Distancias Genéticas

Las distancias genéticas intrapoblacionales que se muestran en la Tabla 36, son bajas y muy similares entre sí, siendo el río Lacramarca el que presentó

la mayor distancia entre sus secuencias, para *COI*; mientras que los ríos Chira y Pativilca lo fueron para *16S*.

Tabla 36: Distancias genéticas (d) intrapoblacional de las secuencias parciales de los genes *COI* y *16S* para *M. inca* en los ríos muestreados del Pacífico peruano, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*. En color azul se resalta el río con mayor diversidad, y en color rojo el río con menor diversidad

Ríos	<i>COI</i>		<i>16S</i>	
	Distancia Genética (d)	Error Estandar	Distancia Genética (d)	Error Estandar
<i>Palaemon</i>	0.003432053	0.001719316	0.002786478	0.001549873
Zarumilla	0.005655438	0.001415873	0.002755627	0.001040667
Zaña	0.005956991	0.001467144	0.001836922	0.000700396
Viru	0.005973587	0.001431198	0.002075654	0.000888403
Tumbes	0.007626449	0.002071681	0.001325383	0.001312579
Supe	0.0053764	0.001371307	0.001102358	0.00058907
Santa	0.005258254	0.001390445	0.002277352	0.000882784
Pativilca	0.005368307	0.001327684	0.003023555	0.001113584
Moche	0.006643903	0.001574104	0.001893965	0.00060368
Lacramarca	0.004919962	0.001316566	0.002948575	0.001033253
Nepeña	0.007673816	0.001483014	0.002045852	0.000741069
Fortaleza	0.006069884	0.001700747	0.002432339	0.001275214
Chira	0.003929029	0.001354679	0.00305388	0.001544412
Chicama	0.005334578	0.001446387	0.002350085	0.000856267
Chao	0.006144815	0.001407316	0.001195816	0.000537038
Juana Rios	0.005334578	0.001440151	0.002117856	0.000940266
Promedio	0.00568537	0.001494851	0.002201356	0.000975535

Las distancias genéticas para el gen *COI* interpoblacional muestra valores que están comprendidos entre 0.46% y 0.71%, entre los ríos Lacramarca – Chira y Moche – Nepeña; respectivamente (Tabla 37); con una diferencia genética entre los diferentes ríos, que no supera el 1%. Para el gen *16S* los valores están comprendidos entre **0.35%** y **0.1%** entre los ríos Fortaleza - Chira y Zaña - Supe; respectivamente (Tabla 38). Igualmente, como en *COI*, la diferencia genética entre las poblaciones muestreadas, no supera el 1%.

Tabla 37: Distancias genéticas interpoblacional del gen *COI* para *M. inca* en los ríos del Pacífico peruano, basadas en el modelo K-2P

Zarumilla		0.00131463	0.00129137	0.00150654	0.00131654	0.00129004	0.00127794	0.00134227	0.00125860	0.00130682	0.00135396	0.00130403	0.00132506	0.00130564	0.00127582	0.02344016
Zana	0.00572635		0.00131298	0.00150880	0.00132246	0.00130353	0.00129589	0.00136725	0.00127483	0.00131154	0.00136126	0.00135141	0.00134982	0.00133002	0.00130280	0.02341578
Viru	0.00575594	0.00593694		0.00146047	0.00132589	0.00131513	0.00128084	0.00136537	0.00126826	0.00132699	0.00138817	0.00135648	0.00133185	0.00130326	0.00128105	0.02345408
Tumbes	0.00670008	0.00694192	0.00683640		0.00167374	0.00156304	0.00150492	0.00152096	0.00146562	0.00150334	0.00164972	0.00180883	0.00156143	0.00143207	0.00144274	0.02340926
Supe	0.00552668	0.00572796	0.00575022	0.00686989		0.00127207	0.00126710	0.00138739	0.00126889	0.00133646	0.00134415	0.00119560	0.00129234	0.00136551	0.00134001	0.02339708
Santa	0.00540517	0.00559591	0.00558800	0.00671530	0.00528129		0.00127519	0.00136435	0.00126223	0.00130116	0.00131417	0.00119716	0.00130710	0.00132053	0.00129045	0.02338647
Pativilca	0.00541802	0.00561071	0.00561260	0.00664497	0.00535613	0.00522803		0.00133814	0.00123525	0.00127327	0.00131939	0.00125756	0.00129907	0.00128732	0.00126405	0.02341276
Moche	0.00611446	0.00627451	0.00625097	0.00718685	0.00611251	0.00593813	0.00598071		0.00133079	0.00136662	0.00144409	0.00139383	0.00140394	0.00133915	0.00134568	0.02339975
Lacramarca	0.00520186	0.00538758	0.00536406	0.00631882	0.00516135	0.00500967	0.00505476	0.00572883		0.00127353	0.00133036	0.00128139	0.00128439	0.00126189	0.00125558	0.02345371
Huambacho	0.00660613	0.00678687	0.00671661	0.00772491	0.00657498	0.00646588	0.00647759	0.00711736	0.00622109		0.00137536	0.00135060	0.00131911	0.00131054	0.00130692	0.02341202
Fortaleza	0.00580731	0.00602346	0.00600231	0.00712024	0.00564509	0.00561920	0.00566723	0.00635419	0.00542302	0.00686456		0.00129241	0.00134900	0.00139319	0.00139012	0.02355251
Chira	0.00495461	0.00508188	0.00517708	0.00667460	0.00465845	0.00464350	0.00476425	0.00556232	0.00457876	0.00597003	0.00494255		0.00128464	0.00141657	0.00138511	0.02344199
Chicama	0.00555160	0.00572321	0.00575262	0.00687700	0.00551095	0.00536229	0.00540585	0.00604385	0.00521691	0.00665221	0.00580899	0.00485907		0.00134517	0.00130487	0.02342270
Chao	0.00583007	0.00601873	0.00598742	0.00682394	0.00585958	0.00575581	0.00573449	0.00639314	0.00548690	0.00685255	0.00612752	0.00535539	0.00588097		0.00128155	0.02347357
Juana_Rios	0.00544618	0.00562967	0.00558570	0.00649660	0.00543187	0.00531221	0.00532363	0.00596223	0.00504915	0.00640224	0.00566421	0.00485123	0.00548290	0.00567472		0.02343145
Palaemon	0.26152121	0.26105976	0.26130157	0.26122207	0.26065608	0.26057896	0.26079776	0.26068230	0.26117718	0.26123847	0.26254905	0.26076305	0.26119845	0.26177730	0.26104983	

Tabla 38: Distancias genéticas interpoblacional del gen *COI* para *M. inca* en los ríos del Pacífico peruano, basadas en el modelo K-2P

Palaemon		0.03479221	0.03475969	0.03471855	0.03486990	0.03476641	0.03477441	0.03481901	0.03473971	0.03481305	0.03472135	0.03509988	0.03480146	0.03475690	0.03474922	0.03479870
Zarumilla	0.40379089		0.00084763	0.00092338	0.00117942	0.00080736	0.00090723	0.00100092	0.00081718	0.00097754	0.00084826	0.00140082	0.00115169	0.00091352	0.00077741	0.00091868
Zana	0.40310076	0.00231188		0.00075182	0.00103704	0.00059603	0.00073072	0.00089845	0.00058444	0.00081662	0.00064301	0.00160297	0.00101290	0.00071864	0.00055132	0.00075986
Viru	0.40288270	0.00247409	0.00196468		0.00112787	0.00070010	0.00082798	0.00096896	0.00070025	0.00089820	0.00074561	0.00162746	0.00106377	0.00079433	0.00065047	0.00084909
Tumbes	0.40424550	0.00238063	0.00173165	0.00206679		0.00103103	0.00109517	0.00121590	0.00103842	0.00112075	0.00108912	0.00186210	0.00126505	0.00108320	0.00102593	0.00111402
Supe	0.40319896	0.00194382	0.00143360	0.00161953	0.00140855		0.00068633	0.00085631	0.00052591	0.00077588	0.00058028	0.00157366	0.00099017	0.00067921	0.00051302	0.00071829
Santa	0.40368486	0.00247702	0.00202951	0.00216651	0.00206629	0.00166386		0.00095057	0.00068888	0.00089581	0.00072119	0.00152399	0.00106159	0.00079523	0.00064243	0.00083219
Pativilca	0.40391659	0.00282953	0.00246868	0.00263037	0.00253620	0.00210491	0.00263258		0.00086815	0.00103047	0.00088929	0.00141362	0.00117975	0.00093753	0.00083349	0.00096504
Moche	0.40327683	0.00238353	0.00184143	0.00200867	0.00183038	0.00147972	0.00207492	0.00254482		0.00077134	0.00058311	0.00164969	0.00096647	0.00067619	0.00048895	0.00071025
Lacramarca	0.40428909	0.00284786	0.00236295	0.00249685	0.00227010	0.00201369	0.00256695	0.00298884	0.00242924		0.00081143	0.00161143	0.00111794	0.00087315	0.00073614	0.00092255
Huambacho	0.40270435	0.00250468	0.00193947	0.00205525	0.00199056	0.00159433	0.00218459	0.00267782	0.00197700	0.00250636		0.00168929	0.00098005	0.00069066	0.00052288	0.00074322
Fortaleza	0.40658288	0.00307208	0.00305849	0.00332237	0.00298449	0.00266869	0.00310743	0.00316622	0.00326845	0.00348059	0.00349125		0.00173063	0.00153927	0.00159826	0.00150755
Chira	0.40363696	0.00295930	0.00247012	0.00270614	0.00232157	0.00210056	0.00270558	0.00311617	0.00253805	0.00304125	0.00268093	0.00351746		0.00107720	0.00096858	0.00110967
Chicama	0.40376492	0.00251202	0.00206527	0.00226675	0.00202832	0.00169909	0.00228049	0.00268911	0.00211396	0.00263590	0.00225871	0.00311901	0.00271769		0.00064599	0.00081966
Chao	0.40320324	0.00202705	0.00149939	0.00170758	0.00147498	0.00112323	0.00174149	0.00218298	0.00153283	0.00209534	0.00166304	0.00279203	0.00216215	0.00176514		0.00068723
Juana_Rios	0.40374569	0.00238285	0.00193948	0.00209073	0.00193706	0.00157479	0.00213477	0.00252794	0.00200122	0.00246894	0.00211126	0.00294296	0.00256710	0.00218926	0.00164667	

Se menciona, además, que la distancia entre las secuencias de las especies estudiadas y el grupo externo para ambos genes, es notoriamente alta, con un 26% y 40% de diferencia, respectivamente, entre ésta y las poblaciones de *M. inca* muestreadas.

3.6.4.5 Análisis de Patrones Históricos Demográficos

Para el análisis de la historia demográfica se tomó en cuenta los valores de *tau* y *teta* inicial (θ_i) obtenidos, considerando todos los datos como una sola población (Tabla 39, Anexo 01)

En la Tabla 40 se observa que el tiempo transcurrido desde que se inició la expansión de *M. inca*; según la secuencia trabajada del gen *COI*, fue de 2380 años con un número efectivo de aproximadamente 10 hembras y según *16S* fue de 1087 años, con 171 hembras.

Tabla 40: Tiempo de inicio de expansión demográfica y número de hembras (Ne) con el que se inició la expansión de *M. inca*, según los genes *COI* y *16S*

	<i>COI</i>	<i>16S</i>
T (años)	2380	1087
Ne (hembras)	10	171

Las pruebas de neutralidad necesarias para el análisis *mismatch* de las secuencias parciales del gen *COI*, si bien presentaron valores negativos, los valores de tres poblaciones para la prueba de Tajima, no tuvieron significancia. El Fu'S, sólo confirmó la falta de significancia para la población de Chira (Tabla 41, Anexo 01). El valor negativo concuerda con el

alto porcentaje (47.5%) de haplotipos únicos encontrados en las poblaciones estudiadas. Los valores negativos, debe de interpretarse como evidencia de expansión demográfica poblacional, precedidos por cuellos de botella o la presencia de mutaciones deletéreas (Eguiarte *et al.*, 2010).

En el caso del gen *16S*, las dos pruebas de neutralidad para todos los casos dieron valores negativos, lo que debe de interpretarse como evidencia de expansión demográfica poblacional. Las poblaciones que dieron no significativo aún en el test Fu'S fueron las poblaciones con pocos individuos como las de Chira y Tumbes (Tabla 41, Anexo 01).

La distribución *mismatch*, es decir la distribución de las secuencias pareadas entre secuencias de una población, produjo para los dos genes una distribución unimodal cuando se le dio el supuesto de una población que sigue el modelo de expansión reciente, coincidiendo las frecuencias observadas con las esperadas (Fig. 27 y 28). Se observa, además, que la coincidencia de las dos curvas es mucho más precisa en el gen *16S* que para *COI*.

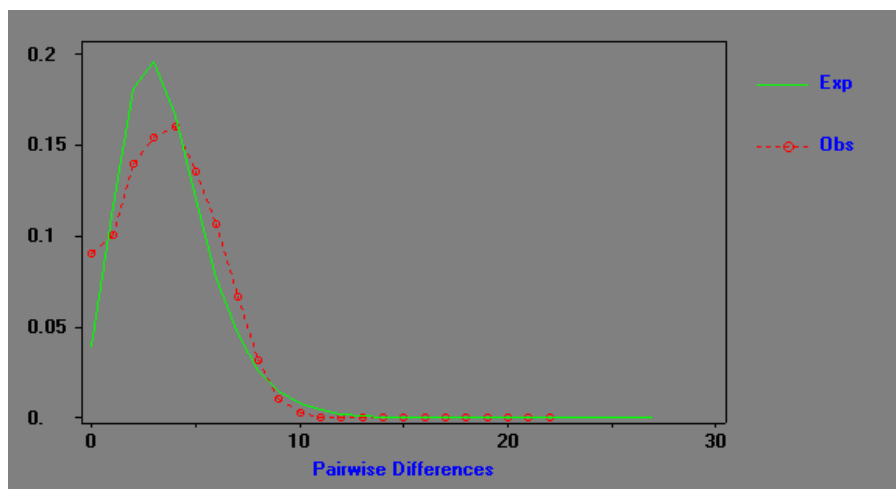


Fig. 27: Análisis *mismatch*: Distribución de frecuencias observadas y esperadas del gen *COI* - *M. inca* de los 15 ríos muestreados, bajo el supuesto de tamaño poblacional variable

Debe mencionarse, sin embargo, que si bien la población en general *de M. inca* según las secuencias de *COI*, denotan una población en expansión, algunas poblaciones en particular, muestran resultados de una población estable (datos no mostrados).

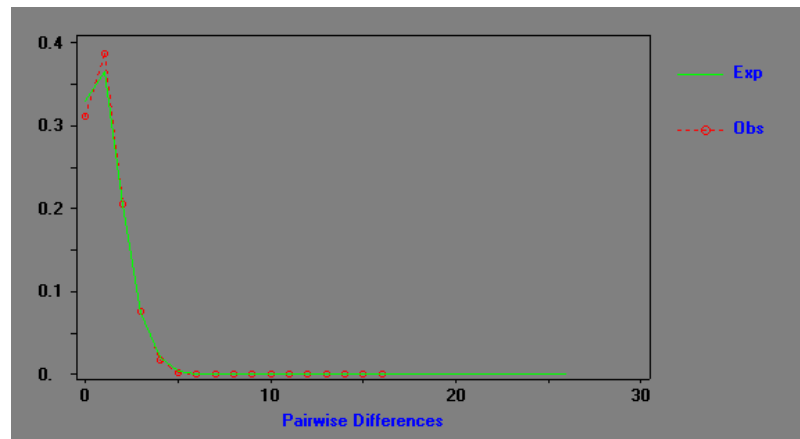


Fig. 28: Análisis de mismatch: Distribución de frecuencias observadas y esperadas del gen 16S - *M. inca* de los 15 ríos muestreados, bajo el supuesto de tamaño poblacional variable

3.6.4.6 Análisis Filogenéticos

Los dos métodos de análisis filogenético, MP e IB, realizados para los 171 haplotipos obtenidos con las secuencias parciales del gen *COI* (Figs. 29 y 30, Anexo 02) y 60 haplotipos para las secuencias del gen 16S (Figs. 31 y 32, Anexo 02), permitieron construir árboles con todos los haplotipos contenidos en un mismo clado, por lo que las topologías no muestran agrupaciones consistentes con una población estructurada, lo que sugiere una gran homogeneidad genética, además de que sustenta la monofilia de la especie. La filogenia es también consistente con una población en expansión, posterior a un cuello de botella. Para el análisis filogenético y construcción de los árboles para los dos genes, se consideró a *P. hancockii* como grupo externo.

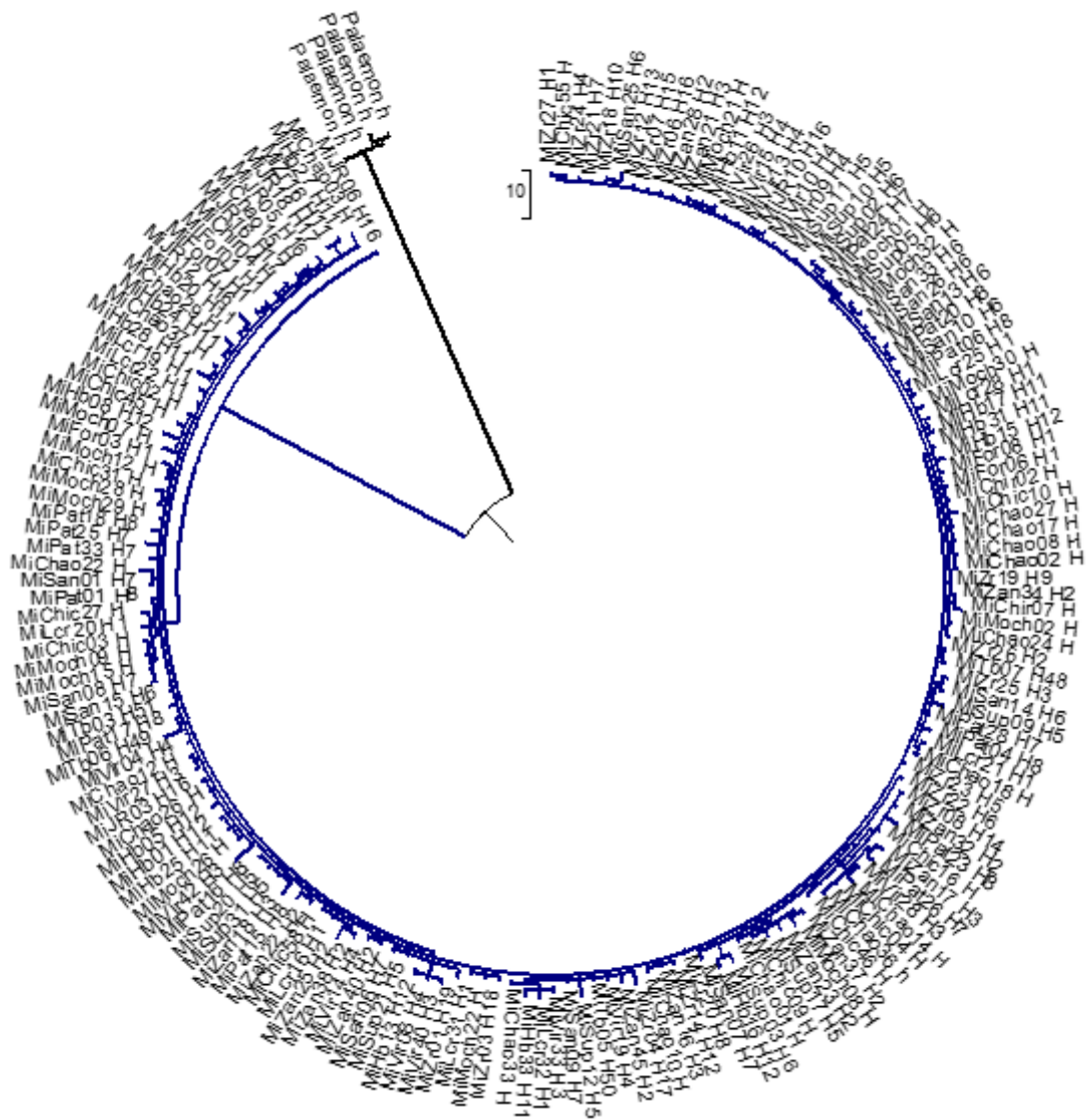


Fig 29: Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima Parsimonia (MP), usando la función Kimura – 2P a partir de los 171 haplotipos encontrados para las 326 secuencias del gen *COI* para *M. inca*

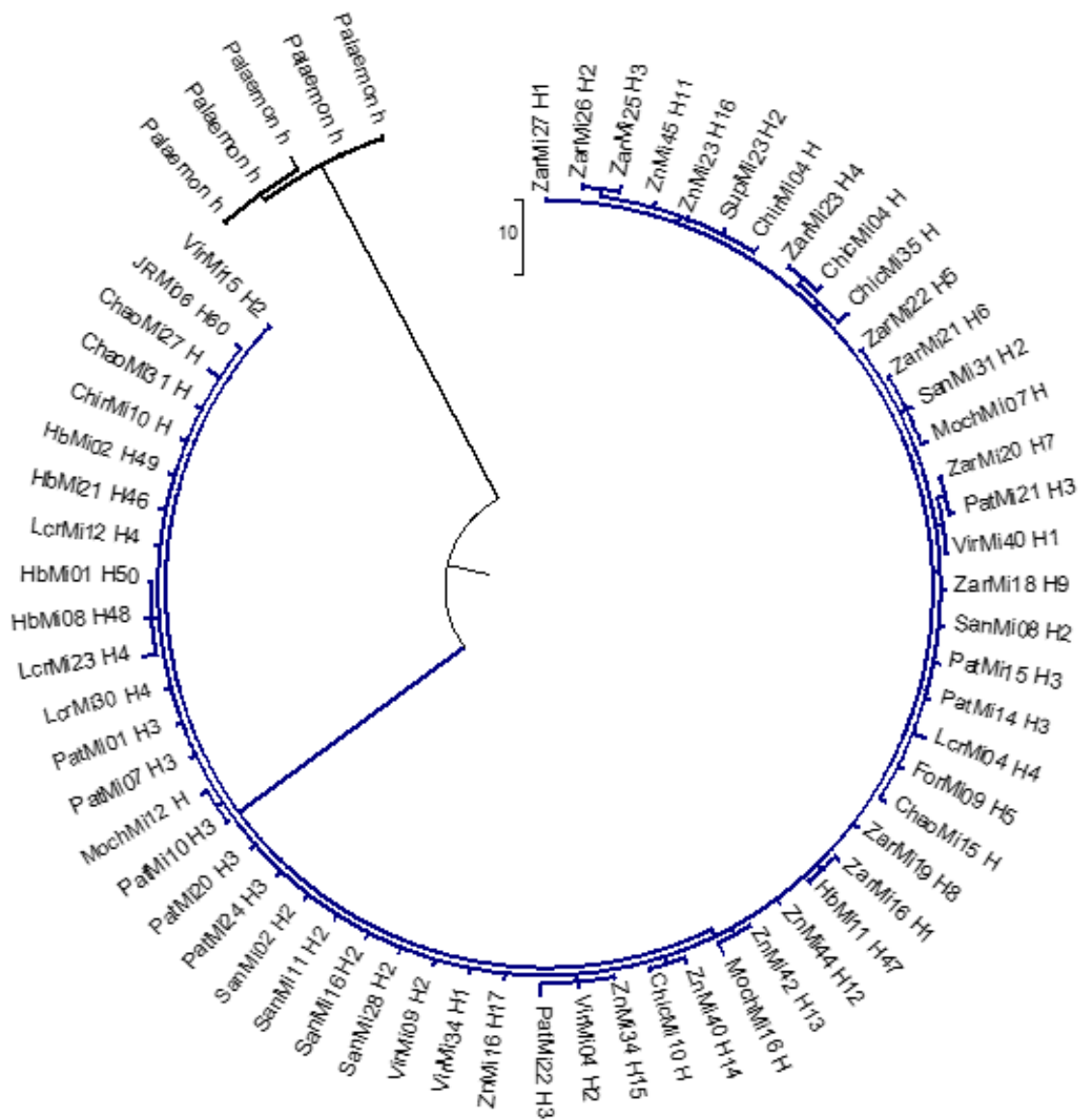


Fig 31: Comparación de árbol filogenético construido con el algoritmo MP usando la función Kimura – 2P1 a partir de los 60 haplotipos encontrados para las 334 secuencias del gen *16S-M. inca*, considerando a *P. hancockii* como grupo externo

La concatenación de las secuencias parciales de los genes *COI* y *16S* para *M. inca* presentaron árboles con topologías a las presentadas por los genes de manera individual (Fig. 33), soportando también la monofilia de la especie.

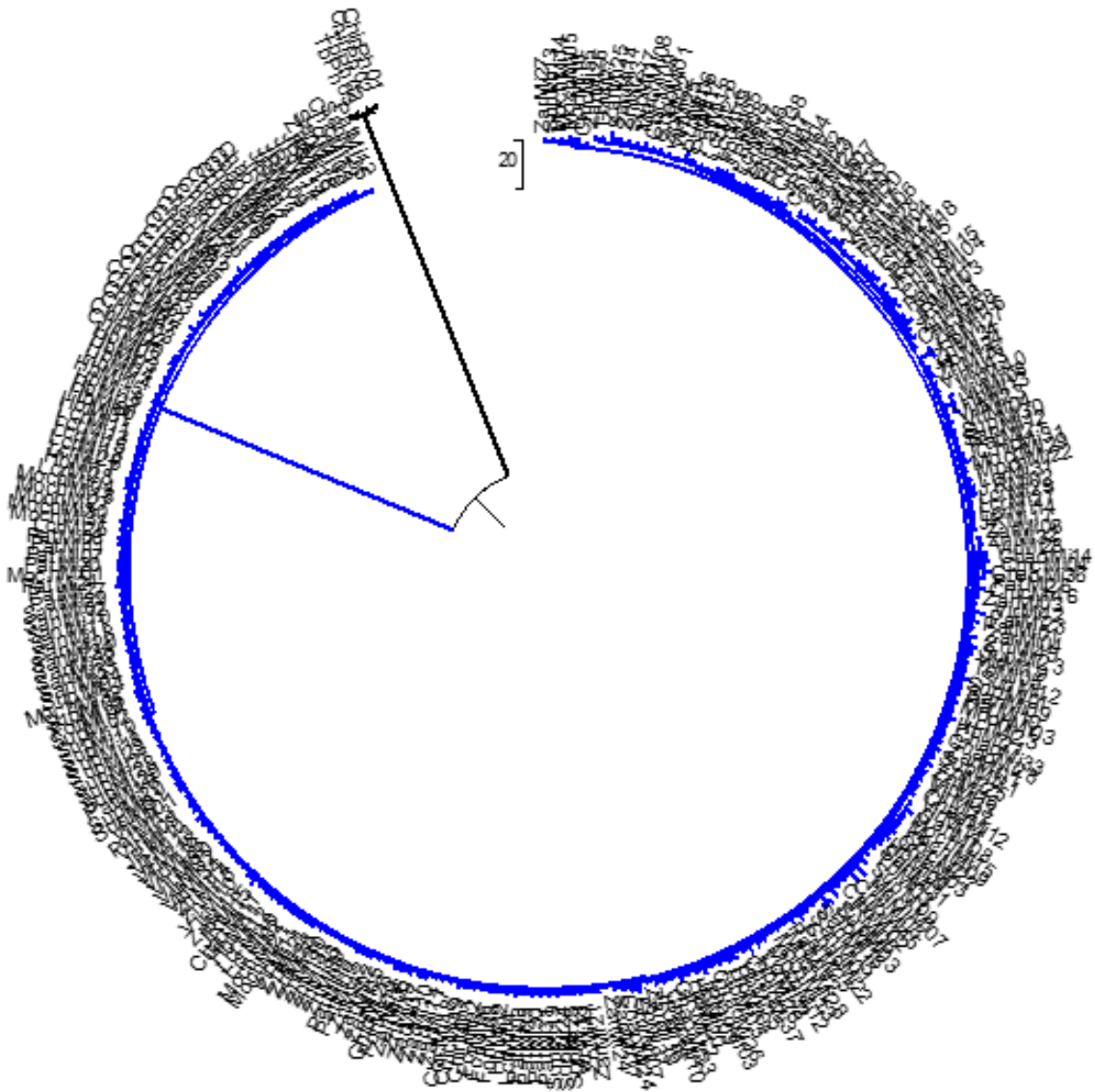


Fig 33: Árbol filogenético concatenado *M. inca*: *COI-16S* construido con el algoritmo MP usando la función Kimura – 2P

3.6.4.7 Estructura Poblacional

El AMOVA para los datos de las frecuencias de los haplotipos de *COI* mostraron resultados estadísticos similares cuando las poblaciones se agruparon y cuando se consideró como una sola población. Ninguno de los estadísticos F (CT , SC y ST) fueron significativos; debiéndose mencionar, sin embargo, que cuando se consideró cuatro grupos, el estadístico entre grupos dio positivo, aunque sin significancia (Tabla 44). Ello indica que no existe

estructura genética en los 15 ríos muestreados para *M. inca* basada en las secuencias parciales del gen *COI*.

El valor del estadístico *Fst* estimado para el total de las 324 secuencias fue de -0.00334 (Tabla 42), lo que corrobora que no existe estructuración genética en estas poblaciones de la especie en mención.

Tabla 42: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *COI* de *M. inca* los 15 ríos muestreados, sin estructuración en grupos

Fuente de variación	d.f	Varianza	Estadístico	Porcentaje de Variación	P
Entre poblaciones	14	-0.00152 Va	-0.00334 (<i>FST</i>)	-0.33	0.75660
Dentro poblaciones	311	0.45619 Vb		100.33	

Tabla 43: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *COI* de *M. inca* los 15 ríos muestreados, con estructuración en 2 grupos

Fuente de variación	d.f	Varianza	Estadístico	Porcentaje de Variación	P
Entre grupos	1	-0.00108 Va	-0.00239 (CT)	-0.24	0.78886
Entre poblaciones dentro de los grupos	13	-0.00663 Vb	-0.00530 (SC)	-0.29	0.71652
Dentro de las poblaciones	311	0.45619 Vc	-0.00530 (ST)	100.53	0.75269

Tabla 44: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *COI* de *M. inca* los 15 ríos muestreados, estructurado en cuatro grupos

Fuente de variación	d.f	Varianza	Estadístico	Porcentaje de Variación	P
Entre grupos	3	-0.00237 Va	0.00076 (CT)	0.08	0.18671
Entre poblaciones dentro de los grupos	11	-0.00663 Vb	-0.00363 (SC)	-0.36	0.68133
Dentro de las poblaciones.	311	1.83148 Vc	-0.00287 (ST)	100.29	0.70772

P < 0.05

Los resultados obtenidos en los AMOVA fueron soportados por los valores de *pairwise population Fst* (Tabla 45, Anexo 01) los cuales dieron negativo en la mayoría de los enfrentamientos, revelando una estructura no significativa entre las 15 localidades.

Sin embargo, el AMOVA para los datos de las frecuencias de los haplotipos del gen *16S*, mostró resultados estadísticos diferentes que con *COI*. Cuando la estructuración fue en dos grupos, la variación entre grupos no fue significativa, pero si lo fue entre poblaciones dentro de los grupos y dentro de cada población; aunque la mayor variación se presentó dentro de cada población con un 97.32% (Tabla 46).

Tabla 46: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *16S* de *M. inca* los 15 ríos muestreados, estructurado en dos grupos

Fuente de variación	d.f	Varianza	Estadístico	Porcentaje de Variación	P
Entre grupos	1	-0.00484 Va	-0.01414 (CT)	- 1.41	0.63734
Entre poblaciones dentro de los grupos	13	0.01401 Vb	0.04034 (SC)	4.09	0.0000
Dentro de las poblaciones	320	0.33331 Vc	0.02677 (ST)	97.32	0.0000

Cuando los ríos no fueron agrupados, (Tabla 47), si bien la mayor variación ocurrió dentro de cada población (96.34%), la variación entre poblaciones fue baja (con un 3.66%) pero altamente significativa, lo que estaría indicando que la población de *M. inca* según *16S*, está ligeramente estructurada.

Tabla 47: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *16S* de *M. inca* de los 15 ríos muestreados, sin estructuración en grupos

Fuente de variación	d.f	Varianza	Estadístico	Porcentaje de Variación	P
Entre poblaciones	14	0.01266 Va	0.03658 (<i>FST</i>)	3.66	0.00098
Dentro poblaciones	320	0.33331 Vb		96.34	

P < 0.05

Los resultados obtenidos en los AMOVA fueron soportados por los valores de *pairwise population FST* (Tabla 48, Anexo 01), los cuales dieron positivo en la mayoría de los enfrentamientos, con significancia entre la mayoría de los datos, como se corrobora con los valores de la tabla de significancia (Tabla 49, Anexo 01). Se destaca que la población del río Fortaleza, es diferente significativamente con los otros 14 ríos muestreados.

3.6.5 Estructura Poblacional de *M. gallus* basada en las secuencias parciales de los genes Citocromo oxidasa I (*COI*) y *16SrDNA (16S)*

3.6.5.1 Estadísticas básicas de las secuencias

En la Tabla 50, puede verse la composición nucleotídica de las secuencias de los genes *COI* y *16S* donde se observa igualmente a lo que ocurrió para *M. inca*, que para *COI*, el par AT está en mayor proporción que el par C-G. No se presentaron *indels* al alinear las secuencias. En todas las poblaciones muestreadas, en las sustituciones estuvieron representadas las transversiones, con un total de 57 y 9 para las transiciones y transversiones, respectivamente. Se destaca un promedio de 4,5 transversiones/río, a diferencia de un promedio de 1.8 transversiones/río para las secuencias de *COI* de *M. inca*.

Para las secuencias de *16S*, puede verse que la composición nucleotídica también al igual que para *M. inca*, el par AT está en mayor proporción que el par C-G, aunque con mayor en mayor porcentaje que para *M. inca*. Se presentaron *indels* en tres secuencias. Las sustituciones estuvieron en un total de 31 y 18 para las transiciones y transversiones, respectivamente, con un promedio de 9 transversiones/río.

Los valores de diversidad de nucleótidos (π) mostrados en la Tabla 51, si bien en términos generales puede considerarse bajos, son mayores que los presentados en *M. inca* tanto para *COI* como para *16S*: En *COI*, para la población total es de 0.01314 y Tumbes ligeramente mayor que Zarumilla (0.01416 y 0.0119, respectivamente); en *16S* para la población total es de 0.01782 y Tumbes mayor que Zarumilla (0.02266 y 0.01249, respectivamente).

Tabla 50: Estadísticas básicas de las secuencias parciales de las secuencias de los genes *COI* y *16S* para *M. gallus*

DATOS MOLECULARES	<i>COI</i>			<i>16S</i>			
	Zar	Tb	Total	Zar	Tb	Total	
Número de secuencias (n)	21	19	40	22	15	37	
Número de sitios polimórficos (s)	39	48	64	24	35	48	
Número total de mutaciones	40	48	66	24	35	49	
Número de Singletones	18	20	29	9	6	10	
Sitios parsimoniosamente informativos	21	8	35	15	29	38	
Número de transiciones (Ts)	34	42	57	12	24	31	
Número de transversiones (Tv)	6	6	9	12	11	18	
Número de <i>Indels</i>	0	0	0	0	1	1	
Composición Nucleotídica	% C	26.74	26.83	25.51	25.51	25.53	25.52
	% T	26.83	26.69	26.37	26.37	26.64	26.48
	% A	26.19	26.06	34.97	34.97	34.78	34.89
	% G	20.24	20.41	13.16	13.16	13.05	13.11
	G+C content	0.470	0.472	38.70	38.70	38.50	38.50

3.6.5.2 Diversidad Genética

En la Tabla 51 se consignan también los valores de los parámetros que determinan la diversidad genética para *COI* y *16S*, el que con respecto a la diversidad haplotípica es alta, la que prácticamente es 1 para ambos ríos.

En la Tabla 52 (Anexo 01), se observa para *COI*, los sitios conservados (SC), sitios polimórficos (SP), sitios parsimoniamente informativos (PI), N° de singletons, 0, 2 y 4 degenerados en las tres posiciones del codón de inicio. Los valores de SC, SP, PI y los singletons fueron los mismos en las tres posiciones, mientras que los 0, 2 y 4 veces degenerados si mostraron cambios.

Tabla 51: Valores de diversidad genética de las secuencias parciales de los genes *COI* y *16S* - *M. gallus* y de cada río muestreado

Diversidad Genética	<i>COI</i>			<i>16S</i>		
	Zar	Tb	Población Total	Zar	Tb	Población Total
Número de secuencias	21	19	40	22	15	37
Número de sitios polimórficos	39	48	64	24	35	48
Número de haplotipos	19	17	36	17	10	24
Diversidad de haplotipos (Hd)	0.99	1	0.995	0.974	0.9430	0.961
Diversidad nucleotídica (π)	0.0119	0.01419	0.01314	0.01249	0.02266	0.01782

En la Tabla 53 (Anexo 01) se muestra la comparación del porcentaje nucleotídico para el total de la secuencia del gen *COI* de *M. gallus*, en donde considerando que el codón se encuentra en la tercera posición, el que presenta mayor abundancia al igual que para *M. inca*, es el par AT.

La composición de aminoácidos de las secuencias se muestra en la Tabla 54 (Anexo 01), siendo más frecuente el aminoácido leucina, con ausencia de

cisteína y lisina. De los 204 aminoácidos que conforman la secuencia, se encontraron 198 sitios conservados, 6 sitios variables, 0 sitios parsimoniosamente informativos y 06 singletons. Debe mencionarse que todas las secuencias consideradas en el presente estudio mostraron porcentajes similares de aminoácidos (datos no mostrados), lo que descarta la amplificación de pseudogenes. El análisis de saturación mutacional realizado en DAMBE mostró que la secuencia de *COI* tiene niveles bajos de saturación, por lo que las secuencias fueron usadas en los análisis posteriores (Xia y Lemey 2009) (Anexo 09).

En la Tabla 55 (Anexo 01) se muestran los resultados obtenidos de la frecuencia de codones, según la posición 3 de acuerdo al alineamiento realizado con la secuencia de *M. rosenbergii* usado como referencia. El codón más frecuente es UUC que codifica para fenilalanina; sin embargo, la presencia de seis codones para leucina con 25.2%, hacen que éste sea el aminoácido más abundante en la proteína citocromo oxidasa subunidad I. La ausencia de codones *stop* en las secuencias, una vez más, confirma la no amplificación de pseudogenes.

3.6.5.3 Análisis de Haplotipos

Los dos ríos muestreados presentaron un total de 36 y 24 haplotipos para las secuencias parciales de los genes *COI* y *16S*, respectivamente (Tabla 51, Anexo 10 y 11), y al igual que para *M. inca*, es notoria la presencia de haplotipos únicos, presentes en un elevado porcentaje: para *COI*, 89% y 90% para Zarumilla y Tumbes, respectivamente; y para *16S*, 73% y 60%, respectivamente.

En las Figs. 34 y 35, se observa de manera simultánea el comportamiento de los haplotipos en cada río/gen, observándose de manera general un comportamiento similar en ambas poblaciones para ambos genes, con haplotipos únicos.

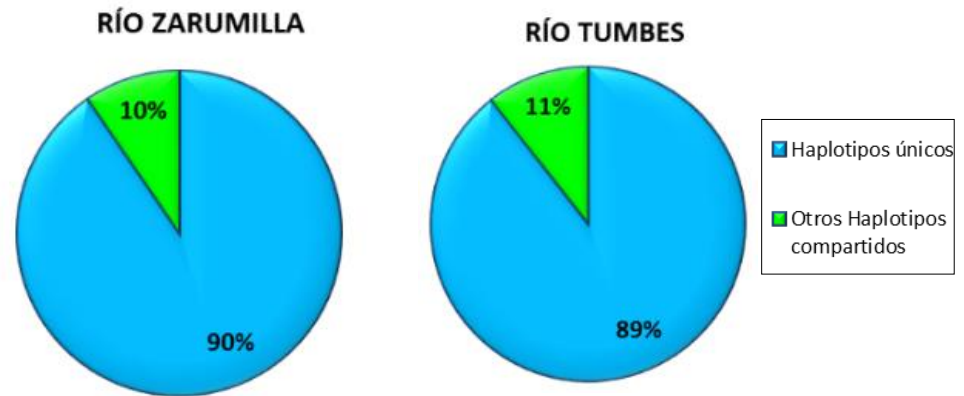


Fig. 34: Distribución general de la distribución de haplotipos de los ríos Zarumilla y Tumbes muestreados, para las secuencias parciales del gen *COI* de *M. gallus*

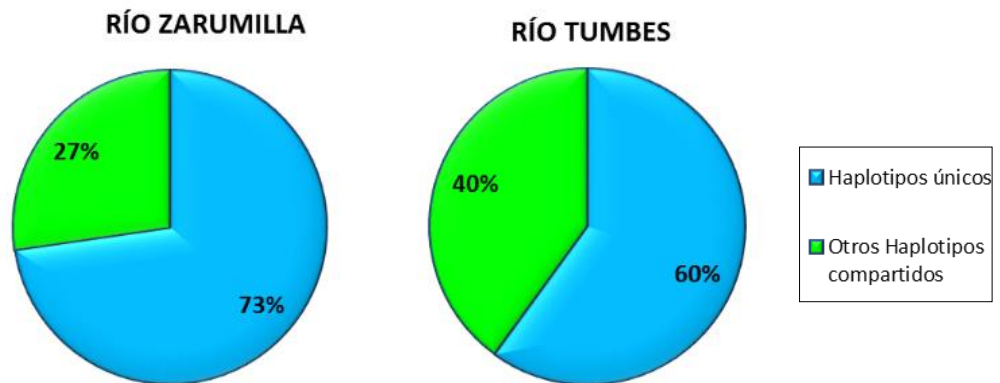


Fig. 35: Distribución general de la distribución de haplotipos de los ríos Zarumilla y Tumbes muestreados, para las secuencias parciales del gen *16S* de *M. gallus*

La red de haplotipos producida con el algoritmo Median Joining Network, muestra para las secuencias de *COI* que no hay ningún haplotipo que se concentre en alguna circunferencia “nodo”, sino que como ya se ha mencionado, casi el 90% de los haplotipos son únicos, de allí el tamaño

bastante pequeño de las circunferencias (Fig. 36). Igualmente, en el caso del gen *16S*, se puede ver también que ningún haplotipo concentra una alta frecuencia, sino que como ya se ha mencionado para el caso del network para *COI*, el 66.5% de los haplotipos son únicos, de allí el tamaño también pequeño de las circunferencias (Fig. 37).

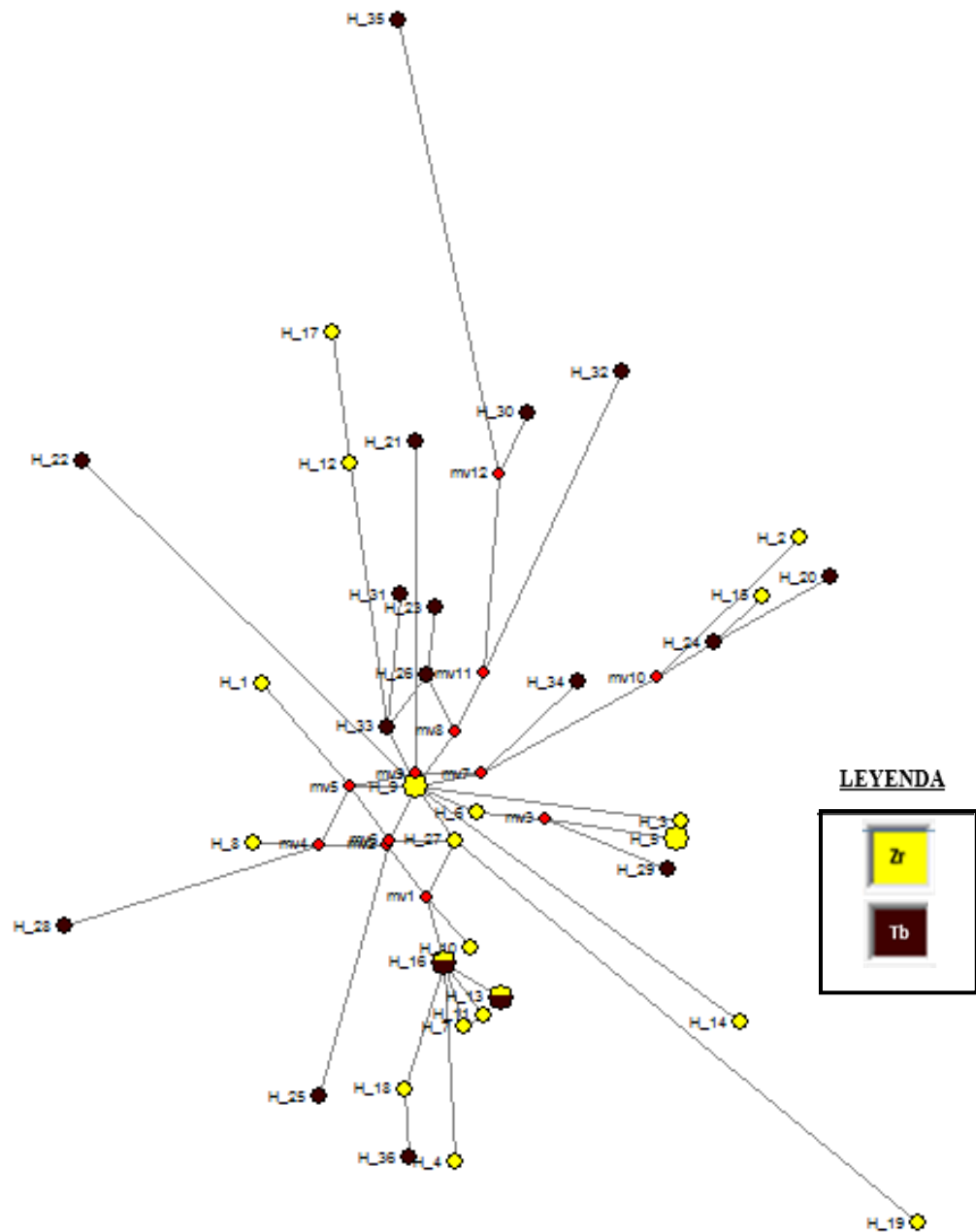


Fig. 36: Red de haplotipos obtenida de las secuencias parciales del gen *COI* - *M. gallus*, generada por el algoritmo Median Joining Network

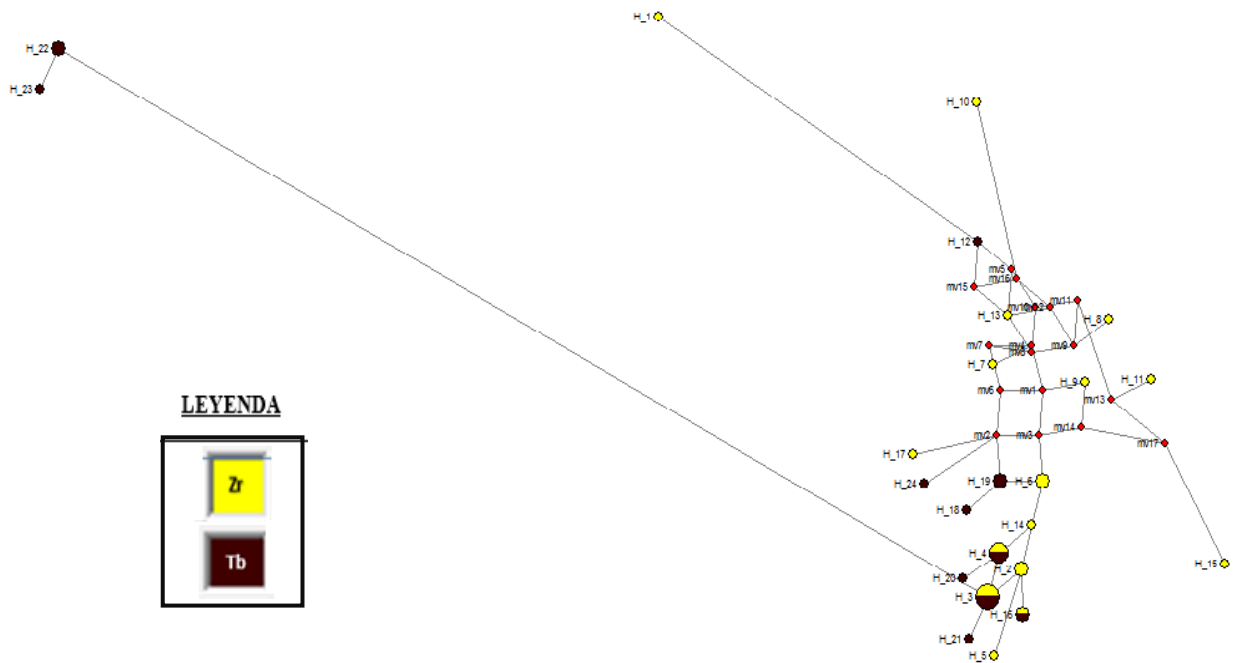


Fig. 37: Red de haplotipos obtenida de las secuencias parciales del gen *16S* - *M. gallus*, generada por el algoritmo Median Joining Network

3.6.5.4 Análisis de Distancias Genéticas

En la Tabla 56 se muestran las distancias genéticas intrapoblacionales para las secuencias parciales de los genes *COI* y *16S*. Para *COI*, las distancias son muy similares entre los dos ríos, pero con *16S* la distancia del río Tumbes es cuatro veces superior al del río Zarumilla.

Tabla 56: Distancias genéticas (d) intrapoblacional de las secuencias parciales de los genes *COI* y *16S* de *M. gallus* en los ríos Zarumilla y Tumbes, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

Genes	<i>COI</i>		<i>16S</i>	
	Distancia Genética (d)	Error Estandar	Distancia Genética (d)	Error Estandar
Ríos – Grupo externo				
Zarumilla	0.012084452	0.002208762	0.003606437	0.001758404
Tumbes	0.014396293	0.002291871	0.012675923	0.00289339
<i>Palaemon</i>	0.00244744	0.001369314	0.023577041	0.003858894

Tabla 57: Distancias genéticas interpoblacional del gen *COI* para *M. gallus* en los ríos Tumbes y Zarumilla, basados en el modelo Kimura 2 parámetros con 10000 *bootstrap*

Zarumilla		0.00213107	0.02180845
Tumbes	0.01350634		0.02204288
<i>Palaemon</i>	0.25589909	0.25985782	

La distancia genética entre ambos ríos para el gen *COI* es de 1.3%, con un $p < 0.05$ y por debajo de la distancia con el grupo externo (Tabla 57); en tanto que para *I6S*, la distancia genética entre ambos ríos de 2.07%, es significativa ($p \text{ value} < 0.05$), y también por debajo de la distancia con el grupo externo (Tabla 58).

Tabla 58: Distancias genéticas (d) interpoblacional del gen *I6S* para *M. gallus* en los ríos muestreados del Pacífico Peruano, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

<i>Palaemon</i>		0.05362420	0.05429499
Zarumilla	0.68056881		0.00317641
Tumbes	0.69331136	0.02071292	

3.6.5.5 Análisis de Patrones Históricos Demográficos

Para el análisis de la historia demográfica de ambos genes, se consideró los valores de *tau* y *teta* inicial (θ_i) obtenidos considerando a todos los datos como una sola población (Tabla 59, Anexo 01) y también de manera individual. En la Tabla 60 se observa que el tiempo transcurrido desde que se inició la expansión, según las secuencias trabajadas en ambos genes, fue de 2150 años para *COI* y, con un número efectivo de aproximadamente 274

hembras; y para *M. gallus* fue de 1361 años y 6307 hembras, respectivamente, con las que iniciaron la expansión demográfica.

Tabla 60: Tiempo de inicio de expansión demográfica y número de hembras (Ne) con el que se inició la expansión en las poblaciones de *M. gallus*

	<i>COI</i>	<i>16S</i>
T (años)	2150	1361
Ne (hembras)	274	6307

Con respecto a las pruebas de neutralidad (Tabla 61, Anexo 01) para *COI*, el test de Tajima'D dio para todos los casos, valores negativos, pero sólo significativo para el total de la población, mientras que para el test Fu'S, fue significativo para ambas poblaciones y también cuando se consideró como una sola población. Esto debe de interpretarse como evidencia de expansión demográfica poblacional y que la población no está reducida. Para las secuencias del gen *16S*, sólo la prueba de Fu'S dio significativo para el río Zarumilla y para el total de la población. Según estos resultados, la población de *M. gallus*, específicamente del río Tumbes está estable, de acuerdo a las secuencias de *16S*, mientras que la del río Zarumilla es la que habría soportado un cuello de botella y está en expansión.

Sin embargo, la distribución *mismatch*, es decir la distribución de las secuencias pareadas entre secuencias de una población, produjo una distribución con tendencia unimodal para *COI* y multimodal para *16S*, cuando se le dio el supuesto de una población que sigue el modelo de expansión reciente (Figs.38 y 39); lo que sería indicativo de una tendencia de

las poblaciones de *M. gallus* a la expansión poblacional para el primer caso y estabilidad para el segundo caso.

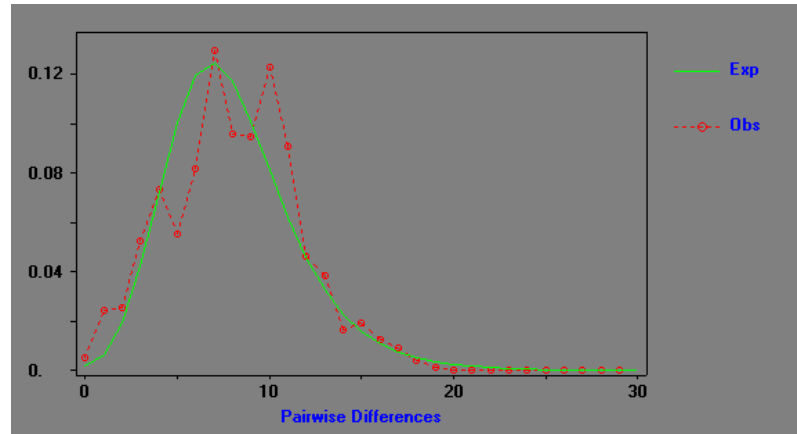


Fig. 38: Análisis de *mismatch*: Distribución de frecuencias observadas y esperadas del gen *COI* -*M. gallus* de los ríos Zarumilla y Tumbes, bajo el supuesto de tamaño poblacional en expansión

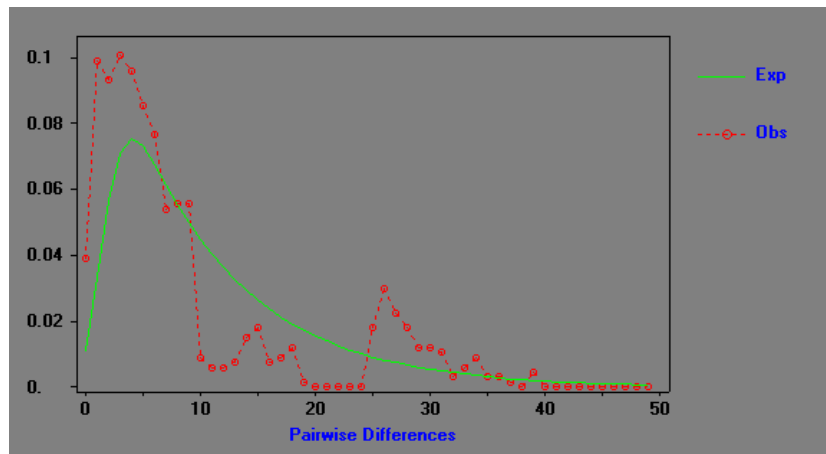


Fig. 39: Análisis de *mismatch*: Distribución de frecuencias observadas y esperadas del gen *16S* - *M. gallus* de los ríos Zarumilla y Tumbes, bajo el supuesto de tamaño poblacional en expansión

3.6.5.6 Análisis Filogenéticos

Los dos métodos de análisis filogenético, MP e IB, realizados para las 40 secuencias obtenidas para el gen *COI* (Figs. 40 y 41, Anexo 02), permitieron

construir árboles, en donde todas las secuencias si bien se incluyen en el mismo clado, muestra dentro de éste agrupaciones a los que podría denominarse subclados, pero que incluyen secuencias tanto del río Tumbes como del Zarumilla.

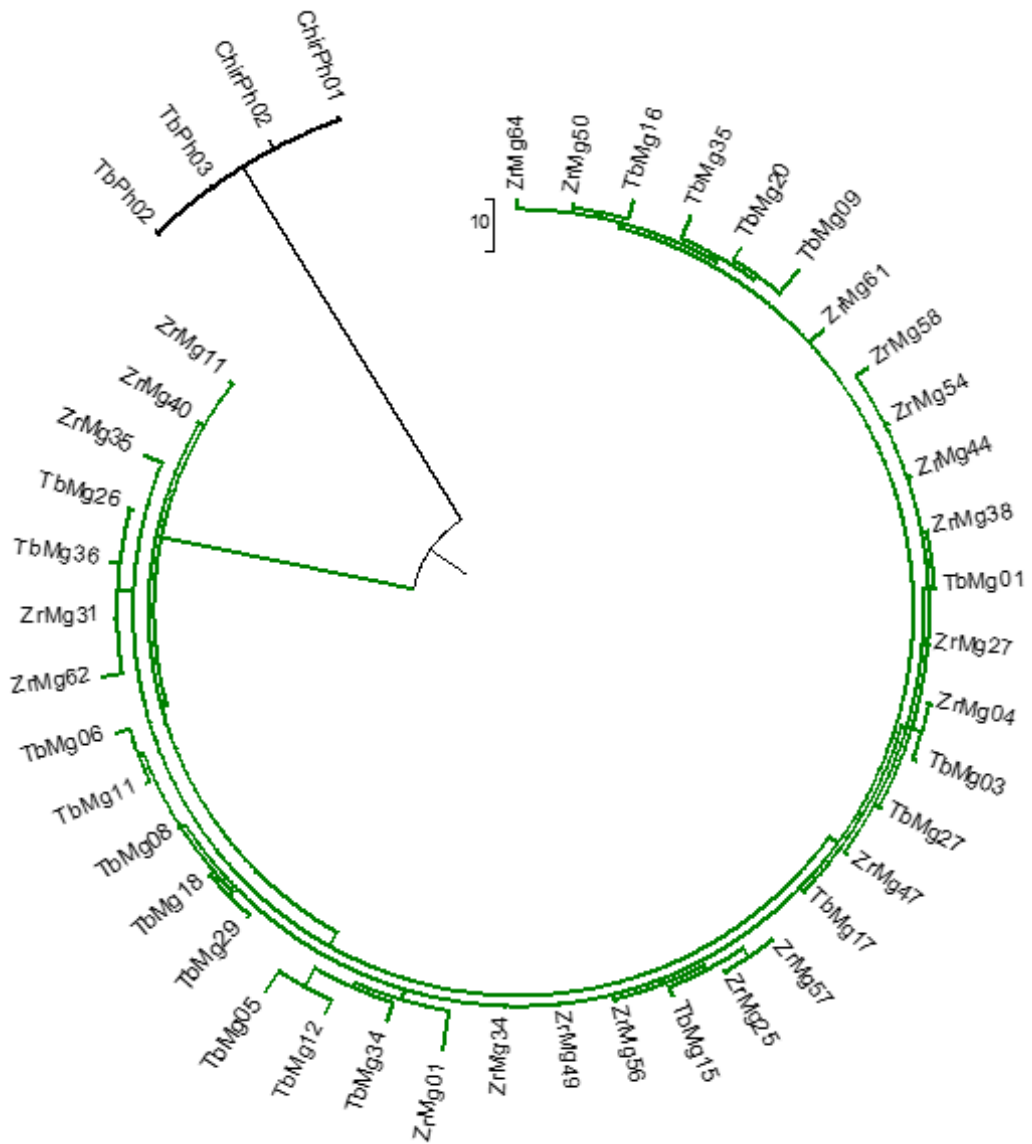


Fig. 40: Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima Parsimonia (MP), usando la función Kimura – 2P1 a partir de las 40 secuencias del gen *COI* - *M. gallus*

Las 37 secuencias parciales del gen *16S* (Figs. 42 y 43 Anexo 02) determinan con los dos métodos de reconstrucción filogenética (MB e IB), un árbol con la topología similar al construido con las secuencias del gen *COI*. Sin embargo, los subclados son menos notorios, a excepción de las secuencias TbMg17, TbMg16 y TbMg1, que se organizan en un subclado muy notorio.

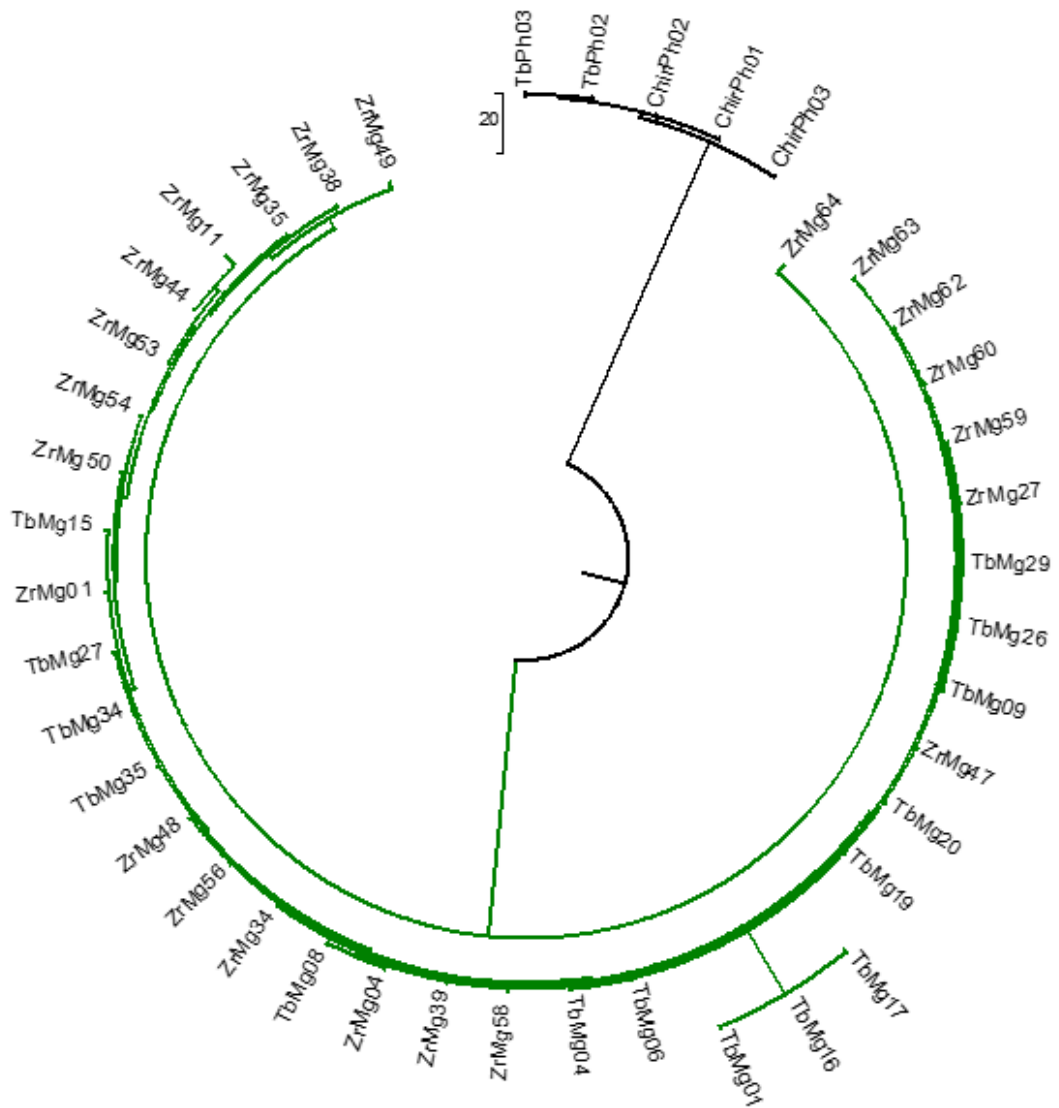


Fig. 42: Comparación de la forma radial de árbol filogenético construido con el algoritmo MP, usando la función Kimura – 2P1 a partir de las 37 secuencias del gen *16S-M. gallus*

La concatenación de los genes *COI* y *16S* dio el mismo comportamiento que los genes aislados, en todos los algoritmos empleados.

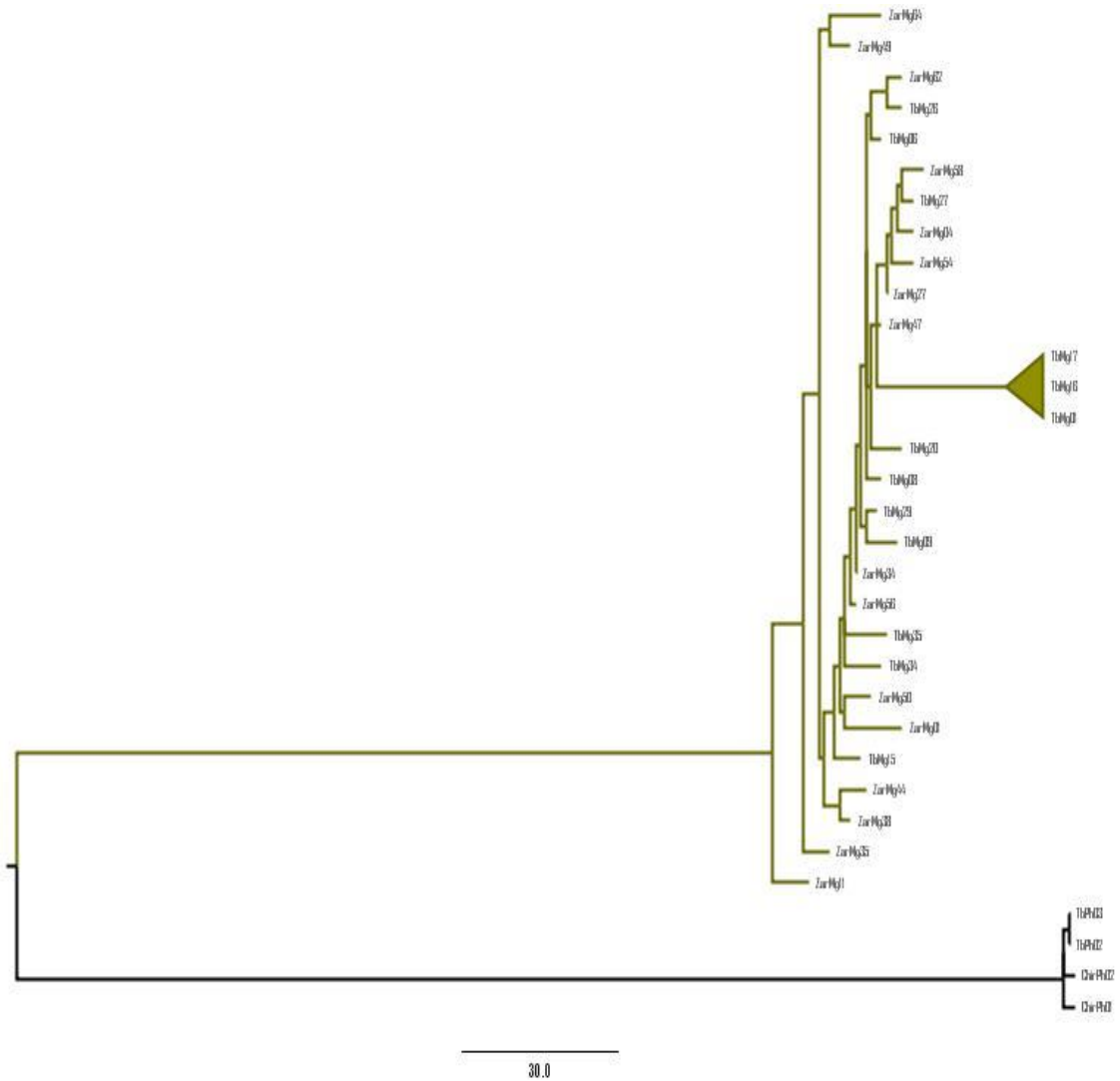


Fig. 44: Árbol filogenético concatenado de las secuencias parciales de los genes *COI-16S* de *M. gallus*: construido con el algoritmo MP usando la función Kimura – 2P

3.6.5.7 Estructura Poblacional

El AMOVA para las frecuencias de los haplotipos de *COI* mostraron resultados estadísticos parecidos cuando los dos ríos se consideraron aislados que cuando se consideró todo como una sola población (Tablas 62 y 63), variando sólo el valor de *p*, el que se hizo no significativo cuando se consideraron los datos como una sola población.

Tabla 62: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *COI* de *M. gallus* para los dos ríos muestreados, estructurado en dos grupos

Fuente de variación	d.f	Varianza	Estadístico	Porcentaje de Variación	P
Entre grupos		0.08742	0.02141 (FST)	2.14071	0.03910
Dentro de las poblaciones		3.99631		97.85929	

Tabla 63: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las secuencias del gen mitocondrial *COI* de *M. gallus* para los dos ríos muestreados, sin estructuración en grupos

Fuente de variación	d.f	Varianza	Estadístico	Porcentaje de Variación	P
Entre grupos	1	0.08742	0.02141 (FST)	2.14	0.09580
Dentro de las poblaciones	38	3.99631		97.86	

P < 0.05

Los resultados del AMOVA indican que, si bien existe una pequeña variación entre ambos ríos, la mayor variación es intrapoblacional. El AMOVA es soportado por el *pairwise* respectivo (Tabla 64, Anexo 01). Con respecto al AMOVA de las secuencias parciales del gen *16S*, debe mencionarse que no se pudieron obtener con el programa Arlequin.

3.7 DISCUSIÓN

Estructura Poblacional de *Macrobrachium inca* basada en secuencias parciales de los genes Citocromo oxidasa I (*COI*) y *r16SDNA (16S)*

M. inca, especie considerada como endémica de los ríos del Pacífico peruano (Wasiw y Yépez, 2017; Yépez, 2009; Zacarías y Yépez, 2008; Anger, 2013), presentó su distribución a lo largo de todos los ríos de la costa norte-centro peruana, desde Zarumilla hasta Supe, no registrándose especímenes en el río Huaura, que es el punto más amplio de su distribución (Amaya y Guerra, 1976), a pesar de que fue muestreada la parte baja de la cuenca.

Estadísticas básicas de las secuencias

Las secuencias de *COI* y *16S* presentan composición nucleotídica rica en adenina y timina, coincidiendo con lo reportado para las especies de *Macrobrachium* presentes en México y Brasil (García, 2014; Acuña *et al.*, 2013; Vergamini *et al.*, 2011; Hernández, 2007), en la región Indo Pacífico (Murphy y Austin, 2003; Liu *et al.*, 2007; Munasinghe, 2010). Además de ello, el gen *16S* es particularmente rico en AT en los palaemónidos (Munashinge, 2010), comprobado en las secuencias parciales del gen *16S* obtenidas en el presente estudio, en donde el par AT presentó un porcentaje mayor al 60%, mientras que, para las secuencias parciales de *COI*, sólo fue ligeramente mayor a 50%. Con respecto a las sustituciones, el hecho de que las transiciones sean hasta cuatro veces las transversiones, debe de considerarse como mutaciones defectuosas, que es característico de algunos genes como *COI* y *16S* (Vandame, 2003).

Diversidad Genética

Para entender la dinámica poblacional, inicialmente con el gen *COI*, debe mencionarse que este gen ha sido usado en más de 30 estudios y es especialmente informativo a nivel de taxones inferiores, con una buena resolución a nivel de especie y algunas veces a nivel de familia (Lefébure *et al.*, 2006; Toon *et al.*, 2009; Matzen *et al.*, 2011). Con respecto a *16S*, si bien últimamente se ha considerado que produce pobre resolución en reconstrucción filogenética (Chen *et al.*, 2009), su uso para estudios filogeográficos a nivel intrapoblacional de camarones *Macrobrachium*, es más aceptado (Murphy y Austin, 2004; de Bruyn *et al.*, 2004; Liu y Zheng, 2011).

Los elevados valores de diversidad de haplotipos, pero bastante bajos en la diversidad nucleotídica, que en líneas generales caracterizan a las secuencias obtenidas de estos genes en el presente estudio, es común en especies marinas y son frecuentemente atribuidos a una reducción poblacional, seguida de una expansión demográfica un tanto acelerada (Avise *et al.*, 1994), que se evidencia además por el número de haplotipos únicos o privados en todos los ríos muestreados (Tablas 30 y 31).

Análisis de Haplotipos

El análisis de haplotipos es útil para realizar un análisis filogeográfico al observar la topología que adopta la red de haplotipos. En nuestro estudio, la topología adoptada (Figs. 25 y 26) demuestra en términos generales una posición central para los haplotipos más comunes, mientras que los haplotipos de menor frecuencia, es decir los haplotipos únicos o periféricos, aparecen irradiados a partir de las esferas comunes; indicando que, a partir de un grupo de haplotipos posiblemente ancestrales y que se mantuvieron durante la reducción poblacional, van apareciendo

nuevas combinaciones, que dependiendo del *fitness* que le proporcionen a los individuos que los portan, podrían irse afiatando en la población (Cook *et al.*, 2002; Slatkin y Hudson, 1991). El haplotipo central con mayor frecuencia puede ser el haplotipo más antiguo, esperándose que éstos tengan mayor distribución geográfica al tener mayor tiempo para su dispersión (García, 2014), como comúnmente ocurre en las especies *Macrobrachium* (Cook *et al.*, 2002).

Haciendo un análisis individual de los haplotipos de cada gen, se observa que para las secuencias parciales del gen *COI*, de los 171 haplotipos encontrados, 46.9% son haplotipos únicos, mientras que el 53.1% son haplotipos compartidos; y de ellos, el más común es el que prevalece en todos los ríos y en casi todos, es el de mayor frecuencia. Puede notarse, además, que el patrón de los haplotipos es parecido sobre todo desde los ríos de Lambayeque hacia el sur, mientras que en los casos de los ríos que muestran una baja cantidad de haplotipos como son los ríos Tumbes y Chira, probablemente se deba a la poca cantidad de individuos capturados. Se destaca, además, que el número total de haplotipos encontrados con las secuencias de este gen es mayor a los encontrados en otras especies de *Macrobrachium* (Carini y Hughes, 2004; Hernández, 2007; García, 2014; de Bruyn, 2004).

Por otro lado, en relación al gen *I6S*, se hace evidente con mayor fuerza la presencia de haplotipos comunes. Al hecho de encontrarse el haplotipo más común en todas las poblaciones muestreadas, y además en todas ellas encontrarse otros haplotipos también comunes (segundo, tercer y cuarto haplotipo más común y otros haplotipos compartidos en 12 de las 15 poblaciones) que en suma hace el 86.14%, muestra que éstos han tenido tiempo para dispersarse, lo que demuestra una alta conectividad y libre flujo de genes entre las cuencas muestreadas. Este comportamiento de haplotipos comunes con una amplia distribución geográfica, a partir de los cuales

se irradian haplotipos periféricos, es común en las especies *Macrobrachium* (García, 2014; Cook *et al.*, 2002; de Bruyn, 2004).

No se ha detectado alguna relación clara entre el tipo y cantidad de haplotipos con relación al tiempo de muestreo, ni en los ríos en donde los ejemplares (n muestral) fueron adquiridos en una sola fecha, ni en aquéllos en donde el total de especímenes/río se obtuvo en diferentes fechas. Así por ejemplo en los ríos Chao, Nepeña, Chicama, Fortaleza, Supe, Juana Ríos, Zaña con una sola fecha de muestreo se obtuvieron secuencias de ambos genes que representan haplotipos comunes y únicos, así como haplotipos compartidos; y en el caso de los ríos muestreados en diferentes fechas, como Lacramarca, Moche, Virú, Tumbes, los haplotipos compartidos y concretamente el haplotipo más común, se encontró en diferentes fechas de muestreo, con una diferencia temporal de hasta dos años. Tampoco se detecta alguna relación entre el número de haplotipos y la temporada en la que los ejemplares se obtuvieron (Tabla 27, Anexo 1).

De los dos marcadores usados el que dió mayor información es el gen *COI*, que presentó un total de 171 haplotipos, en comparación de los 60 haplotipos para el gen *16S*, considerándose, sin embargo, en ambos casos, valores parecidos a los encontrados para crustáceos marinos (Bucklin *et al.*, 1992; Bucklin and Wiebe, 1998) y más altos respecto a otras especies del género *Macrobrachium* (García, 2014; Vergamini *et al.*, 2011; Carini y Hughes, 2004).

Análisis de Patrones Históricos Demográficos

La expansión demográfica ya planteada con el análisis de la red de haplotipos es además corroborada por los tests de neutralidad (Tajima'D y el más sensible Fu'S Fs) basados en los sitios de segregación y en la distribución de haplotipos, que, al ser negativos y significativos, son indicativos de un exceso de haplotipos de baja

frecuencia, que pueden resultar a partir de poblaciones que han sufrido una reciente expansión demográfica (Marín *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2012). Estos resultados son además corroborados con los datos obtenidos en el histograma de distribución *mismatch* (Figs. 38, 40) el que al ser unimodal coincide con el modelo de una población en expansión (Hernández, 2007; Marín *et al.*, 2013; García, 2014), en tanto que poblaciones con modelos multimodales son coincidentes con poblaciones en equilibrio, que no es el caso de los datos en las secuencias parciales de estos dos genes, para las poblaciones de *M. inca*.

Respecto al tiempo de expansión calculado, de 2380 años con 10 hembras y 1087 años con 169 hembras para las secuencias de *COI* y *16S*, respectivamente, son bajos comparados con tiempos calculados para otras especies de camarones de agua dulce, que citan a períodos de expansión de millones de años, que por ejemplo para *M. australiense* se remontan al Pleistoceno (Carini y Hughes, 2004); si bien para algunas especies del género *Macrobrachium* se muestra que tienen tiempos de expansión recientes, con evidencia además de limitado flujo genético (Sharma y Hughes, 2009). Los datos obtenidos que muestran tiempo recientes de expansión se debería a los cambios radicales de las condiciones climatológicas que muestran los ríos costeros con grandes avenidas de agua producto de lluvias intensas ocasionadas por el “Fenómeno El Niño” que coincide con la época de reproducción de todas las especies de los denominados camarones en nuestros ríos. El alto porcentaje de haplotipos únicos, los que según Cook *et al.* (2002) serían de origen reciente, sobre todo para las secuencias del gen *COI*, podrían ser una consecuencia de esos hechos.

Análisis Filogenéticos

La topología de los árboles con ambos genes y con los dos métodos de reconstrucción filogenética empleados, soportan la monofilia de *M. inca*, y además

evidencia que todos los ríos muestreados constituyen una única población. La topología es además coincidente con las distancias genéticas entre los ríos considerados en el presente estudio, en ningún caso alcanza 0.8% de diferencia genética para las secuencias del COI, y 0.4% para las secuencias del gen 16S (Tablas 37 y 38).

Estructura Poblacional

Dentro de la genética de poblaciones, la diferenciación entre grupos es uno de los objetivos fundamentales, con la finalidad de comparar los niveles de variación entre subpoblaciones con el nivel de variación en el total de la población. En ese sentido, la partición de las poblaciones en grupos considerando la distancia entre las cuencas, no evidenció estructuración, comprobando con el AMOVA correspondiente, que las poblaciones de *M. inca* no están estructuradas según *COI*. Si bien, se evidencia un alto porcentaje de haplotipos únicos (46.9%), la presencia de haplotipos comunes en todos los ríos muestreados, estarían indicando la fortaleza de éstos y su arraigo en las poblaciones, evidenciando además un permanente flujo genético.

El flujo genético que ocasiona esta falta de estructuración, probablemente se deba a la dispersión larval por parte de las corrientes. Page *et al.* (2013); Page *et al.* (2005) mencionan al respecto, haber encontrado poblaciones de *Atya scabra* dispersando como larvas a grandes distancias en el Mar Caribe, aproximadamente a unos 2000 Km, aprovechando las corrientes marinas. Las desembocaduras de los ríos costeros del centro-norte peruano, se encuentran separadas unas de otras en promedio 400 Km, por lo que las particiones planteadas no evidenciaron ninguna estructuración.

Los genes suelen contar historias diferentes y arrojar resultados diferentes, como puede verse con las secuencias parciales del gen *I6S*, según las cuales, la población de *M. inca* si estaría ligeramente estructurada, si bien el mayor porcentaje de variación se encuentra dentro de las poblaciones que entre los diferentes ríos muestreados. El estadístico F_{ST} dio positivo, (0.03658 cuando la población no se agrupó y 0.02677 cuando se consideró dos grupos) con valores de significancia. Este resultado es sorprendente, pues al hecho de que los haplotipos comunes sumen el 87.1%, se esperaría encontrar una población más homogénea. Consideramos que probablemente el tipo de mutación que ocasionó los nuevos/únicos haplotipos, son suficientes para causar esa pequeña estructuración.

Por su parte, Vergamini *et al.* (2011) estudiando poblaciones de *M. amazonicum*, encontró estructuración poblacional con una mayor variación entre las poblaciones que dentro de cada población con el gen *COI*. Carini y Hughes (2004) para *M. australiense*, también encontraron fuerte estructuración entre regiones; lo que estaría indicando que, respecto a la estructuración, el comportamiento de los *Macrobrachium* no obedece a un patrón dado, sino que estaría definido por las condiciones geográficas en las que se desarrollan las poblaciones.

La nada o poca estructuración que presentan los genes *COI* y *I6S*, respectivamente en *M. inca*, es concordante con la poca diferencia genética que se encontró entre las poblaciones muestreadas de esta especie, ya mencionada en párrafos anteriores (Tablas 29 y 30); por lo que, para la búsqueda de estructuración en la población de *M. inca* en ríos peruanos, estos genes no serían informativos, o estarían indicando un flujo genético constante entre las poblaciones, probablemente a través de patrones de corrientes superficiales influenciadas por una mezcla de vientos estacionales y mareas (García, 2014; de Bruyn, 2005; Marín, 2013), en virtud de una relativamente prolongada duración larval, sugiriendo que esta dispersión

marina, puede jugar un rol no por muchos reconocido en la historia de vida de estas especies (de Bruyn, 2005). Además de ello, la búsqueda de un lugar “ancestral” a partir del cual *M. inca* irradie a las demás poblaciones, no se ha podido encontrar o no existe para la especie.

Se concluye entonces que el elevado número de haplotipos, la disposición en estrella de la red de haplotipos, la baja diversidad nucleotídica, sumado a los valores negativos de los tests de neutralidad y *mismatch* unimodal, confirman que la población de *M. inca* está en expansión, luego de haber sufrido un evento de cuello de botella (Marín *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2012; García, 2014) o la presencia de mutaciones deletéreas (Eguiarte *et al.*, 2010). La topología de los árboles, no muestran agrupaciones cuyas ramas genealógicas sean significativas y que separen las secuencias de las unidades de origen. Ello sugiere una gran homogeneidad genética entre las poblaciones muestreadas, aceptándose por ello la hipótesis planteada de que *M. inca*, presenta una única población y no está estructurada. La filogenia, además, es también consistente con una expansión poblacional, después de un cuello de botella.

La adopción actual de criterios genéticos y evolutivos en el manejo de recursos naturales ha llevado al reconocimiento de unidades de gestión, que representen poblaciones funcionalmente independientes o no, o grupos de poblaciones que se caractericen por el flujo genético que exista entre ellas (Ramírez-Amaro *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos tienen implicaciones en la propuesta de gestión y conservación de *M. inca* en los ríos del Pacífico peruano, ya que, al sugerir los resultados una población única, con niveles altos de flujo genético, deben ser consideradas como una única unidad de gestión.

**Estructura Poblacional de *Macrobrachium gallus* basada en secuencias
parciales de los genes Citocromo oxidasa I (COI) y r16SDNA (16S)**

Macrobrachium gallus, reportado por Amaya y Guerra (1976) con distribución en todos los ríos del norte del Perú, parece haber desaparecido como especie en los ríos peruanos, ya que sólo se le encontró en los ríos Tumbes y Zarumilla del Departamento de Tumbes, mencionándose además que si bien no se desarrolló la logística de muestreo desplegada por los mencionados autores, se menciona que se por Amaya y Guerra (1976), tampoco se muestrearon las zonas de las bocanas que son los puntos encontrados desde el río Lambayeque hasta el río Huaura

Tal como se presentó para *M. inca*, las secuencias de *COI* y *16S*, presentan composición nucleotídica rica en adenina y timina, por lo que se comprueba nuevamente con lo reportado para las especies de *Macrobrachium* presentes en otras partes del mundo (García, 2014; Acuña *et al.*, 2013; Vergamini *et al.*, 2011; Hernández, 2007), y especies australianas (Murphy y Austin, 2003; Liu *et al.*, 2007; Munasinghe, 2010); aunque para esta especie fueron las secuencias de *COI*, las que presentaron mayor porcentaje de este par de nucleótidos. Con respecto a la diversidad nucleotídica, aunque, si bien en términos generales los valores pueden considerarse bajos, son mayores que los presentados en *M. inca* en ambos genes. Las transiciones también fueron mayores que las transversiones, las que como se ha mencionado, se consideran mutaciones defectuosas, y como lo señala Vandame (2003) es característico de algunos genes como *COI* y *16S*.

Si se considera sólo el número de haplotipos y se compara con los encontrados para *M. inca* (171 y 60, para *COI* y *16S*, respectivamente, podría concluirse de manera errónea que la diversidad de *M. gallus* es baja. Sin embargo, debe de tenerse en cuenta que esta especie sólo ha sido encontrada en dos ríos, por lo que debe de

tenerse en cuenta es el índice, es decir la diversidad de haplotipos, la que es 0.995 y 0.961 para *COI* y *16S*, respectivamente; que es mayor a la diversidad encontrada para *M. inca*. Debe mencionarse, sin embargo, que las poblaciones de ambos ríos son prácticamente diferentes según las secuencias de *COI*, ya que comparten sólo el 10% de información genética, al presentarse 89.5% alelos únicos; mientras que con respecto a *16S*, las poblaciones son más parecidas genéticamente, compartiendo hasta el 40% de información.

A pesar de las pocas muestras, algunos datos son interesantes de resaltar para *M. gallus*: por ejemplo, se menciona que respecto a la distancia genética intrapoblacional, en los dos genes estudiados, son mayores que las distancias encontradas para *M. inca*. Las distancias de *COI* son similares en ambos ríos, pero en las secuencias de *16S* de *M. gallus* hay mayor variabilidad en el río Tumbes, con un 2.36 %, es decir casi el doble de la que presenta el río Zarumilla. Se hace necesario profundizar en el muestreo, en este río y en otros, a fin de que la información que se genere de esta especie sea lo más real posible.

La distancia genética interpoblacional también es menor en *COI* que en *16S*, diferente con lo encontrado por Vergamini *et al.* (2011) en *M. amazonicum*, quienes reportan que los análisis con secuencias de *16S* no fueron informativas por los resultados de la topología de los árboles y la distancia relativa entre poblaciones, por lo que concluyen que la homogeneidad encontrada en esta especie puede estar relacionado a la naturaleza conservadora de este gen. Otros autores (Murphy y Austin, 2004; de Bruyn *et al.*, 2004; Liu y Zheng, 2011), mencionan, sin embargo, que su uso para estudios filogeográficos a nivel intrapoblacional de camarones *Macrobrachium*, es más aceptado.

La red de haplotipos muestra que no existe un haplotipo ancestral antiguo, para ningún pool de secuencias parciales de los dos genes estudiados; este modelo no ha sido observado para ninguna especie de *Macrobrachium*, según la literatura revisada, sino que como lo manifiesta Cook *et al.* (2002), la red con haplotipos ancestrales es lo que caracteriza a las especies *Macrobrachium*. La presencia de una gran cantidad de haplotipos únicos o privados (89.5% y 66.5% para *COI* y *16S*, respectivamente), puede deberse al pequeño tamaño de la muestra (Ramírez-Amaro *et al.*, 2017) requiriéndose de un plan de muestreo con mayor logística para hacer un mejor análisis de la estructura genética espacial de esta especie.

Debe de mencionarse además que al hecho de que el río Zarumilla, permanezca seco la mayor parte del año (Metzger, 2016), puede causar la muerte de gran cantidad de especímenes y por lo tanto de material genético. En el río Tumbes, por el contrario, que al presentar agua todo el año se constituye en el único río navegable de la costa peruana (Quincho, 2015) estarían mejor protegidas sus poblaciones, por lo que no explica la falta de haplotipos ancestrales en la población de *M. gallus* en este río. Debe mencionarse que los especímenes del río Tumbes fueron adquiridos entre los meses de octubre a diciembre del 2013, mientras que en el río Zarumilla, se amplió a febrero y marzo del 2015.

Así mismo, los resultados del *mismatch* para *COI*, al tener tendencia unimodal junto con los valores de neutralidad de F_u ' SF_u altamente significativos, sugieren que esta especie se encuentra en una ligera expansión. Por otro lado, las secuencias del gen *16S* mostraron sólo valores significativos para el río Zarumilla y para el total de la población, lo que aunado con la distribución *mismatch* multimodal sugiere estabilidad demográfica (Ramírez-Amaro *et al.*, 2017). En conjunto, ambos genes estarían sugiriendo que la población está en desequilibrio con menor posibilidad de expansión, aunque Amaya y Guerra (1976) señalaron en su momento, que *M. gallus*

está en expansión, en base a estimación de presencia y abundancia en los ríos desde Zarumilla, hasta Huaura.

El hecho de que los resultados del número de hembras con los que se inició en su momento la expansión, sea alto (274 – 6307 en *M. gallus* vs 10-171 en *M. inca*) no es coincidente con la falta de haplotipos ancestrales; aunque como se está ya mencionando, ello se deba a las pocas secuencias obtenidas. El dominio de haplotipos únicos corresponde y evidencia una dispersión limitada o nula de los organismos de esta especie, a partir de algún posible sitio de origen.

Hernández (2007), estudió cinco especies de *Macrobrachium* en el Pacífico mexicano, encontrando todas las especies en expansión, con networks en forma de estrella y mismatches unimodales, como es el caso también de lo encontrado para *M. inca*, tal como ha sido discutido en el acápite correspondiente a esa especie.

Debe mencionarse nuevamente lo afirmado por Anger (2013) sobre la reproducción de *M. gallus*, especie a la que considera poco conocida, al no encontrarse hembras ovígeras. La experiencia en el muestreo sobre esta especie es la captura de muchos machos adultos y hembras juveniles. Se resalta además el hallazgo de ejemplares adultos y gran cantidad de postlarvas en pequeños charcos ubicados en la zona La Palma, distante a aproximadamente 10 Km de la desembocadura del río Zarumilla (Anexo 12), no reportándose para ningún caso, presencia de hembras ovígeras, como lo encontrado con las otras especies del presente estudio.

La topología de los árboles sólo muestra de manera clara la monofilia de la especie, pero no así una clara falta o no de estructuración en la población. La única rama principal que presentan ambos árboles con las secuencias parciales de los genes *COI* y *16S*, muestra “subramas” que estarían indicando una subestructuración de la población de *M. gallus* en la parte peruana de los ríos Tumbes y Zarumilla.

El AMOVA que, en el presente estudio, sólo fue obtenido para secuencias de *COI*, indica que las poblaciones de ambos ríos serían diferentes con una variación de 2.14%, coincidente con la mayor distancia interpoblacional encontrada para esta especie; pero que, sin embargo, la mayor variación se encuentra dentro de cada población. Sin embargo, vuelve a considerarse que los tamaños de muestra pequeños pueden sobreestimar la división de la población, por lo que en atención a lo que sugieren Ramírez-Amaro *et al.* (2017), se requieren de muestras más grandes, muestreos a una escala más fina no sólo en los ríos reportados en el presente estudio, sino en otros, en donde *M. gallus* ha sido reportado con anterioridad.

Se concluye entonces, que la situación de la población de *M. gallus* muestra algunos resultados contradictorios, difícilmente interpretables, por su falta de correlación en algunos casos. Si las poblaciones realmente están desapareciendo como resultado de modificación de su hábitat, o impacto del hombre, (por ejemplo, excesivo uso del agua para irrigación), Carini y Hughes (2004) sugieren que las posibilidades de recolonización serían bajas. García (2013) menciona que en Latinoamérica en general, las poblaciones de langostinos del género *Macrobrachium* parecen estar desapareciendo, sin datos disponibles de sus capturas dado que la pesca es mayoritariamente artesanal y de subsistencia.

Debe mencionarse además, que una constante comprobada en el presente estudio al llegar a los lugares próximos a los ríos donde habita este recurso, es la afirmación, por parte de los habitantes, que cada vez éste es más escaso. Ello, sin embargo, no debe de evitar que las entidades relacionadas con la conservación de la biodiversidad de los camarones de nuestros ríos establezcan programas para restablecer a esta especie en los lugares antiguamente habitados.

Respecto a la propuesta de gestión y conservación de *M. gallus* en los dos ríos del Pacífico peruano, los datos sugieren que mientras no existan más información con otros marcadores, o se realice un muestreo más fino que reafirmen o rechacen lo encontrado en el presente estudio, ambas poblaciones deben ser consideradas como unidades de gestión diferentes.

3.8 CONCLUSIONES

M. inca es una especie que se caracteriza por haber pasado por una etapa de reducción, seguida de una expansión demográfica, indicado por el bajo índice nucleotídico, elevado porcentaje de haplotipos únicos, forma de estrella de la red de haplotipos, valores negativos de los índices de neutralidad de Tajima y Fu's F_s , y el mismatch unimodal.

El AMOVA definió que la población de *M. inca*, de acuerdo al gen *COI* no está estructurada, pero según el gen *16S* está ligeramente estructurada, con la mayor variación intrapoblacional. Estos resultados sugieren una población única, con niveles altos de flujo genético, por lo que deben ser consideradas como una única unidad de gestión.

La situación de la población de *M. gallus* es menos clara, ya que los resultados de las secuencias parciales de *COI* denotan una población con ligera expansión (*mismatch* con tendencia unimodal junto con los valores de neutralidad de Fu's F_s altamente significativos), mientras que las secuencias del gen *16S* sugieren estabilidad demográfica (distribución *mismatch* con tendencia multimodal). En conjunto, ambos genes estarían sugiriendo que la población está en desequilibrio con menor posibilidad de expansión.

Se concluye que la situación de la población de *M. gallus* muestra algunos resultados contradictorios, difícilmente interpretables, por su falta de correlación en algunos casos. La presencia de un número elevado de haplotipos únicos o privados en ambos ríos y ausencia de haplotipos ancestrales, sugiere que se requiere de muestras más grandes, muestreos a una escala más fina no sólo en los ríos reportados en el presente estudio, sino en otros, en donde *M. gallus* ha sido reportado con anterioridad.

Respecto a la propuesta de gestión y conservación de *M. gallus* en los dos ríos del Pacífico peruano, los datos sugieren que mientras no existan otros datos con otros marcadores o se realice un muestreo más fino, que reafirmen o contradigan lo encontrado en el presente estudio, ambas poblaciones deben ser consideradas como unidades de gestión diferentes.

4.0 RECOMENDACIONES GENERALES

- Considerar más puntos en los ríos de mayor concentración de camarones *Macrobrachium*
- Realizar un análisis entre las especies consideradas como *M. digueti* y *M. transandicum* con otras variables morfológicas a las consideradas en las claves propuestas en el país para camarones *Macrobrachium*.
- Estudiar una muestra mayor de *M. gallus* de los ríos Tumbes y Zarumilla y asignar mayor esfuerzo logístico en los demás ríos en dónde está considerada su distribución.
- Incluir otros genes nucleares como *18S* y/o microsatélites que ayude a dilucidar algunos conflictos no aclarados en el presente estudio.
- Realizar un estudio de la variabilidad genética de *M. americanum*, especie que por su gran tamaño es potencialmente adecuada para la acuicultura.

5.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, D. 2015. Crecimiento de *Macrobrachium inca* “camarón de río” alimentado con dos dietas comerciales para langostino (Nicovita y Expalsa) en un sistema de cultivo intensivo con recirculación. Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología Pesquera. Universidad Pedro Ruiz Gallo. <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/256>.

Acuña, E.; F. Alvarez; L. Villalobos and L. Eguiarte. 2013. Molecular phylogeny of Mexican species of freshwater prawn genus *Macrobrachium* (decapoda: Palaemidae: Palaemoninae). *Hidrobiologica* 23(3):276-285.

Ahyong, S. T.; J. K. Lowry; M. Alonso; R. N. Bamber; G. A. Boxshall; P. Castro; S. Gerken; G. S. Karaman; J. W. Goy; D. S. Jones; K. Meland; D. C. Rogers and J. Svavarsson. 2011. Subphylum Crustacea Brünnich, 1772. In Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness, Z. Q. Zhang (ed.). *Zootaxa* 3148:165-191.

Alvarez, J. 2011. Análisis filogenético molecular: Diseño e implementación de algoritmos escalables y fiables y verificación automática de propiedades de una filogenia. Tesis de Master. Universidad de Zaragoza: 54.

Alemán, A. and V. Ramos. 2000. Northern Andes. Tectonic evolution of South America: 453-480.

Amaya, J y A. Guerra. 1976. Especies de Camarones de los Ríos Norteños del Perú y su Distribución. Convenio Ministerio de Pesquería – Universidad Nacional de Trujillo: 58.

Anger, K. 2013. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): On the biology, origin and radiation of freshwater – invading shrimp. *Journal of Crustacean Biology*. 33(2): 151-183.

Arica, E. y J. Barrientos. 2013. Reproducción y Desarrollo Larval de Camarón de Río (*Macrobrachium americanum*) en Laboratorio. Tesis Facultad de Pesquería, Universidad Nacional de Tumbes:67.

Avise, J. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3–15.

Avise, J.; W. Nelson and C. Sibley. 1994. DNA sequence support for a close phylogenetic relationship between some storks and New World vultures. *Evolution* Vol. 91: 5173-5177.

Avise J., J. Arnold, R. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. Neigel, C. Reeb, and N. Saunders. 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:489-522.

Ayarza, J.; R. del Águila; C. García y F. Alcántara. 2006. Pesquería y biología reproductiva del camarón de río *Macrobrachium amazonicum*, en las cochas Macutari, Pungal y Grnade. Reserva Nacional Pacaya Samiria, Loreto. Comunicación Científica - CIVA 2006 (<http://www.civa2006.org>), 1-8.

Bacon, C.; A. Mora; W. Wagner and C. Jaramillo. 2013. Testing geological models of evolution of the Isthmus of Panama in a phylogenetic framework. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 171: 287-300.

Bacon, C.; D. Silvestro; C. Jaramillo; B. Smith; P. Chakrabarty and A. Antonelli. 2015. Biological evidence supports an early and complex emergence of the Isthmus of Panama. *Proc. Natl. Acad Sci (PNAS)* 112 (19):6110-6115.

Bacon, C.; P. Molnar; A. Antonelli; A. J. Crawford; C. Montes and M. C. Vallejo-Pareja. 2016. Quaternary glaciation and the Great American Biotic Interchange. The Geological Society of America. *Geology*. doi:10.1130/G37624.1.

Baldwin, J.; A. Bass; B. Bowen and W. Clark. 1998. Molecular Phylogeny and Biogeography of the Marine Shrimp *Penaeus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 10, No. 3: 399–407.

Bandelt, H. P. Forster and A. Rohlf. 1999. Median – Joining network for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*.

Barnes, R. 1989. Zoología de los Invertebrados. Editorial Interamericana.

Bargues, M.; A. Marcilla; J. Ramsey; J. Dujardin; C. Schofield and S. Mas-Coma. 2000. Nuclear rDNA-based Molecular Clock of the Evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 95(4): 567-573.

Bastidas, O. 2015. Bioecología del camarón de río amazónico *Macrobrachium brasiliense*. Monografía previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Ecuador: 75.

Bate, C. 1868. On a new genus, with four new species, of freshwater prawns. *Proceedings of the Zoological Society of London*: 363-368. <http://biostor.org/reference/60171>.

Bauer, R. 2011. Amphidromy and migrations of freshwater shrimps. I. Costs, benefits, evolutionary origins, and an unusual case of amphidromy. *New frontiers in Crustacean Biology*: 145-156.

Bauza, M.; D. Jaume; C. Juan and J. Pons. 2009. The complete mitochondrial genome of the subterranean crustacean *Metacrangonyx longipes* (Amphipoda): A unique gene order and extremely short control region. *Mitochondrial DNA*. Vol 20(4): 1-12.

Bermingham, E. and P. Martin. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology* 7: 499–517.

Bermingham, E.; S. McCafferti and A. Martin. 1997. Fish Biogeography and Molecular Clocks: Perspectives from the Panamanian Isthmus. *Smithsonian Tropical Research Institute*. Panama

Bermingham, E. and H. Lessios. 1993. Rate variation of protein and mitochondrial DNA evolution as revealed by sea urchins separated by the Isthmus of Panama. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Evolution*. Vol. 90: 2734-2738

Beu, A. 2001. Gradual Miocene to Pleistocene uplift of the Central American Isthmus: Evidence from tropical American Tonnoidean Gasteropods. *J. Paleont.*, 75(3): 706–720.

Bogenhagen, D. 2009. Biochemical isolation of mtDNA nucleoids from animal cells. *Methods Mol. Biol.* doi: 10.1007/978-1-59745-521-3_1.

Bohonak A. 1999. Dispersal, gene flow, and population structure. *The Quarterly Review of Biology* 74: 21-45.

Bos, D. and D. Posada. 2005. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. *Developmental and Comparative Immunology*. 29: 211–227.

Bowles, D.; K. Aziz and C. Knight. 2000. Macrobrachium (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) in the contiguous United States: A review of the species and an assessment of threats to their survival. *Journal of Crustacean Biology*. 20 (1):158-171.

Bromham, L. and D. Penny. 2003. The Modern Molecular Clock. *Nature Publishing Group* 3: 216- 224.

Brown, W., M. Brown, E. Prager, A. Wang and A. Wilson. 1982. Mitochondrial DNA Sequences of Primates: Tempo and Mode of Evolution. *Journal of Molecular Evolution*. 18: 225-239.

Buchs, D. M.; D. Irving; H. Coombs; R. Miranda; J. Wang; M. Coronado; R. Arrocha; M. Lacerda; C. Goff; E. Almengor; E. Portugal; P. Franceschi; E. Chichaco & S. D. Redwood. 2019. Volcanic contribution to emergence of Central Panama in the Early Miocene. *Scientific Reports* 9:1417. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37790-2>.

Bucklin, A. and H. Wiebe. 1998. Low mitochondrial diversity and Small effective population sizes of the Copepods *Calanus finmarchicus* and *Nannocalanus minor*: Possible impact of Climatic variation during recent Glaciation. *The American Genetic Association* 89:383-392.

Bucklin, A.; B. Frost and T. Kocher. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial 16SrRNA in *Calanus* (Copepoda: Calanoidea): intraspecific and interspecific patterns. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1(6):397-407

Carini, G. and J.M. Hughes. 2004. Population structure of *Macrobrachium australiense* (Decapoda: Palaemonidae) in Western Queensland, Australia: the role of contemporary and historical processes. *Heredity* (93) 350-363.

Castro, J.; A. Picornell; M. Ramon. 1998. Mitochondrial DNA: a tool for population genetics studies. *Internat Microbiol* 1:327–332.

Cerdán, M. y L.A. Sánchez. 2014. Crecimiento de *Macrobrachium inca* “camarón de río” en cuatro densidades de siembra en policultivo con *Dormitator latifrons* “pocoche” y *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* “tilapia híbrida en estanques seminaturales. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología Pesquera. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/805>

Chan, T.; J. Tong; Y. Kit and K. Chu. 2008. Phylogenetic relationships among the genera of the Penaeidae (Crustacea: Decapoda) revealed by mitochondrial 16SrRNA gene sequences. *Zootaxa* 1694: 38–50. ISSN 1175-5334 (online edition).

Chen, R.; C. Tsai, and W. Tzeng. 2009. 16S and 28S rDNA Sequences in phylogenetic analyses of freshwater prawns *Macrobrachium* Bate 1868 from Taiwan. *Journal of Crustacean Biology*, 29(3): 400-412.

Chevaldonné, P.; D. Jollivet; D. Desbruyeres; R. Lutz and R. Vrijenhoek. 2002. Sister-species of eastern Pacific hydrothermal vent worms (Ampharethidae, Alvilienidae; Vestimentifera) provide new mitochondrial COI clock calibration. *Cah. Biol Mar* 43: 367-370.

Chong, O.; F. Vega; R. Arencibia; S. Akintola; L. Michán and F. Cupul. 2015. Research on the river shrimps of the genus *Macrobrachium* (Bate, 1868) (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) with known or potential economic importance:

strengths and weaknesses shown through scientometrics. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 43 (4): 684-690. DOI: 10.3856/vol43-issue4-fulltext-7.

Chu, K.; L. Tsang; K. Ma; T. Chan and P. Ng. 2009. Decapod Phylogeny: What Can Protein-Coding Genes Tell Us? Decapod Crustacean Phylogenetics. Department of Biology, Brigham Young University, Provo, UT 84602, U.S.A *Crustacean Issues* 18::89-109.

Coates, A, and R. Stallard. 2013. How old is the Isthmus of Panama. *Bulletin of Marine Science* 89(4):801-814.

Coates, A. and J. Obando. 1996. The geological evolution of the Central American Isthmus. *Evolution and environment in tropical America*. Ed. por J. Jackson, A.F. Budd and A.G. Coates: 21-56.

Coates, A.; J. Jackson; L. Collins; T. Cronin; H. Dowsett, L. Bybell, P. Jung y J. Obando. 1992. Closure of the Isthmus of Panama: The near-shore marine of Costa Rica and western Panama. *Geological Society of America Bulletin* 104(7):814-828.

Cook, Ch.; Q. Yue and M. Akam. 2005. Mitochondrial genomes suggest that hexapods and crustaceans are mutually paraphyletic. *Proc. R. Soc. B.* 272, 1295–1304. doi:10.1098/rspb.2004.3042.

Cook, B.; S. Bunn and J. Hughes. 2002. Genetic structure and dispersal of *Macrobrachium australiense* (Decapoda: Palaemonidae) in western Queensland, Australia. *Freshwater Biology* 47: 2098-2112.

Craig, M.; P. Hasting and D. Pondella. 2004. Speciation in the Central American Seaway: the importance of taxon sampling in the identification of trans-isthmian geminate pairs. *Journal of Biogeography* 31: 1085-1091

Crandall, K.; J. Fetzner; S. Lawler; M. Kinnersley and Ch. Austin. 1999. Phylogenetic relationships among the Australian and New Zealand genera of freshwater crayfishes. *Australian Journal of Zoology* 47: 199-214

Crandall, K. and J. Fitzpatrick. 1996. Crayfish molecular Systematics: Using a combination of procedures to estimate phylogeny. *Systematic Biology* 45(1):1-26

Darriba D, G. Taboada; R. Doallo and D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8), 772.

Dávila, E.; J. Medina y W. Reyes. 2013. Crecimiento y supervivencia de postlarvas de *Macrobrachium inca* (Holthuis, 1950) (Crustacea, Palaemonidae) alimentadas con ensilado biológico. *Rev Intropica* 8: 78-86.

de Bruyn, M. 2005. Inferring biogeography from the evolutionary history of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). Thesis Doctor of Philosophy Degree. Queensland University of Technology.

de Bruyn, M.; J. Wilson and P. Mather. 2004. Reconciling geography and genealogy: phylogeography of giant freshwater prawns from the Lake Carpentaria region. *Molecular Ecology* 13: 3515–3526.

De Grave, S. and C. Fransen. 2010. Contributions to shrimp taxonomy. *Zootaxa* 2372: 5–6. ISSN 1175-5334 (online edition).

De Grave, S. 2013. *Macrobrachium transandicum*. The IUCN Red List of Threatened Species
:e.T198157A2513897. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T198157A2513897>

de Queiroz, K. 2007. Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology*. 56(6):879–886

Deepak, J. and M. Harikrishnan. 2018. Evolutionary history of genus *Macrobrachium* inferred from mitochondrial markers: a molecular clock approach. *Mitochondrial DNA. Part A. DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*. <https://doi.org/10.1080/24701394.2018.1462347>.

Díaz, N.; L. Sánchez and R. Pérez. 2012. Recent population expansion in the evolutionary history of the Californian anchovy. *Hidrobiológica* 22(3):258-266.

Dick, M.; A. Herrera and J. Jackson. 2003. Molecular phylogeny and phylogeography of free-living Bryozoa (Cupuladriidae) from both sides of the Isthmus of Panama. *Molecular Phylogenetics and Evolution*: 17.

Drummond, A.; J. Suchard; M.; D. Xie, and A. Rambaut. 2012. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29(8): 1969-1973.

Dulcey, J. 2009. Estrategias de Selección del Modelo de Sustitución Nucleotídica versus el número de taxa. *Sistemática Filogenética*, Universidad Industrial de Santander: 7.

Eguiarte L.; V. Souza y X. Aguirre. 2007. *Ecología Molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Universidad Nacional Autónoma de México:592.

Eguiarte, L.; E. Aguirre; E. Scheinvar; A. González y V. Souza. 2010. Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. *Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental*,

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México: 1-30

Eguiarte, L.E.; J. Aguirre-Liguori; L. Jardón-Barbolla; E. Aguirre-Planter y V. Souza. 2013. Genómica de poblaciones: nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, v.16, n.1, p.42-56, 2013

Excoffier, L. and G. Heckel, G. 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature review genetics* 7:745-758.

Eytan; R. 2010. Population genetics and systematics of a species – rich clade of Neotropical Reef fishes, the Tubeblenny genus *Acanthemblemaria*. A Dissertation Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy

Felgenhauer, B. and L. Abele. 1983. Phylogenetic relationships among shrimps – like decapods: 32.

Fransen, C. and S. De Grave. 2009. Evolution and radiation of shrimp-like decapods: an overview. In: Martin, J.W., Crandall, K.A., Felder, D.L. (Eds.), *Decapod Crustacean Phylogenetics*. CRC Press, Boca Raton, pp. 245–259.

Fortunato H. 2008. The Central American land bridge: evolution at work. *Schr. Naturwiss Ver Schlesw-Holst* 70: 56-72.

Freeland, J. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley y Sons Inc.:402.

Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. *Genetics* 147, 915–925.

García, M.; F. Becerril; F. Vega & L. Espinosa. 2013. Los langostinos del género *Macrobrachium* con importancia económica y pesquera en América Latina: conocimiento actual, rol ecológico y conservación. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 41(4): 651-675.

García, C. and C. Magalhaes. 2003. Revisao Taxonómica dos camaroes de água doce (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae, Sergestidae) da Amazonia Peruana: 24

García, C.; M. Chujandama; E. Vásquez y F. Alcántara. 1996. *Macrobrachium nattereri* (Crustacea: Palaemonidae), nuevo registro para el Perú. *Amazonica*. 8(2).

García, H. 2014. Filogeografía de los langostinos del género *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) de la Península de Baja California, México. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Garrick. R.; P. Sunnuck and R. Dyer. 2010. Nuclear gene phylogeography using PHASE: dealing with unresolved genotypes, lost alleles, and systematic bias in parameter estimation. *BMC Evolutionary Biology* (10): 17.

Gíslasoni, O.; J. Svavarsson; H. Halldórsson, and S. Pálsson. 2013. Nuclear Mitochondrial DNA (Numt) in the Atlantic rock crab cancer *Cancer irroratus* Say 1817 (Decapoda, Cancridae) University of Iceland, Reykjavík, Iceland Koninklijke Brill NV, Leiden, 2013 DOI:10.1163/15685403-00003191.

Gómez, A.; A. Guerra; W. Reyes; Em Velásquez y C. González, 1991. Crianza larval de *Macrobrachium gallus* Holthuis 1952 "camarón de río", en dos condiciones de salinidad. *Hidrobios* XV (1-2): 1-6.

González, R. 1975. Algunas consideraciones preliminares sobre el camarón de río *Macrobrachium amazonicum* (Heller) Iquitos Tesis UNAP.

Gouy, M.; S. Guindon, and O. Gascuel. 2010. *SeaView* version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2):221-224.

Guindon, S. and O. Gascuel. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". *Systematic Biology* 52: 696-704.

Hartl, D. Y Clark, A. 1997. Principles of population genetics. Massachusetts: Sinauer Associates.

Haug G.; R. Tiedemann; R. Zahn and A. Ravelo. 2001. Role of Panama uplift on oceanic freshwater balance. *Geology* 29(3):207-210.

Hendrickx, M. and M. Wicksten. 2011. New distribution and records of caridean shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) from the west coast of Mexico. *Hidrobiologica* 21 (1): 26-33.

Hernández, P. 2008. Efecto de la temperatura en el crecimiento y sobrevivencia del langostino *Macrobrachium occidentale* y del acocil *Cherax quadricarinatus*. Tesis para optar el grado de Maestro en Recursos Naturales y Medio Ambientales. Instituto Politécnico Nacional.

Hernández, L. 2007. Revisión Sistemática del género *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) de la Península de Baja California, México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias: 145.

Hernández, R.; C. Fernández y P. Baptista. 1998. Metodología de la Investigación. Segunda edición: 501.

Holthuis, L. 1952. A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. The Subfamily Palaemonidae. Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation 12: 1–396.

Holthuis, L. 1950. Preliminary descriptions of twelve new species of Palaemonid prawns from American waters. Vol. LIII, No. 1: 8.

Horton, B. 2018. Sedimentary record of Andean mountain building. *Earth Science Reviews* 178:279-309. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2017.11.025>

Hu, T.; M. Long; D. Yuan; Z. Zhu; Y. Huang and S. Huang. 2013. The genetic equidistance result: misreading by the molecular clock and neutral theory and reinterpretation nearly half of a century later. *Science China.Life Science*.Vol.56 (3): 254–261. doi: 10.1007/s11427-013-4452-x.

Jarman, S.; S. Nicol; N. Elliot and A. McMinn. 2000. 28SrDNA evolution in the Eumalacostraca and the phylogenetic position of krill. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 17: 26-36.

Jordán, 1908. The Law of Geminat Species. *The American Naturalist*, Vol. 42, No. 494: 73-8.

Kimura, M. 1968. Evolutionary Rate at the Molecular Level. *National Institute of Genetics*:3.

Kimura, M. 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120.

Knowlton, N. and L. Weight. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proc. R. Soc. London*. 265: 2257-2263.

Knowlton N.; L. Weight; L. Solorzano; D. Mills and E. Bermingham. 1993. Divergence in Proteins, Mitochondrial DNA, and Reproductive Compatibility Across the Isthmus of Panama. *Science, New Series*, Vol. 260, No. 5114: 1629-1632.

Kumar, S. 2005. Molecular clocks: four decades of evolution. Nature Publishing Group. Vol 6. 654-662. www.nature.com/reviews/genetics

Kumar S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger data sets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.

Lang, F.; M. Gray and G. Burger. 1999. Mitochondrial Genome Evolution and the origin of the Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 33:351-397.

Lee, M. 2004. The molecularization of taxonomy. *Invertebrate Systematics* 18: 1-6.

Lefébure, T.; C. Douady; M. Gouy and J. Gibert. 2006. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 435–447.

Lemire, B. 2005. Mitochondrial genetics. ber 14, 2005), *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.25.1 <http://www.wormbook.org>.

Lessios, H. 2008. The Great American Schism: Divergence of Marine Organisms After the Rise of the Central American Isthmus. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2008. 39:63–91.

Lessios, H. 1998. The First Stage of Speciation as Seen in Organism Separated by the Isthmus of Panama. *Geographic Speciation in Panama*: 186-201.

Liu, M. Y., Y. Cai, and C. Tzeng. 2007. Molecular systematics of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on East Asian species. *Zoological Studies* 46(3), 272–289.

Liu, M. and C. Tzeng. 2011. Phylogeography and the genetic structure of land-locked freshwater prawn *Macrobrachium asperulum* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) in Taiwan. *Hidrobiologia* 671: 1-12.

Luo, A.; H. Qia; Y. Zhang; W. Shi; S. Ho; W. Xu; A. Zhang and C. Zhu. 2010. Performance of criteria for selecting evolutionary models in phylogenetics: a comprehensive study based on simulated datasets. *BMC Evolutionary Biology* 10:242.

Lodish, H.; A. Berk; P. Matsudaira; C. Kaiser; M. Krieger; M. Scott; S. Zipursky and J. Darnell. 2005. *Biología Celular y Molecular*. Ed. Médica Panamericana. 5a edición: 973p.

Luque, C. 2007. Estudio de la Diversidad Hidrobiológica en Tumbes. Instituto del Mar del Perú. Sede Regional de Tumbes.

McLarney, W.; M. Mafla; A. Arias and D. Bouchonnet. 2010. Amenazas a la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas en el sitio de patrimonio mundial la amistad por las propuestas de represas hidroeléctricas. Panamá- Costa Rica. Asociación ANAI.

Manrique, M.; L. Álvarez y C. Salinas. 2005. Coto de Caza El Angolo. Plan Maestro. 2005-2009.

Manrique, D. 2013 "Efecto de la densidad de siembra en el crecimiento de juveniles de camarón de río (*Macrobrachium amazonicum* Heller), criados en acuarios, Provincia de Alto Amazonas." Tesis para optar el Título de Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

Marín, A.; T. Fujimoto and K. Arai. 2013. Genetic structure of the Peruvian scallop *Argopecten purpuratus* inferred from mitochondrial DNA variation. *Marine Genomics* 9:1-8.

Marko, P. 2002. Fossil Calibration of Molecular Clocks and the Divergence Times of Geminant Species Pairs Separated by the Isthmus of Panama. *Mol. Biol. Evol.* 19(11):2005–2021.

Martin, W.; K. Crandall and D. Felder. 2009. Decapod Crustacean Phylogenetics. *International Standard Book*:633.

Martin, J. and G. Davis. 2001. An up date classification of the recent Crustacea. *Los Angeles Natural History Museum* 39: 1-124.

Martin, A.; G. Naylor and S. Palumbi. 1992. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature* 357:153-155

Matzen, J.; S. Creer; A. dos Santos; A. Costa; M. Cunha; F. Costa and G. Carvalho. 2011. Systematic and Evolutionary Insights Derived from mtDNA COI Barcode Diversity in the Decapoda (Crustacea: Malacostraca). PLoS ONE 6(5): e19449. doi:10.1371/journal.pone.0019449: 15.

Méndez, M. 1981. Claves de identificación y distribución de los langostinos y camarones (Crustacea: Decapoda) del mar y ríos de la Costa del Perú. Boletín Instituto del Mar del Perú. Vol 5:142.

Meruane, A.; M. Morales; C. Galleguillos; M. Rivera y H. Hosokawa. 2006. Experiencias y resultados de investigaciones sobre el camarón de río del norte *Cryphiops caementarius* MOLINA 1782 (Decapoda: Palaemonidae): Historia natural y cultivo. *Gayana* 70 (2): 280-292.

Metzger, L. 2016. Modelamiento hidrológico del río Zarumilla. Sistema Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. Ministerio del Ambiente: 34.

Miura, O., M. Torching and E. Bermingham. 2010. Molecular phylogenetics reveals differential divergence of coastal snails separated by the Isthmus of Panama. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.

Molnar, P. 2008. Closing of the Central American Seaway and the Ice Age: A critical review. *Paleoceanography*, 23, PA2201, doi:10.1029/2007PA001574.

Montreuil, V.; J. Maco; S. Tello; R. Ismiño y H. Sánchez. 1990. Cuadro ambiental de la cocha Carocurahuaite y posibilidades de explotación del camarón de río (*Macrobrachium amazonicum*). *Folia Amazonica IIAP* (2): 97-130.

Montes, C.; A. Cardona; C. Jaramillo; A. Pardo; J. C. Silva; V. Valencia; C. Ayala; L. C. Pérez-Angel; L. A. Rodríguez-Parra; V. Ramirez; H. Niño. 2015. Middle Miocene closure of the Central American Seaway. *Paleoceanography*. doi: 10.1126/science.aaa2815 · Source: PubMed.

Moreno, A. 2007. Tamaño efectivo de la Población. Eguiarte L.; V. Souza y X. Aguirre, Compiladores. *Ecología Molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Universidad Nacional Autónoma de México:592.

Morrone. J. 2000. El lenguaje de la cladística. Universidad Autónoma de México:104.

Munashinge, D. 2010. Phylogenetic positions of some species of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) in Sri Lanka. *Journal Natural Sci.Foundation Sri Lanka* 38 (3):193-199.

Muñoz, J.; A. Gómez; A. Green, J. Figuerola; F. Amat and C. Rico. 2008. Blackwell Publishing Ltd Phylogeography and local endemism of the native Mediterranean brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca). *Molecular Ecology* 17:3160–3177.

Murphy, N. and C. Austin 2005. Phylogenetics relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. *Journal of Crustacean Biology* 23(1), 169–177.

Murphy, N. and C. Austin. 2004. Multiple origins of the endemic Australian *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) based on 16S rRNA mitochondrial sequences. *Australian Journal of Zoology*, 52: 549–559.

Murphy, N. and C. Austin 2003. Molecular taxonomy and phylogenetics of some species of Australian palaemonid shrimps. *Journal of Crustacean Biology* 23(1), 169–177.

Murphy, N. and C. Austin 2002. A preliminary study of 16S rRNA sequence variation in Australian Macrobrachium shrimps (Palaemonidae: Decapoda) reveals inconsistencies in their current classification. *Invertebrate Systematics*, 16: 697-701.

Murphy, N.; J. Short and Ch. Austin. 2004. Re-examination of the taxonomy of the *Macrobrachium australiense* Holthuis (Decapoda: Palaemonidae) species-complex: molecular evidence for a single species. *Invertebrate Systematics*, 18, 227-232. 1445-5226/04/020227.

Ndong A.; K. Kébé; Ch. Thiaw; T. Diome and M. Sembène. 2012. Genetic Distribution of the Cowpea (*Vigna Unguiculata* (L.) Walp) Bruchid (*Callosobruchus Maculatus* F., Coleoptera, Bruchidae) Populations in Different Agro-Ecological Areas of West Africa. *J. Anim. Sci. Adv.* 2(7):616-630.

Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.

O'Dea, A.; H. Lessios; A. Coates; R. Eytan; S. Restrepo-Moreno; A. Cione; L. Collins; A. de Queiroz; D. Farris; R. Norris; R. Stallard; M. Woodburne; O. Aguilera; M. Aubry; W. Berggren; A. Budd; M. Cozzuol; S. Coppard; H. Duque-Caro⁺; S. Finnegan; G. Gasparini; E. Grossman; K. Johnson; L. Keigwin; N. Knowlton; E. Leigh; J. Leonard-Pingel; P. Marko; N. Pyenson; P. Rachello-Dolmen; E. Soibelzon; Leopoldo Soibelzon; J. Todd; G. Vermeij; Jackson. 2016. Formation of the Isthmus of Panama. *Sci. Adv*; 2:e160083:1-11.

ONERN. 1986. Perfil Ambiental del Perú:386.

Page, T.; L. Torati; B. Cook; A. Binderup; C. Pringle; S. Reuschel; C. Schubart; J. Hughes. 2013. Invertebrés sans frontières: large scales of connectivity of selected freshwater species among Caribbean islands. *Biotropica* 45: 236-244.

Page, T.; A. Baker; B. Cook and J. Hughes. 2005. Historical transoceanic dispersal of a freshwater shrimp: the colonization of South Pacific by the genus *Paratya* (Atyidae). *Journal of Biogeography* 32: 581-593.

Page, T.; J. Short; C. Humphrey; M. Hillyer; J. Hughes. 2008. Molecular systematic of the Kakaducarididae (Crustacea: Decapoda: Caridea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 1003-1014.

Palero, F. and K. Crandall. 2009. Phylogenetic Inference Using Molecular Data. Decapod Crustacean Phylogenetics. Department of Biology, Brigham Young University, Provo, UT 84602, U.S.A *Crustacean Issues* 18: 67-88.

Patterson, N.; A. Price and D. Reich. 2006. Population Structure and Eigenanalysis. *PLoS Genet* 2(12): e190. doi:10.1371/journal.pgen.0020190.

Pereira, G. 1997. A cladistic analysis of the freshwater shrimps of the family Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Caridea). *Acta Biol. Venez.* Vol. 17. Suplemento: 1-69.

Pereira, G., H. De Stefano, J. Staton and B. Farrell. 2002. Phylogenetic relationships in some species of the genus *Macrobrachium*, based on nucleotide sequences of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I. *Modern approach to the study of Crustacea*: 319-322.

Pileggi, L. and F. Mantelatto. 2010. Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. *Invertebrate Systematics*, 24: 194–208.

Pileggi, L.; N. Rossi; I. Wehrtmann and F. Mantelatto. 2014. Molecular perspective on the American transisthmian species of *Macrobrachium* (Caridea, Palaemonidae). *Zookeys* 457: 109-131.

Porter, M.; M. Pérez-Losada and K. Crandall. 2005. Model-based multi-locus estimation of decapod phylogeny and divergence times. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37:355–369

Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*.

Pritchard, J.; S. Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945–959.

Quincho, J. 2015. Estudio experimental del transporte d sedimentos en suspension y fondo y comparación con fórmulas empíricas en los ríos Puyamgo-Tumbes y Zarumilla. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrícola. Universida Nacional Agraria La Molina: 105.

Rambaut, A. 2014. Computer program and documentation distributed by the author, website [http://tree.bio.ed.ac.uk/ software](http://tree.bio.ed.ac.uk/software).

Ramírez.Amaro, S.; D. Ramírez-Macías; R. Vásquez; S. Flores; F. Galván and J. Gutiérrez. 2017. Population structure of the Pacific angel shark (*Squatina*

californica) along the northwestern coast of Mexico based on the mitochondrial DNA control region. *Ciencias Marinas*. Vol. 43 (1): 69-80.

Reyes, W.; E. Velásquez; A. Gómez y A. Martínez. 1992. Influencia de la temperatura del agua en la precrianza de *Macrobrachium panamense* Rathbun 1912, "camarón de río", en acuarios. *Hidrobios XVI* (1-2): 1-8

Reyes, L. 2012. Estudio Genético del camarón de río (*Cryphiops caementarius*) de las Cuencas: Lacramarca, Pativilca, Lurín, Cañete y Río Grande. Tesis para optar el Título de Biólogo. UNFV. Lima-Perú.

Rogers, A.R., Harpending, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 552–569.

Ronquist F.; M. Teslenko; P. van der Mark; D. Ayres; A. Darling; S. Höhna; B. Larget; L. Liu; M. Suchard and J. Huelsenbeck. 2011. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539-542.

Rossi, N. and F. Mantelatto. 2013. Molecular Analysis of the Freshwater Prawn *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) Supports the Existence of a Single Species throughout Its Distribution. *Plos one*. Volume 8. Issue 1

Rossi, N. 2012. Revisao das espécies de *Macrobrachium* Bate, 1868 pertencentes ao complexo *M. olfersii* (Crustacea, Palaemonidae): Analises morfológicas e moleculares. Tese de Maestrado. Universidade de Sao Paulo:136.

Rozas, J.; J. Sánchez; X. Messeuger and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.

Ruiz, I. 2016. Diversidad de crustáceos de la cuenca hidrográfica baja del río Moche - La Libertad 2015. Tesis para optar el título de Biólogo Pequero. Universidad Nacional de Trujillo – Perú.

Sanderson, M.J. 1997. A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Mol. Biol. Evol.* 14:1218–1231

Saunders, N.; L. Kessler and J. Avise. 1986. Genetic variation and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Genetics* 112: 613-627.

Sharma, S. and J. Hughes. 2009. Genetic structure and phylogeography of freshwater shrimps *Macrobrachium australiense* and *Macrobrachium tolmerum*: The role of contemporary and historical events. *Marine and Freshwater Research*, 60: 541-553.

Schubart, C. 2009. Mitochondrial DNA and Decapod Phylogenies: The Importance of Pseudogenes and Primer Optimization. In: *Decapod Crustacean Phylogenetics*. Department of Biology, Brigham Young University, Provo, UT 84602, U.S.A
Crustacean Issues 18:47-65

Schubart, S. and M. Huber. 2006. Genetic comparisons of german populations of the stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Crustacea: Astacidae). *Bull. Fr. Pêche Piscic.*: 1019-1028.

Schubart, C.; J. Neigel; D. Felder. 2000. Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. *Crustacean Issues* 12: 817-830.

- Slatkin, M., Hudson, R.R., 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129, 555–562.
- Sloan, C.; A. Andrew; E. Duell; S. Williams; M. Karagas and J. Moore. 2009. Genetic Population Structure Analysis in New Hampshire Reveals Eastern European Ancestry. *PLoS ONE* 4(9): e6928. doi:10.1371/journal.pone.0006928
- Song, H.; J. Buhay; M. Whiting and K. Crandall. 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105 (36): 13486-13491.
- Sturmbauer, C., J. Levinton and J. Christy. 1996. Molecular phylogeny analysis of fiddler crabs: Test of the hypothesis of increasing behavioral complexity in evolution. *Evolution*. Vol 93: 10855-10857
- Sullivan, C and P. Joyce. 2005. Model Selection in Phylogenetics. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:445–66 doi: 10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152633
- Sun, S.; L. Kong; H. Yu; X. Zheng; R. Yu; L. Dai; Y. Sun; J. Chen; J. Liu; L. Ni; Y. Feng; Z. Yi; S. Zou and J. Lin. 2016. DNA barcoding reveal patterns of species diversity among northwestern Pacific molluscs. *Scientific Reports*.
- Suresh, P.; G. Sasireka and K. Karthikeyan. 2012. Molecular insights into the pylogenetics of spiny lobsters of Gulf of Mannar marine biosphere reserved based on 28S rDNA. *Indian Journal of Biotechnology* Vol 11:182-186.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods), Version 4.0 Beta 10. Sianuer Associates, Suderland

Tagle, A. 1981. Desarrollo Larvario de *Macrobrachium gallus*, Holthuis, 1952 Camarón de Río en Laboratorio. Lambayeque (PE). 1981. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Licenciado en Biología Pesquera: 59 p.

Thorne J.; H. Kishino; I. Painter I.S. 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* 15:1647–1657.

Tajima, F. and M. Nei. 1984. Estimation of Evolutionary Distance between Nucleotide Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1(3):269-285.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. Vol 123 (3):585-595

Tatarenkov, A. and J. Avise. 2007. Rapid concerted evolution in animal mitochondrial DNA. *Proc R. Soc. B.* 274, 1795–1798

Tamura, K.; G. Stecher; D. Paterson; A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12):2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

Tamura, K. 1992. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions When There Are Strong Transition-Transversion and G+C-Content Biases. *Mol. Biol. Evol.* 9(4):678-687.

Tong, J.; T. Chan and K. Chu. 2000. A Preliminary Phylogenetic Analysis of *Metapenaeopsis* (Decapoda: Penaeidae) based on mitochondrial DNA sequences of selected species from Indo-West Pacific. *Journal of Crustacean Biology.* 20(3): 541-549.

Toon, A., M. Finley, J. Staples and K. Crandall. J. 2009. Decapod Phylogenetics and Molecular Evolution. In: *Decapod Crustacean Phylogenetics*. Department of Biology, Brigham Young University, Provo, UT 84602, U.S.A *Crustacean Issues* 18: 9-22.

Tresierra, A. 2010. Metodología de la Investigación Científica: 183.

Tringali, M., T. Bert, S. Seyoum, E. Bermingham and D. Bartolacci. 1999. Molecular Phylogenetics and Ecological Diversification of the Transisthmian Fish Genus *Centropomus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol.13, No.1: 193–207.

Valcárcel V., Draper I. & Aguado M. 2012. Introducción a las filogenias moleculares: breve manual. Open Course Ware UAM: <http://ocw.uam.es/cursos.htm>.

Valencia D. and M. Campos. 2007. Freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) of Colombia. *Zootaxa* 1456: 1–44.

Vandame, A. 2003. Basic concepts in molecular evolution. *The Phylogenetic handbook a practical approach to DNA and protein phylogeny*. Cambridge:1-23.

Vergamini, F.; G. Vergamini; L. Pileggi and F. Mantelatto. 2011. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Contributions to Zoology*, 80 (1): 67-83.

Viacava, M.; R. Aitken y J. Llanos. 1978. Estudio del camarón en el Perú 1975-1976. *Bol. Inst. Mar Perú*. 3(5): 159-232.

Villalobos, A. 1968. Problemas de especiación en América de un grupo de Palaemonidae del género *Macrobrachium*. *FAO. Fisheries Reports* 3:1015-1073.

Wasiw, J. y V. Yépez P. 2017. Evolución de la Condición Poblacional del Camarón *Cryphiops caementarius* en el Río Cañete (2000-2015). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, RIVEP*, vol. 28, núm. 1, 2017, pp. 13-32. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Wehrtmann, I. and R. Bauer. 2013. Studies on Freshwater Decapods in Latin America. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 41(4).

Werle, E.; C. Shneider; M. Renner; M. Völker; W. Fiehn. 1994. Convenient single-step purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Research*, Volume 22, Issue 20, 11 October 1994, Pages 4354–4355. <https://doi.org/10.1093/nar/22.20.4354>

Wertheim, J.; M.J. Sanderson; M. Worobey; A. Bjork. 2010. Relaxed molecular clocks, trade-off, and the quality of phylogenetic inference. *Syst. Biol*; 59:1–8. [PubMed: 20525616].

Wilson, K.; V. Cahill; E. Ballment and J. Benzie. 2000. The Complete Sequence of the Mitochondrial Genome of the Crustacean *Penaeus monodon*: Are Malacostracan Crustaceans more closely related to Insects than to Branchiopods? *Mol. Mol.Evol.* 17 (6): 863-874.

Woong, A. 2010. Issues in the Phylogeny and Phylogeography of selected American Freshwaters Prawns (Caridea: Palaemonidae. 21st International Senckenberg Conference Biology of Freshwaters Decapods.

Xia, X. and P. Lemey. 2009. Assessing substitution saturation with DAMBE. DOI: 10.1017/CBO9780511819049.022.

Yépez, C. 2009. Consideraciones acerca de la distribución del recurso “camarón de río” en ríos de la costa peruana. *Pesca* 101(7-8):9-11.

Zacarías, S. y V. Yépez. 2008. Monitoreo poblacional del camarón de río, estimación de abundancia de adultos en río de la costa centro y sur. Informe Anual 2007. Instituto del Mar del Perú: 1-34.

Zhang Q.; Q. Cheng and W. Guan. 2009. Mitochondrial COI Gene Sequence Variation and Taxonomic Status of Three *Macrobrachium* Species. *Zoological Research*. 30(6):613-619.

Zuckerkandl, E. and L. Pauling. 1965. Molecules as Documents of Evolutionary History. *J. Theoret. Biol.* (8): 357-366.

6.0 ANEXOS

ANEXO 01

TABLAS COMPLEMENTARIAS

Tabla 21: Distancias genéticas (d) *intrasibling* del gen *COI* para las especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano unidas a las especies gemelas del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

	Distancia	S
Gm1: Amxcar	0.060357064	0.007398743
Gm2: dg x olf	0.09409825 0.108520837*	0.010190738 0.009445883*
<i>C. caementarius</i>	n/c	n/c

*Considerando también secuencias de *M. olfersii* del genbank

Tabla 22: Distancias genéticas (d) *intersibling* del gen *COI* para las especies de *Macrobrachium* del Pacífico peruano unidas a las especies gemelas del Atlántico, basados en el modelo Kimura-2P con 10000 *bootstrap*

	Gm1: amxcar	Gm2: dg x olf	Outgroup
Gm1: amxcar		0.0163169272 0.0156242227*	0.0209820950 0.0207946730*
Gm2: dg x olf	0.1920417890 0.1865039358*		0.0198679361
<i>C. caementarius</i>	0.2229379078	0.2219803625 0.2164948195*	

Tabla 27: Número total de especímenes de *M. inca* y *M. gallus* y haplotipos obtenidos por fecha de muestreo. El color negro indica haplotipos compartidos, y el color celeste indica haplotipos únicos

Río	<i>M. inca</i>	Fecha colecta	Haplotipos (COI)	Haplotipos (16S)	<i>M. gallus</i>	Fecha colecta	Haplotipos (COI)	Haplotipos (16S)
Zarumilla	ZrMi01 al ZrMi15	31.05.14	7(4), 8, 12, 13 14, 15, 16, 17, 18, 19	1(11)	ZarMg01 al ZarMg55	08.12.13	7, 8, 9(2), 10, 11,12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17
	ZrMi16	19.02.15	11	10	ZarMg56 al ZarMg68	03.02.15	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3(2), 4, 5, 6
	ZrMi17 al ZrMi27	05.03.15	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7(2), 8, 9	1(2), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	ZarMg69 al ZarMg71	10.06.16		
Tumbes	TbMi01 al TbMi10	08.12.13	48, 49, 50, 51	1(2), 16(2)	TbMg01, TbMg03, TbMg04, TbMg11, TbMg13, TbMg20-TbMg24	08.12.13	13, 25, 26, 31, 36	3(3), 22
	TbMi12 al TbMi15		7		TbMg05, TbMg08-TbMg10, TbMg12, TbMg14-TbMg17; TbMg26-TbMg27, TbMg29-TbMg37	09.12.13	16, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35	4(2), 16, 18, 19(2), 20, 21, 22, 23, 24
	TbMi16 al TbMi21	23.10.13			TbMg38 al TbMg44	05.03.15		12
	TbMi11							
Chira	ChirMi01 al ChirMi05	08.02.14	7(3), 133, 134	1, 5, 53				
	ChirMi06 al ChirMi11	03.11.14	132	1, 52(2)				
Juana Ríos	JRMi01 al JRMi19	03.02.16	7(6), 8(2), 30, 110, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171	1(10), 5(3), 15, 16, 36, 53, 60				
Zaña	ZñMi13 al ZñMi45	10.01.15	7(3), 8, 15, 20, 21, 22(2), 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33	1(16), 5(2), 11, 12, 13, 14, 15(2), 16(2), 17, 18				
Chicama	ChicMi01 al ChicMi58	18.03.14	7(10), 8(2), 9, 16, 30, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146	1(17), 2, 5(2), 15(2), 16(2), 32, 54, 55, 56				
Moche	MochMi01 al MochMi03	09.09.14	50	1(3)				

	MochMi04 al MochMi07	07.02.15	1, 7, 100, 101,102	1, 5, 37, 41				
	MochMi08 al MochMi33	10.02.16	1, 7(3), 8, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99	1(17), 15(2), 24, 26, 39, 40				
Virú	VirMi01	13.08.14	7	1				
	VirMi02	06.05.14						
	Vir03 al VirMi47	01-06.10.14	7(5), 8(4), 21, 30, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47	1(12), 5(2), 15(4), 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 47				
Chao	ChaoMi01 al ChaoMi42	20.10.14	7(7), 8, 30, 50(2), 135, 147-164	1(22), 5(2), 15(2), 16(2), 57, 58, 59				
Santa	SanMi01 al SanMi23	01.03.15	7(4), 8, 9, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74	1(7), 5(2), 15(2), 16(2), 26, 27, 28, 29				
	SanMi24 al SanMi34	15.03.15	7 (3), 21, 63, 64, 65	1(5), 5, 18, 24, 25,				
Lacramarca	LcrMi01 al LcrMi10	05.08.13	7(2), 9, 93	1(2), 45				
	LcrMi11 al LcrMi21	02.12.15	7(4), 8(2), 30, 50, 68, 108, 109, 110, 111	1(4), 5(2), 15, 44				
	LcrMi22 al LcrMi39	28.11.15	7, 8(2), 30, 103, 104, 105, 106, 107	1(4), 15(2), 18, 36, 42, 43				
Nepeña	HbMi01 al HbMi29	07.05.14	7(8), 42, 50, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126	1(14), 10, 15(2), 38, 46, 47, 48, 49, 50				
	HbMi30 al HbMi36	21.01.15	112, 113	15				
Fortaleza	ForMi01 al ForMi12	07.05.15	1, 7, 16, 58, 110, 127, 128, 129, 130, 131	2, 5(5), 15(2), 35, 51				
Pativilca	PatMi01 al PatMi34	12.12.14	7(10), 8(3), 45, 50, 65, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81(2), 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88,	1(10), 5(7), 13(2), 18, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38				
Supe	SupMi01 al SuMi08	07.05.15	1, 7, 8, 52, 53, 54, 55, 56, 57,58, 59, 60, 61, 62	1(5), 15				
	SupMi09 al SupMi31	22.05.15	7, 50(2)	1(13), 5(3), 16, 23				

Tabla 32: Comparación de parámetros genéticos básicos en el gen *COI* - *M. inca* según su posición en el codón de inicio

Codón inicio	Sitios Conservados	Número de sitios polimórficos	Sitios parsimoniosamente informativos	Singletones	0	2	4
Posición 1	449/634	185/634	90/634	95/634	400/634	29/634	40/634
Posición 2	449/634	185/634	90/634	95/634	415/634	58/634	96/634
Posición 3	449/634	185/634	90/634	95/634	396/634	88/634	119/634

Tabla 33: Composición nucleotídica del gen *COI*, para *M. inca* en las diferentes posiciones del codón de inicio

Codón inicio	T%	C%	A%	G%	Total
Posición 1	19.4	24.6	25.1	30.8	211
Posición 2	43.4	25.5	13.2	17.9	212
Posición 3	19.4	31.3	37.4	11.9	211
Promedio	27.4	27.1	25.2	20.2	634

Tabla 34: Composición de aminoácidos (%) de las secuencias de *M. inca*, gen *COI*, según posición 3 del marco de lectura

Aminoácido	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu
Promedio	8.1	0	3.33	0.95	7.14	10.48	1.91	6.67	0	15.71
Aminoácido	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr
Promedio	6.19	4.29	6.67	1.43	2.38	7.62	5.71	7.62	2.38	1.43

Sitios Conservados	Sitios Variables	Sitios parsimoniosamente informativos	Singletones
201/210	09/210	2/210	07/210

Tabla 35: Número promedio y frecuencia de uso de codones de las secuencias de *M. inca* del gene *COI*

UUU (F) 4.0(0.53)	UCU (S) 4.0(1.99)	UAU (Y) 0.0 (0.00)	UGU (C) 0.0 (0.00)
UUC (F) 11.0 (1.47)	UCC (S) 1.0 (0.51)	UAC (Y) 3.0 (2.00)	UGC (C) 0.0 (0.00)
UUA (L) 6.0 (1.09)	UCA (S) 5.0 (2.48)	UAA (*) 0.0 (0.00)	UGA (W) 4.0 (1.60)
UUG (L) 1.0 (0.18)	UCG (S) 1.0 (0.51)	UAG (*) 0.0 (0.00)	UGG (W) 1.0 (0.40)
CUU (L) 3.0 (0.55)	CCU (P) 5.0 (1.42)	CAU (H) 1.0 (0.50)	CGU (R) 1.0 (0.80)
CUC (L) 8.0 (1.45)	CCC (P) 4.0 (1.15)	CAC (H) 3.0 (1.50)	CGC (R) 1.0 (0.80)
CUA (L) 12.9 (2.35)	CCA (P) 3.0 (0.87)	CAA (Q) 3.0 (1.99)	CGA (R) 2.0 (1.59)
CUG (L) 2.1 (0.37)	CCG (P) 2.0 (0.57)	CAG (Q) 0.0 (0.01)	CGG (R) 1.0 (0.81)
AUU (I) 9.0 (1.28)	ACU (T) 1.0 (0.34)	AAU (N) 2.0 (0.45)	AGU (S) 0.0 (0.00)
AUC (I) 5.0 (0.72)	ACC (T) 4.0 (1.33)	AAC (N) 7.0 (1.55)	AGC (S) 0.0 (0.00)
AUA (M) 8.5 (1.31)	ACA (T) 5.0 (1.66)	AAA (K) 0.0 (0.00)	AGA (S) 3.9 (1.97)
AUG (M) 4.5 (0.69)	ACG (T) 2.0 (0.67)	AAG (K) 0.0 (0.00)	AGG (S) 1.1 (0.53)
GUU (V) 2.0 (0.50)	GCU(A) 2.0 (0.47)	GAU (D) 2.0 (0.57)	GGU (G) 5.0 (0.90)
GUC (V) 4.0 (1.00)	GCC (A) 7.0 (1.65)	GAC (D) 5.0 (1.43)	GGC (G) 3.0 (0.55)
GUA (V) 7.0 (1.75)	GCA (A) 6.1 (1.43)	GAA (E) 1.9 (1.94)	GGA (G) 10.4 (1.90)
GUG (V) 3.0 (0.75)	GCG (A) 1.9 (0.45)	GAG (E) 0.1 (0.06)	GGG (G) 3.6 (0.65)

Tabla 39: Estimadores de parámetros demográficos utilizados para el análisis del tamaño poblacional, de las secuencias parciales de las secuencias de los genes *COI* y *16S* para *M. inca*

Río	<i>COI</i>			<i>16S</i>		
	Teta inicial (θ_i)	Teta Final (θ_f)	τ (t)	Teta inicial (θ_i)	Teta Final (θ_f)	τ (t)
Juana Ríos	0	15.691	4.041	0.000	3407.185	1.000
Chira	0.002	3.820	5.363	0.000	3629.984	1.750
Chicama	0.002	7.019	5.547	1.125	139.712	0.187
Chao	0.004	33.789	4.408	0.046	0.975	0.975
Fortaleza	1.000	3414.978	3.125	0.028	3508.149	1.375
Nepeña	0.004	16.875	6.109	0.000	3407.185	1.000
Lacramarca	0.003	15.355	3.564	0.000	6827.170	1.500
Moche	1.900	3414.978	2.875	0.696	6898.595	0.254
Pativilca	0.082	11.488	3.977	0.000	6839.370	1.500
Santa	0.012	11.543	4.154	0.450	6838.120	1.000
Supe	2.218	8.303	2.068	0.084	3462.212	0.492
Tumbes	1.000	3414.978	4.000	0.000	3407.185	1.000
Virú	2.800	3674.991	1.250	0.000	3407.185	1.000
Zaña	0.000	18.242	4.855	0.000	3407.185	1.000
Zarumilla	0.207	42.924	4.431	0.000	2.455	2.557
TOTAL	0.019	11.426	4.522	0.154	8769.319	0.989

Tabla 41: Valores encontrados para las pruebas de Neutralidad: Tajima' D y Fu'S Fs para las secuencias parciales de las secuencias de los genes *COI* y *16S* para *M. inca*

Río	COI		16S	
	Tajima' D *	Fu'S Fs **	Tajima' D *	Fu'S Fs **
Juana Ríos	-1.76107	-5.30793	-1.23013***	-4.89711
Chira	-1.26953***	-0.281 ***	-0.67613***	-0.98860***
Chicama	-1.81622	-9.31946	-1.76906	-4.81019
Chao	-2.05415	-18.79904	-1.74581	-3.33462
Fortaleza	-1.28571***	-7.10845	-0.52059***	-1.75772
Nepeña	-2.16319	-9.12384	-1.81329	-9.10622
Lacramarca	-2.00163	-9.15994	-1.65005	-5.28210
Moche	-1.69863	-13.99103	-2.09246	-7.12085
Pativilca	-2.08705	-11.65625	-1.74954	-10.58840
Santa	-1.83508	-11.90268	-1.65398	-8.33906
Supe	-2.02500	-7.19103	-1.31952***	-2.46369
Tumbes	-1.20539***	-1.41093	-1.63299***	-0.54002***
Virú	-1.93773	-10.94600	-1.57977	-7.18800
Zaña	-1.76476	-9.62763	-1.65729	-5.82055
Zarumilla	-1.934	-14.17526	-1.65023	-5.99110
TOTAL	-2.569	-360.167	-2.43427	-28.24929

Tabla 45: Population pairwise FST en 15 poblaciones de *M. inca* basado en la frecuencia de haplotipos de la secuencia parcial del gen *COI*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.00000														
2	-0.00719	0.00000													
3	-0.00934	-0.00268	0.00000												
4	-0.01804	-0.00842	-0.00903	0.00000											
5	0.00282	-0.00528	0.01157	-0.00769	0.00000										
6	-0.01291	-0.01225	-0.00524	-0.01376	-0.00592	0.00000									
7	-0.00614	-0.00677	-0.00600	-0.01023	-0.00729	-0.01058	0.00000								
8	-0.00857	0.00520	-0.00062	-0.02886	0.01356	0.00055	0.00414	0.00000							
9	-0.00944	-0.00440	-0.01468	-0.01232	0.00313	-0.00814	-0.00798	0.00022	0.00000						
10	-0.00376	-0.00824	0.00386	-0.01950	-0.00905	-0.01020	-0.00571	0.00343	0.00224	0.00000					
11	-0.00385	0.02036	0.01170	-0.02041	0.03624	0.01413	0.02555	-0.01181	0.01580	0.01848	0.00000				
12	0.02177	-0.00198	0.03397	0.04336	-0.02000	0.00002	0.00111	0.04582	0.02380	-0.00411	0.08206	0.00000			
13	-0.00607	-0.01033	-0.00045	0.00280	-0.01054	-0.01177	-0.00971	0.01300	-0.00763	-0.00712	0.03116	-0.01412	0.00000		
14	-0.00714	-0.00418	-0.00287	-0.03283	0.00177	-0.00628	-0.00287	-0.00596	-0.00518	-0.00598	0.00382	0.02317	-0.00076	0.00000	
15	-0.01130	-0.01440	-0.01312	-0.00712	-0.00983	-0.01411	-0.01508	0.00302	-0.02277	-0.00873	0.01669	-0.00424	-0.01815	-0.00690	0.00000

1	Zarumilla	2	Zaña	3	Virú	4	Tumbes	5	Supé	6	Santa	7	Pativilca	8	Moche	9	Lacramarca
10	Huambacho	11	Fortaleza	12	Chira	13	Chicama	14	Chao	15	Juana Ríos						

Tabla 48: Population pairwise FST en 15 poblaciones de *M. inca* basado en la frecuencia de haplotipos de la secuencia parcial del gen *16S*

ig conventional F-Statistics from haplotype frequencies															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.00000														
2	-0.00901	0.00000													
3	0.00384	-0.02271	0.00000												
4	0.06535	0.01515	0.02708	0.00000											
5	0.00128	0.00408	0.03303	0.14540	0.00000										
6	0.00384	-0.01542	-0.02139	-0.00775	0.03796	0.00000									
7	0.05633	0.03859	0.02570	0.02929	0.10742	0.00119	0.00000								
8	-0.01119	-0.01032	0.00923	0.08569	-0.01462	0.01590	0.09217	0.00000							
9	0.03204	-0.00168	-0.01279	-0.04987	0.07665	-0.02044	0.00551	0.04740	0.00000						
10	-0.01017	-0.02305	-0.02263	0.02485	0.01984	-0.01489	0.03802	-0.00432	-0.00276	0.00000					
11	0.29308	0.25815	0.21821	0.19854	0.39561	0.16901	0.07035	0.35956	0.14894	0.25036	0.00000				
12	0.06933	0.05781	0.03363	0.06748	0.17208	0.01052	-0.00527	0.12492	0.01778	0.04623	0.12105	0.00000			
13	-0.02161	-0.01347	0.00605	0.02850	-0.01112	0.00158	0.05533	-0.01357	0.02606	-0.00528	0.29356	0.08260	0.00000		
14	0.00574	0.01639	0.05141	0.12904	-0.02594	0.05341	0.12779	-0.00964	0.08965	0.03170	0.42356	0.19481	-0.00806	0.00000	
15	-0.00996	-0.02270	-0.02307	0.01672	0.01008	-0.03017	-0.00019	0.00376	-0.01402	-0.01787	0.19217	0.00695	-0.01421	0.02912	0.00000

1	Zarumilla	2	Zaña	3	Tumbes	4	Supé	5	Santa	6	Pativilca	7	Lacramarca	8	Huambacho	9	Fortaleza
10	Chira	11	Chicama	12	Chao	13	Juana Ríos	14	Virú	15	Moche						

Tabla 52 : Comparación de parámetros genéticos básicos en el gen *COI* - *M. gallus* según su posición en el codón de inicio

Codón inicio	Sitios Conservados	Sitios polimórficos	Sitios parsimoniosamente informativos	Singletones	0	2	4
Posición 1	475/616	141/616	42/616	99/616	398/616	46/616	50/616
Posición 2	475/616	141/616	42/616	99/616	404/616	64/616	95/616
Posición 3	475/616	141/616	42/616	99/616	382/616	93/616	119/616

Tabla 53: Composición nucleotídica del gen *COI-M. gallus* en las diferentes posiciones del codón de inicio

Codón inicio	T%	C%	A%	G%	Total
Posición 1	19.9	24.5	25.4	30.3	205
Posición 2	43.2	25.3	13.6	17.9	206
Posición 3	17.2	30.6	39.5	12.7	205
Promedio	26.8	26.8	26.1	20.3	616

Tabla 54: Composición de aminoácidos (%) de las secuencias de *M. gallus*, gen *COI*, según la tercera posición del codón

Aminoácido	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu
Promedio	7.87	0	3.43	0.98	7.34	10.29	1.95	6.85	0.00	15.67
Aminoácido	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr
Promedio	6.37	4.41	6.86	1.47	2.45	6.85	5.89	7.38	2.45	1.47
Sitios Conservados	Sitios Variables	Sitios parsimoniosamente informativos		Singletones						
198/204	6/204	0/204		6/204						

Tabla 55: Número promedio y frecuencia de uso de codones de las secuencias de *M. gallus* del gen *COI*

UUU (F) 4.1(0.54)	UCU (S) 1.0(0.59)	UAU (Y) 1.0(0.67)	UGU (C) 0.0(0.00)
UUC (F) 0.9(1.46)	UCA (S) 4.0(2.27)	UAC (Y) 2.0(1.33)	UGC (C) 0.0(0.00)
UUA (L) 6.9(1.29)	UCA (S) 3.8(2.19)	UAA (*) 0.0(0.00)	UGA (W) 4.0(1.59)
UUG (L) 1.0(0.18)	UCG (S) 1.2(0.67)	UAG (*) 0.0(0.00)	UGG (W) 1.0(0.41)
CUU (L) 4.0(0.75)	CCU (P) 3.9(1.11)	CAU (H) 0.0(0.50)	CGU (R) 0.0(0.00)
CUC (L) 4.0(0.75)	CCC (P) 2.3(0.65)	CAC (H) 4.0(1.99)	CGC (R) 0.0(0.00)
CUA (L) 14.8(2.77)	CCA (P) 6.0(1.72)	CAA (Q) 3.0(1.97)	CGA (R) 4.0(3.16)
CUG (L) 1.4(0.26)	CCG (P) 1.8(0.52)	CAG (Q) 0.1(0.03)	CGG (R) 1.1(0.84)
AUU (I) 5.1(0.72)	ACU (T) 2.2(0.73)	AAU (N) 3.1(0.68)	AGU (S) 2.0(1.14)
AUC (I) 8.9(1.28)	ACC (T) 5.8(1.93)	AAC (N) 6.0(1.32)	AGC (S) 0.0(0.00)
AUA (M) 9.0(1.38)	ACA (T) 3.0(0.99)	AAA (K) 0.0(0.00)	AGA (S) 1.0(0.56)
AUG (M) 4.0(0.62)	ACG (T) 1.1(0.35)	AAG (K) 0.0(0.00)	AGG (S) 1.0(0.56)
GUU (V) 2.0(0.54)	GCU (A) 4.0(0.99)	GAU (D) 1.0(0.29)	GGU (G) 1.8(0.34)
GUC (V) 2.0(0.53)	GCC (A) 7.0(1.76)	GAC (D) 6.0(1.71)	GGC (G) 0.0(0.00)
GUA (V) 8.0(2.12)	GCA (A) 3.9(0.98)	GAA (E) 2.0(2.00)	GGA (G) 10.7(2.03)
GUG (V) 3.0(0.80)	GCG (A) 1.1(0.28)	GAG (E) 0.0(0.00)	GGG (G) 8.6(1.63)

Tabla 59: Estimadores de parámetros demográficos utilizados para el análisis de cambio en el tamaño poblacional, para el gen *COI* y *16S* – *M. gallus*

Río	<i>COI</i>			<i>16S</i>		
	Teta inicial (θ_i)	Teta Final (θ_f)	tau (t)	Teta inicial (θ_i)	Teta Final (θ_f)	tau (t)
Zar	5.500	3414.978	4.000	3.540	20.547	3.699
Tb	0.009	91.806	9.162	4.725	6919.984	0.750
TOTAL	1.01074	43.01627	7.93363	5.676	386.262	1.225

Tabla 61: Valores encontrados para las pruebas de Neutralidad: Tajima' D y Fu'S Fs para los genes *COI* y *16S* - *M. gallus*

Río	<i>COI</i>		<i>16S</i>	
	Tajima' D	Fu'S Fs	Tajima' D	Fu'S Fs
Zar	-1.27381 *	-10.58795	-0.18086*	-7.05518
Tb	-1.48145 *	-12.46928	0.23187**	0.354*
TOTAL	-1.66830	-24.88612	0.86139**	-6.189

Tabla 64: Population pairwise F_{ST} para *M. gallus* basado en la frecuencia de haplotipos de la secuencia parcial de *COI* en los ríos Zarumilla y Tumbes

	Population pairwise F_{ST}		Prueba de significancia	
	1	2	1	2
1 Zarumilla	0.00000		+	
2 Tumbes	-0.00023	0.00000	0.65918+-0.0119	+

ANEXO 02

FIGURAS COMPLEMENTARIAS

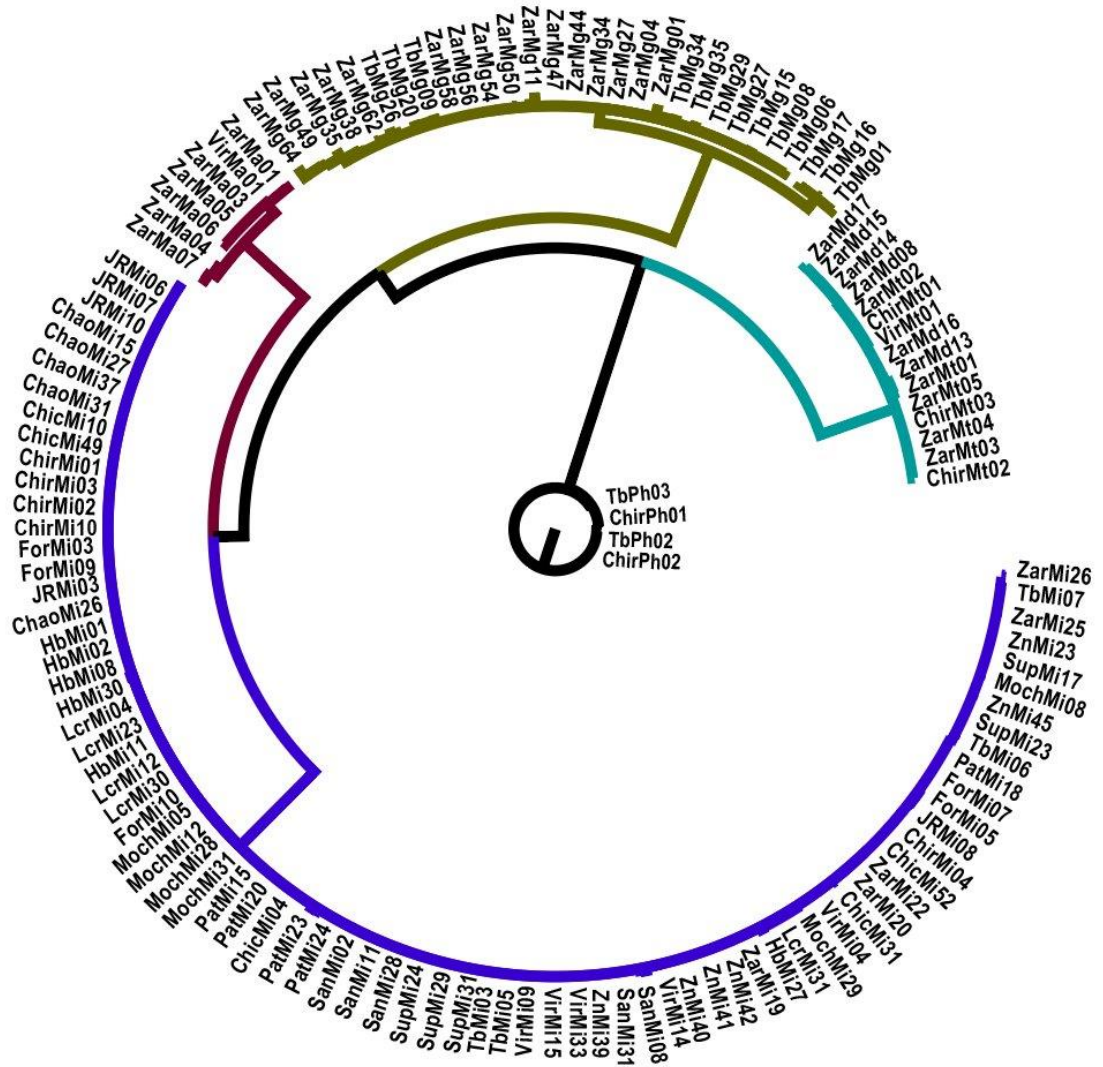


Fig. 11: Árbol filogenético concatenado de especies del género *Macrobrachium*: *COI-16S* construido con el algoritmo IB usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G

Mt: *M. transandicum*; Mp: *M. panamense*; Mi: *M. inca*; Mg: *M. gallus*; Ma: *M. americanum*; Md: *M. digueti*; Ph: *P. hancockii*

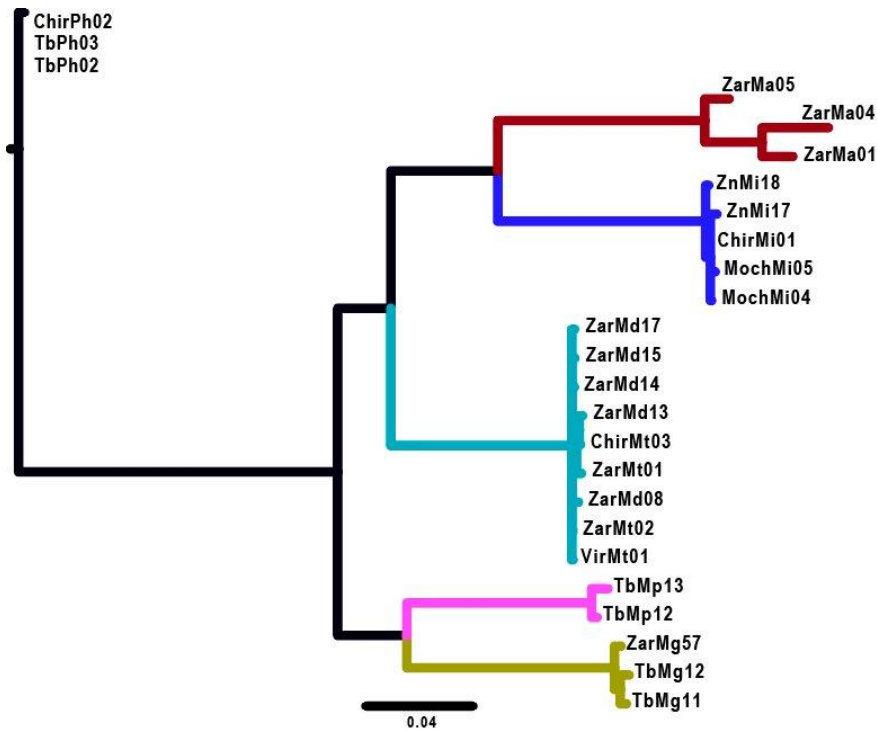


Fig. 12: Árbol filogenético concatenado de especies del género *Macrobrachium*: COI-28S construido con el algoritmo IB usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G
 Mt: *M. transandicum*; Mp: *M. panamense*; Mi: *M. inca*; Mg: *M. gallus*; Ma: *M. americanum*; Md: *M. digueti*; Ph: *P. hancockii*

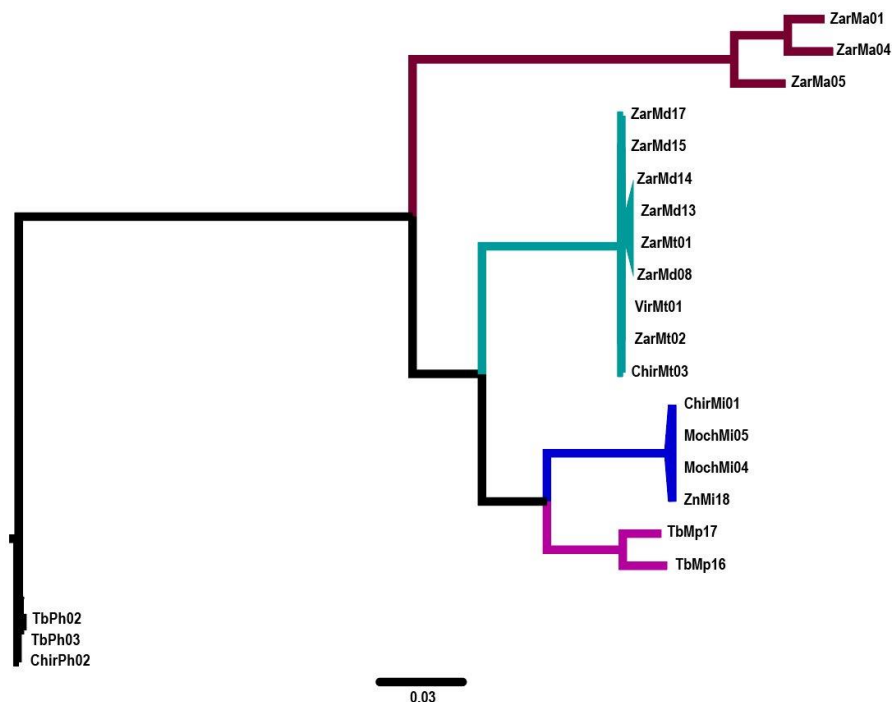
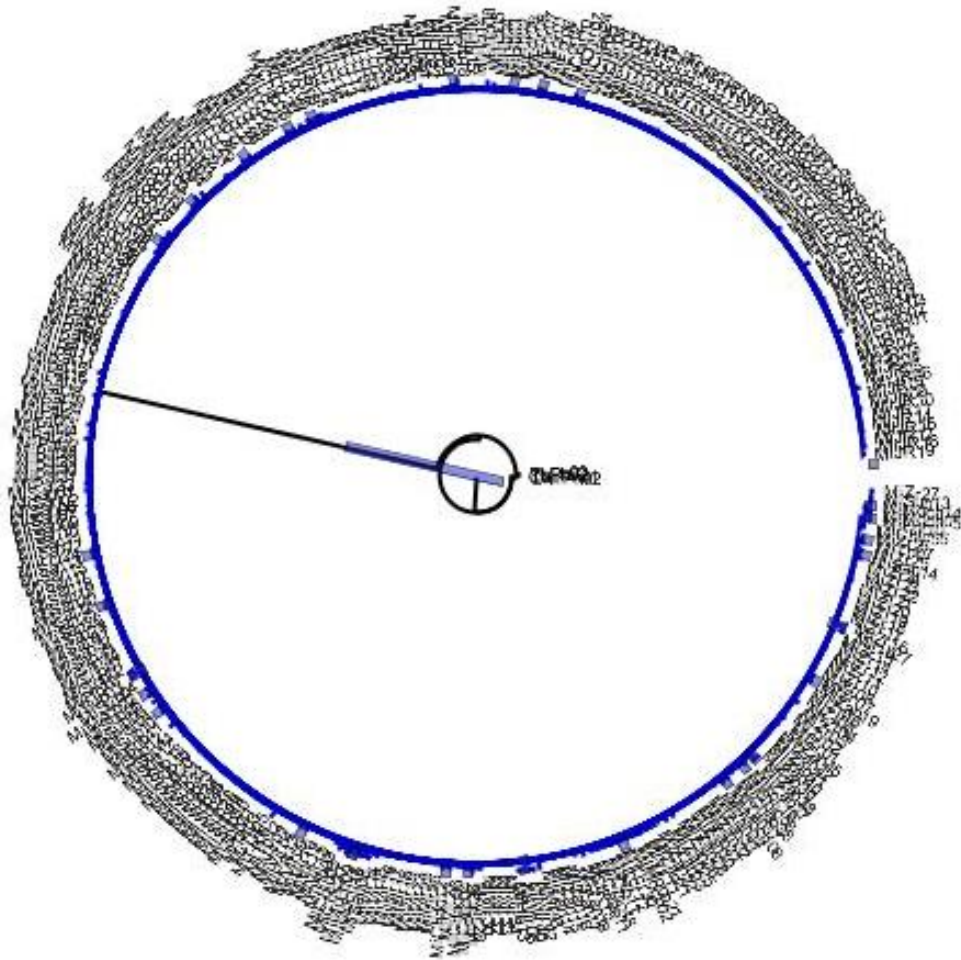


Fig. 13: Árbol filogenético concatenado de especies del género *Macrobrachium*: 16S-28S construido con el algoritmo IB usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G
 Mt: *M. transandicum*; Mp: *M. panamense*; Mi: *M. inca*; Mg: *M. gallus*; Ma: *M. americanum*; Md: *M. digueti*; Ph: *P. hancockii*



0.02

Fig. 30: Árbol filogenético construido con el algoritmo de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G, a partir de los 171 haplotipos encontrados para las 326 secuencias del gen *COI-M. inca*

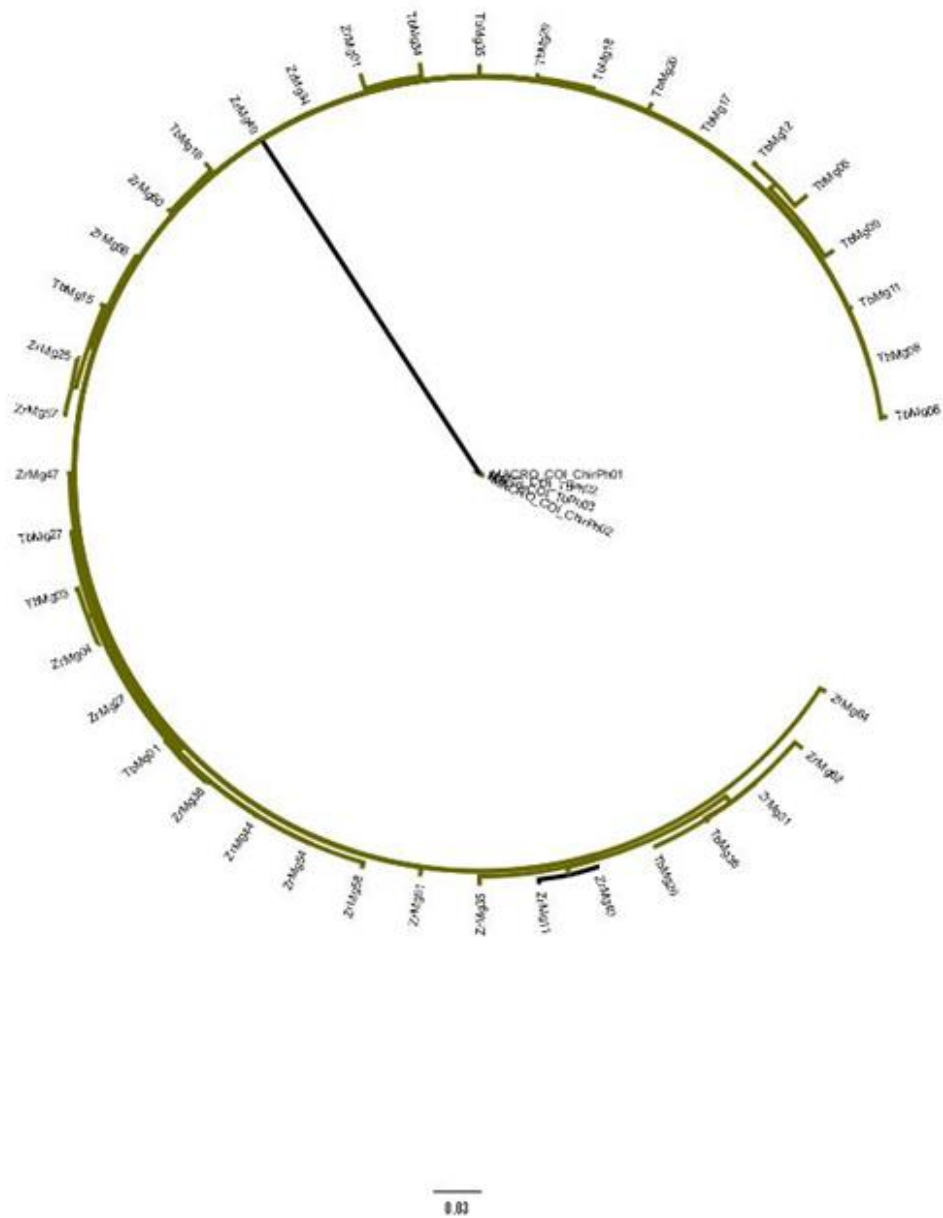


Fig. 41: Árbol filogenético construido con el algoritmo de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC K80+I+G, a partir de las 40 secuencias del gen *COI* - *M. gallus*

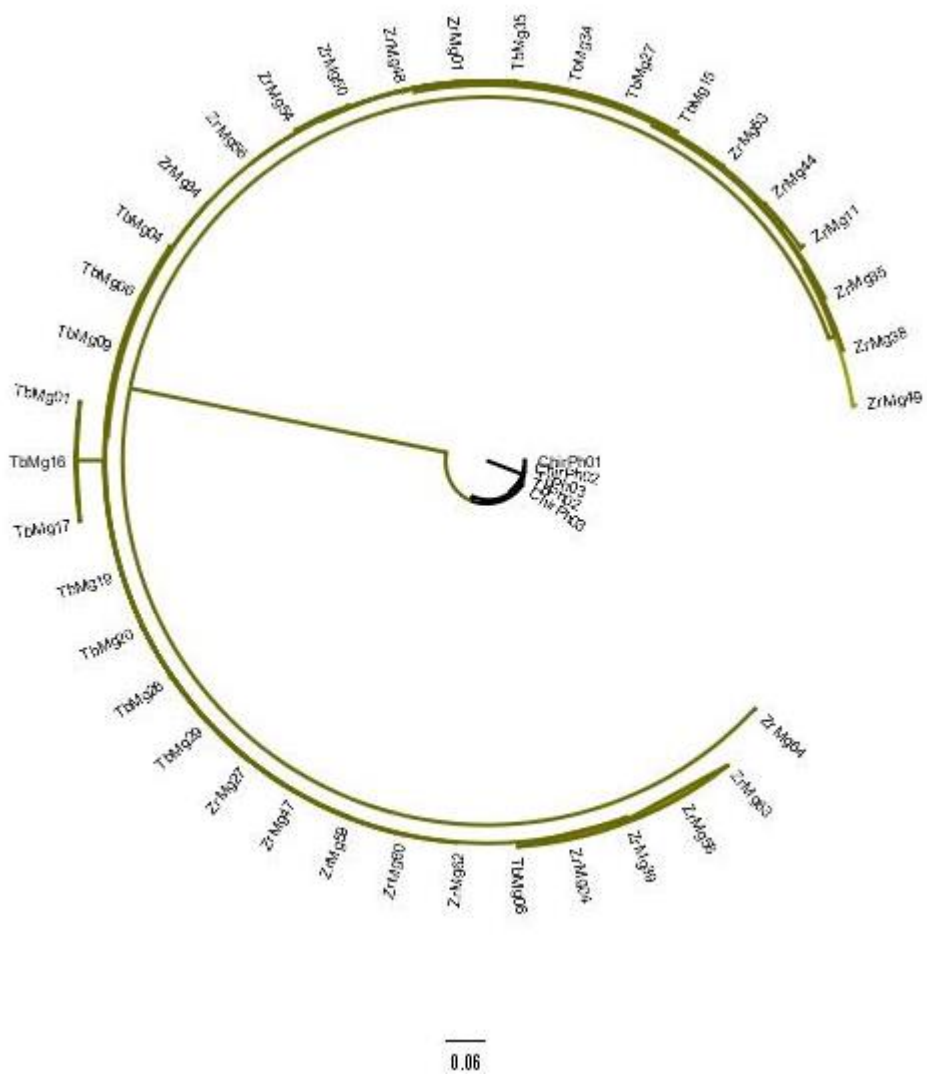


Fig 43: Comparación de la forma radial de árbol filogenético construido con el algoritmo de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G, a partir de las 37 secuencias del gen *16S-M. gallus*

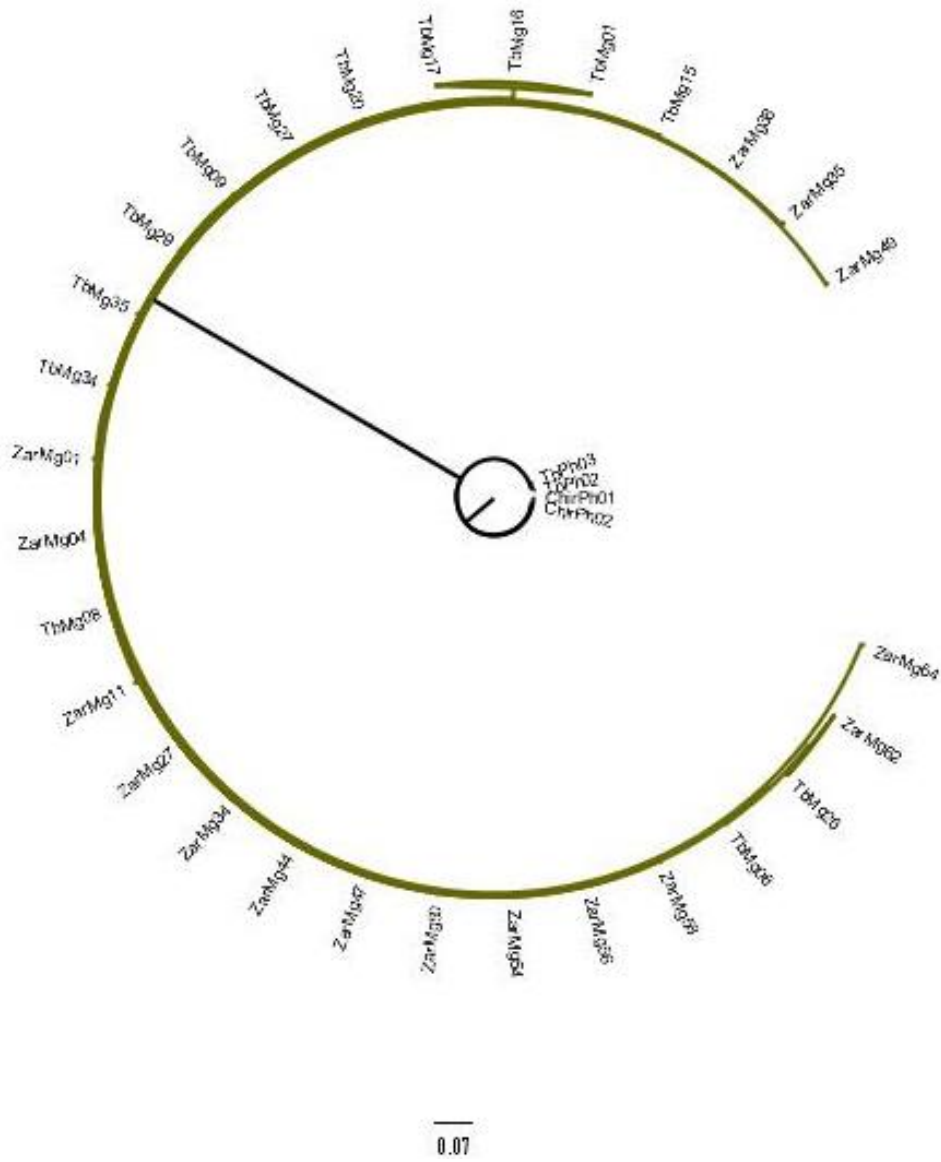


Fig 45: Árbol filogenético concatenado de secuencias de *M. gallus*: *COI-16S*, construido con el algoritmo de Inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo de sustitución BIC: GTR+I+G

jjjjj

ANEXO 03

Especies Trans-isthmianas de *Macrobrachium* consideradas gemelas de especies *Macrobrachium* de la vertiente del Pacífico peruano y otros palaemónidos utilizadas para el análisis filogenético, con las respectivas localidades de colecta, número de catálogo, y números de adhesión en GenBank (Tomado de Pileggi *et al.*, 2014)

Especie	Localidad	Catálogo (N°)	16S	COI
<i>M. acanthurus-1</i>	Ilha de São Sebastião-SP, Brazil	CCDB 2134	HM352445	HM352485
<i>M. acanthurus-2</i>	Guaraqueçaba-PR, Brazil	CCDB 2546	HM352444	KM101538
<i>M. acanthurus-1</i>	Guaraqueçaba-PR, Brazil	CCDB 1556	KM101464	KM101537
<i>M. acanthurus-2</i>	Cahuita, Costa Rica	CCDB 2901	KM101465	KM101539
<i>M. acanthurus-1</i>	Bocas del Toro, Panama	CCDB 2901	KM101465	KM101539
<i>M. acanthurus-2</i>	Panamá	CCDB 3536	KM101466	KM101540
<i>M. tenellum-1</i>	Puntarenas, Costa Rica	MZUCR 1936-002	KM101488	KM101567
<i>M. tenellum-2</i>	Guanacaste, Costa Rica	MZUCR 3290-01	KM101489	KM101568
<i>M. tenellum</i>	Oaxaca, México	CNCR 24831	KM101487	KM101566
<i>M. amazonicum-1</i>	Santana-AP, Brazil	CCDB 1965	HM352441	HM352486
<i>M. amazonicum-2</i>	Aquidauana-MS, Brazil	CCDB 1970	HM352442	HM352487
<i>M. amazonicum-3</i>	Itacoatiara-AM, Brazil	CCDB 2085	HM352443	HM352488
<i>M. amazonicum</i>	Panamá	CNCR 5151	KM101468	KM101542
<i>M. olfersii-1</i>	Ilha de São Sebastião-SP, Brazil	CCDB 2435	HM352459	HM352496
<i>M. olfersii-2</i>	Antonina-PR, Brazil	CCDB 2445	HM352458	KM101558
<i>M. olfersii</i>	Isla Margarita, Venezuela	CCDB 2446	HM352460	KM101559
<i>M. olfersii-1</i>	Reserva Veragua, Costa Rica	CCDB 4873	KM101483	KM101560
<i>M. crenulatum-1</i>	Isla Margarita, Venezuela	CCDB 2124	HM352463	HM352498
<i>M. crenulatum-3</i>	Reserva Veragua, Costa Rica	CCDB 4874	KM101475	KM101550
<i>M. carcinus-1</i>	Santana-AP, Brazil	CCDB 2122	HM352448	HM352490
<i>M. carcinus-2</i>	Ubatuba-SP, Brazil	CCDB 2136	HM352449	HM352491
<i>M. carcinus</i>	Isla Margarita, Venezuela	CCDB 2123	HM352450	HM352492
<i>M. carcinus-1</i>	Río Suarez, Costa Rica	CCDB 2145	HM352452	KM101548
<i>M. carcinus-2</i>	Cahuita, Costa Rica	CCDB 4876	KM101474	KM101549

Especie	Localidad	Catálogo (N°)	16S	COI
<i>M. heterochirus-2</i>	Reserva Veragua, Costa Rica	CCDB 4875	KM101478	KM101553
<i>M. heterochirus</i>	Veracruz, Mexico	Not available	KM101479	KM101554
<i>M. occidentale</i>	Río Aranjuez, Costa Rica	MZUCR 3292-02	KM101482	KM101557
<i>M. occidentale</i>	Oaxaca, Mexico North/Central	CNCR 24838	KM101481	KM101556
<i>M. borellii</i>	Buenos Aires, Argentina	UFRGS 3669	HM352426	HM352480
<i>M. brasiliense</i>	Serra Azul-SP, Brazil	CCDB 2135	HM352429	HM352481
<i>M. jelskii</i>	Pereira Barreto-SP, Brazil	CCDB 2129	HM352437	HM352484
<i>M. potiuna</i>	Eldorado-SP, Brazil	CCDB 2131	HM352438	KM101564
<i>M. rosenbergii</i>	Culture, Brazil	M CCDB 2139	HM352465	
<i>M. surinamicum</i>	Icangui-PA, Brazil	INPA-CR 183	HM352446	KM101565
<i>M. michoacanus</i>	Oaxaca, Mexico	CNCR 24837	KM101480	KM101555

ANEXO 04

Fotos de las especies *Macrobrachium* identificadas en el presente estudio, obtenidas de los ríos del Pacífico peruano

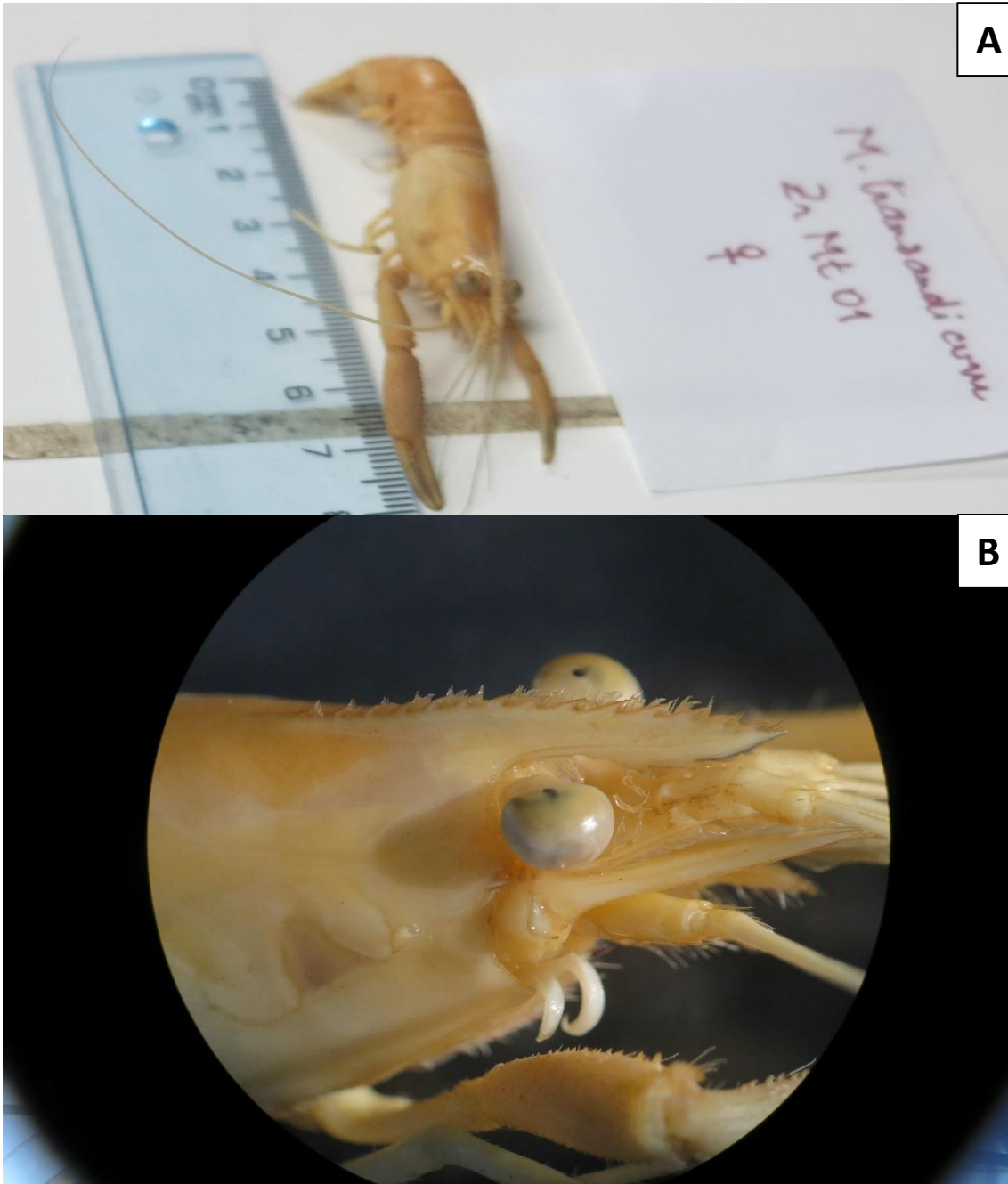


Foto 1: *Macrobrachium transandicum* Holthuis, 1950. A, Hembra del río Zarumilla. B, detalle del rostro

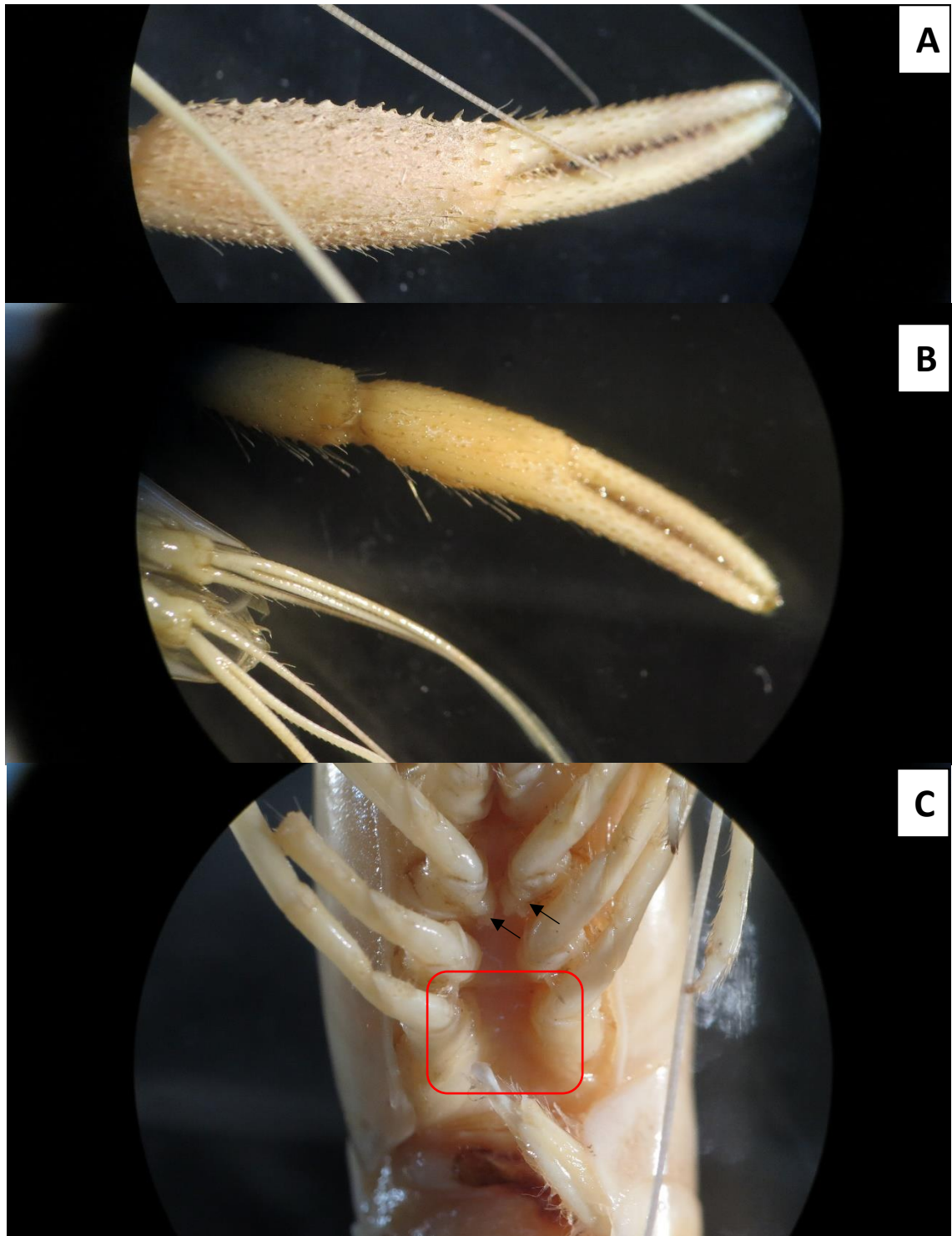


Foto 2: *Macrobrachium transandicum* Holthuis, 1950. Hembra del río Zarumilla. A, Quela mayor; B, quela menor, C, gonoporo en coxa de tercer par de periódodos. Nótese el ancho de la zona a la altura del quinto par

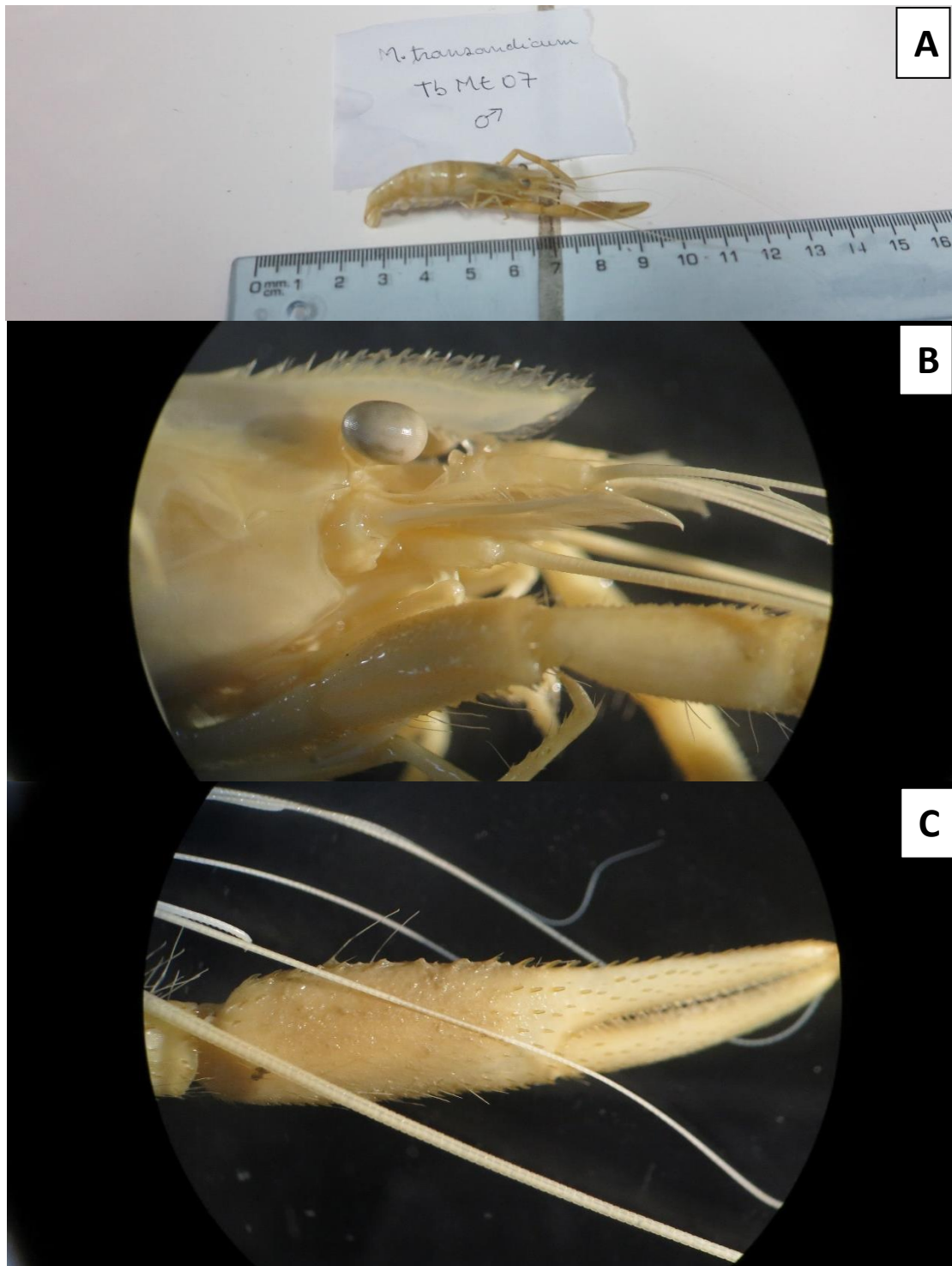


Foto 3: *Macrobrachium transandicum* Holthuis, 1950. A, Macho del río Tumbes. B, Detalle del rostro C, quela mayor

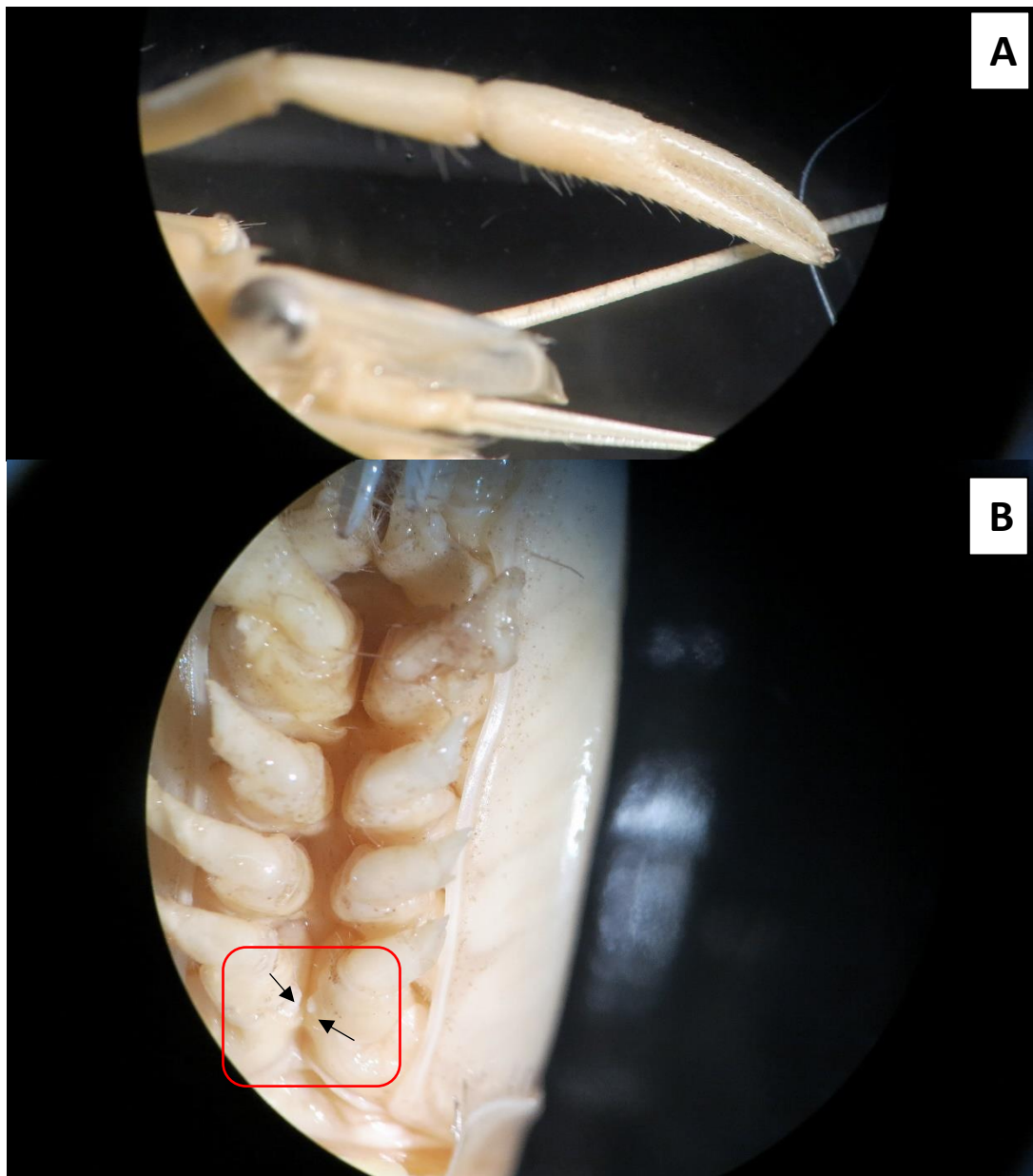


Foto 4: *Macrobrachium transandicum* Holthuis, 1950. Macho del río Tumbes. A, quela menor; B, gonoporo, coxa quinto par de periópodos. Nótese también el ancho de la zona

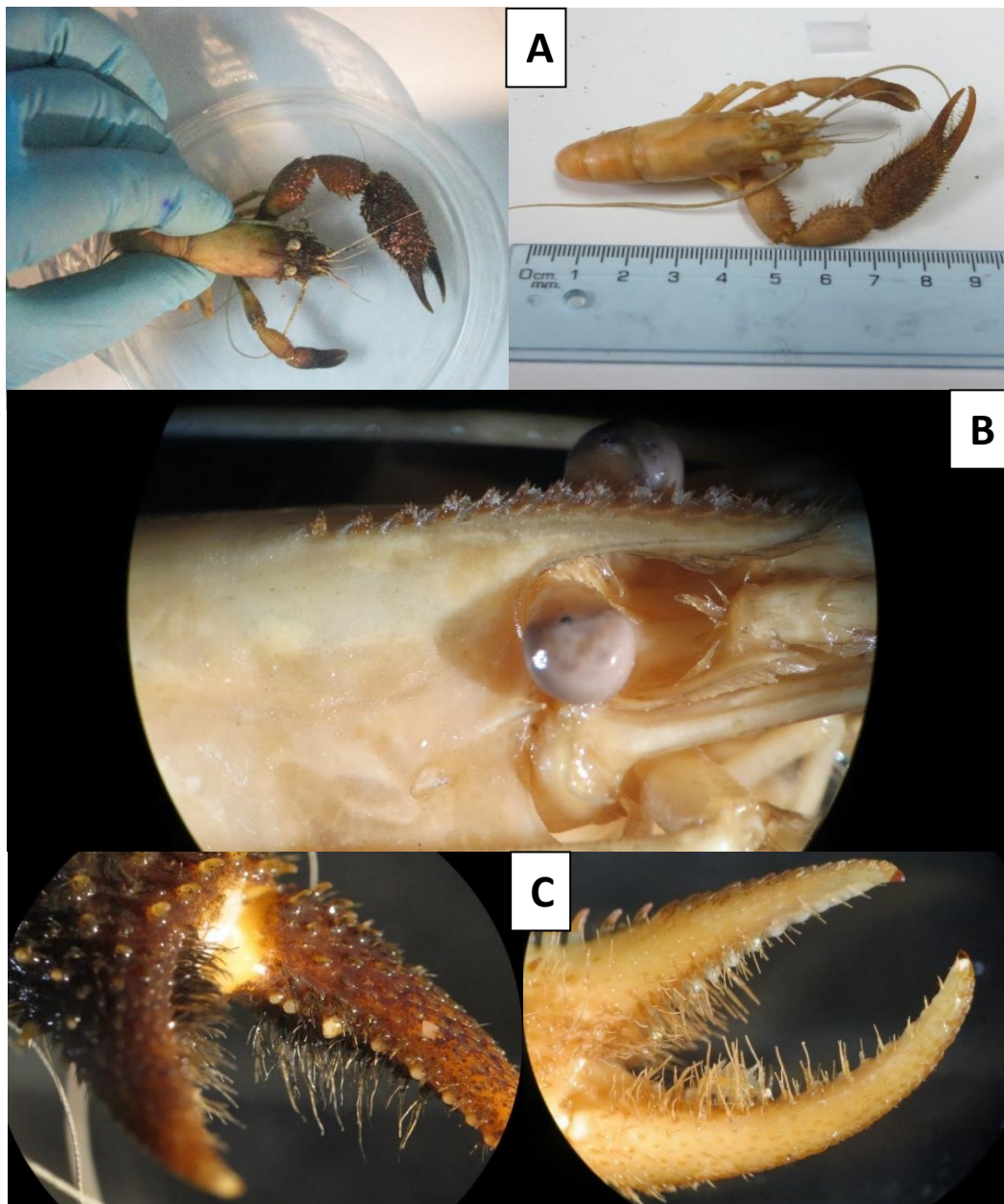


Foto 5: *Macrobrachium digueti* Bouvier, 1895. A, Macho del río Zarumilla. B, detalle del rostro; C, uña de la quela mayor

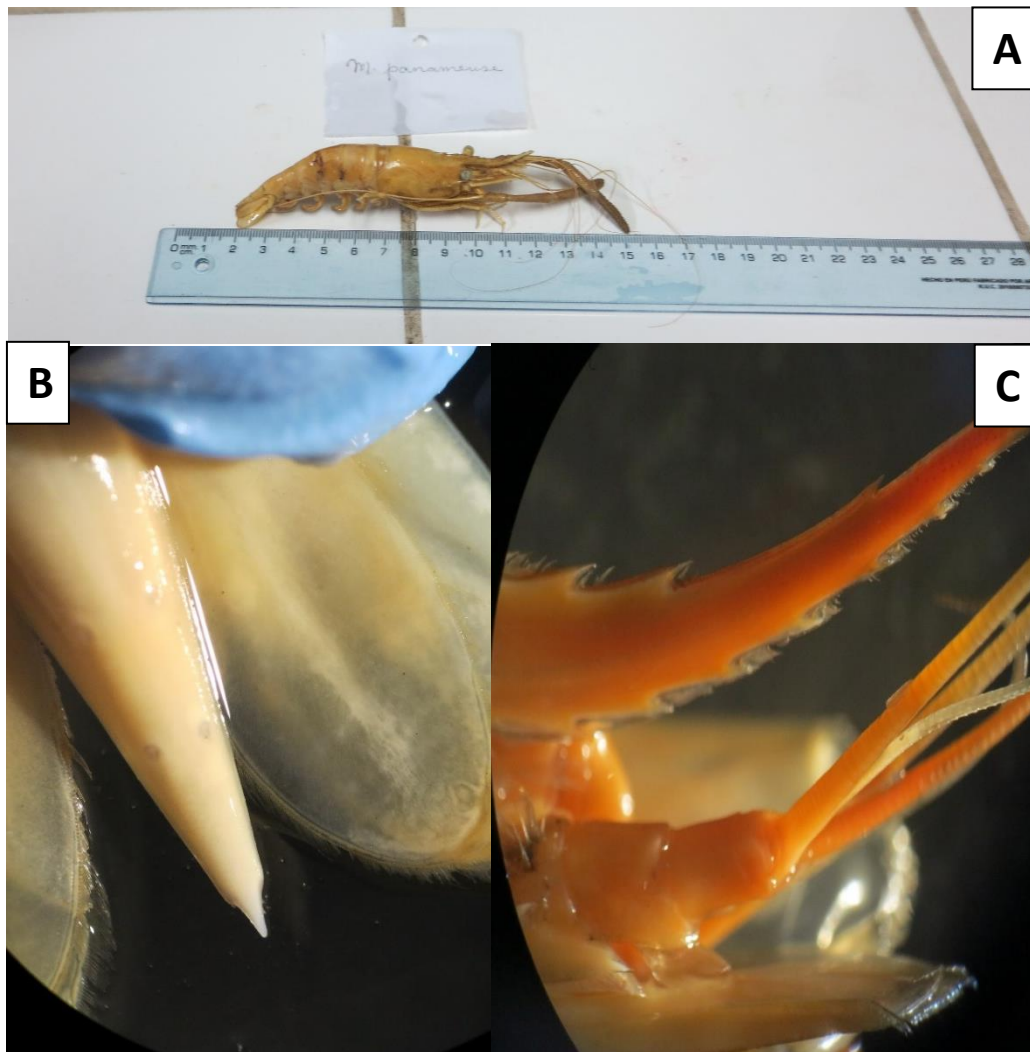


Foto 6: *Macrobrachium panamense* Rathbun, 1912. A, Macho del río Tumbes. B, detalle del telson; C, Detalle del rostro

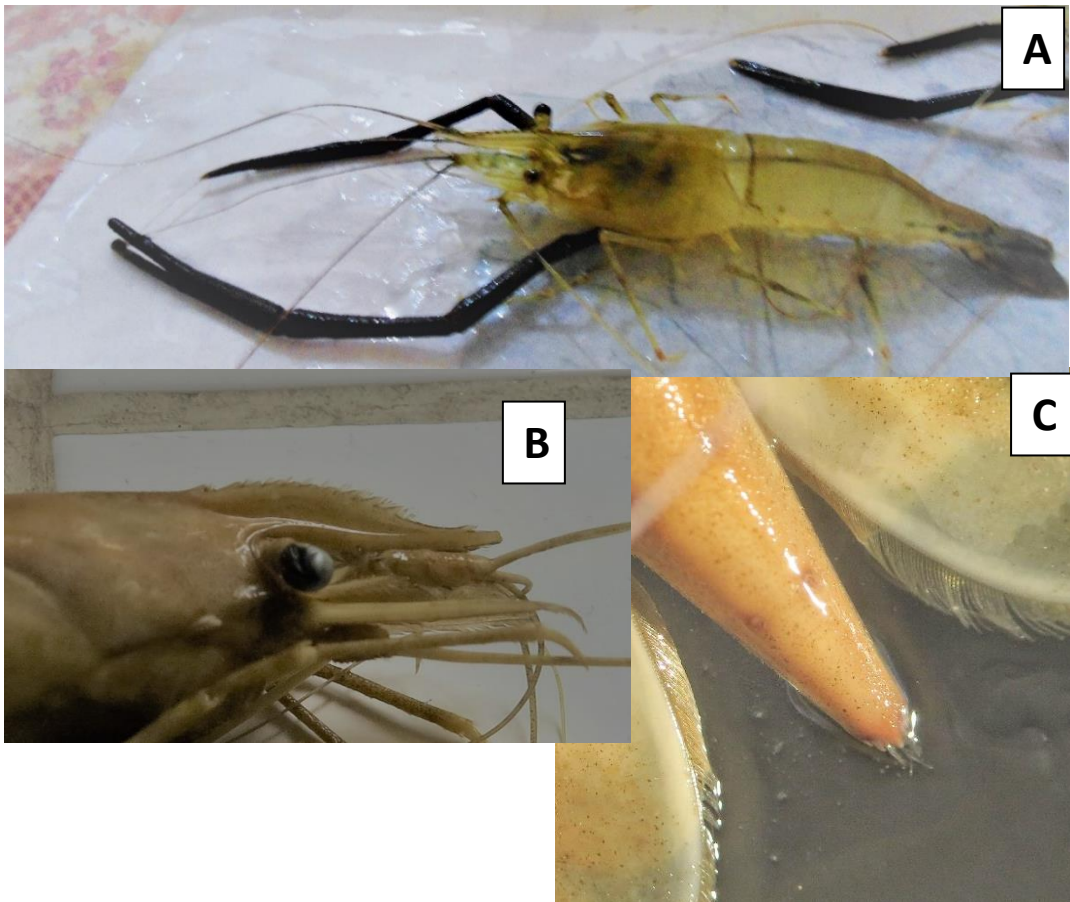


Foto 7: *Macrobrachium gallus* Holthius, 1950. A, Macho del río Zarumilla. B, detalle del rostro; C, Detalle del telson.

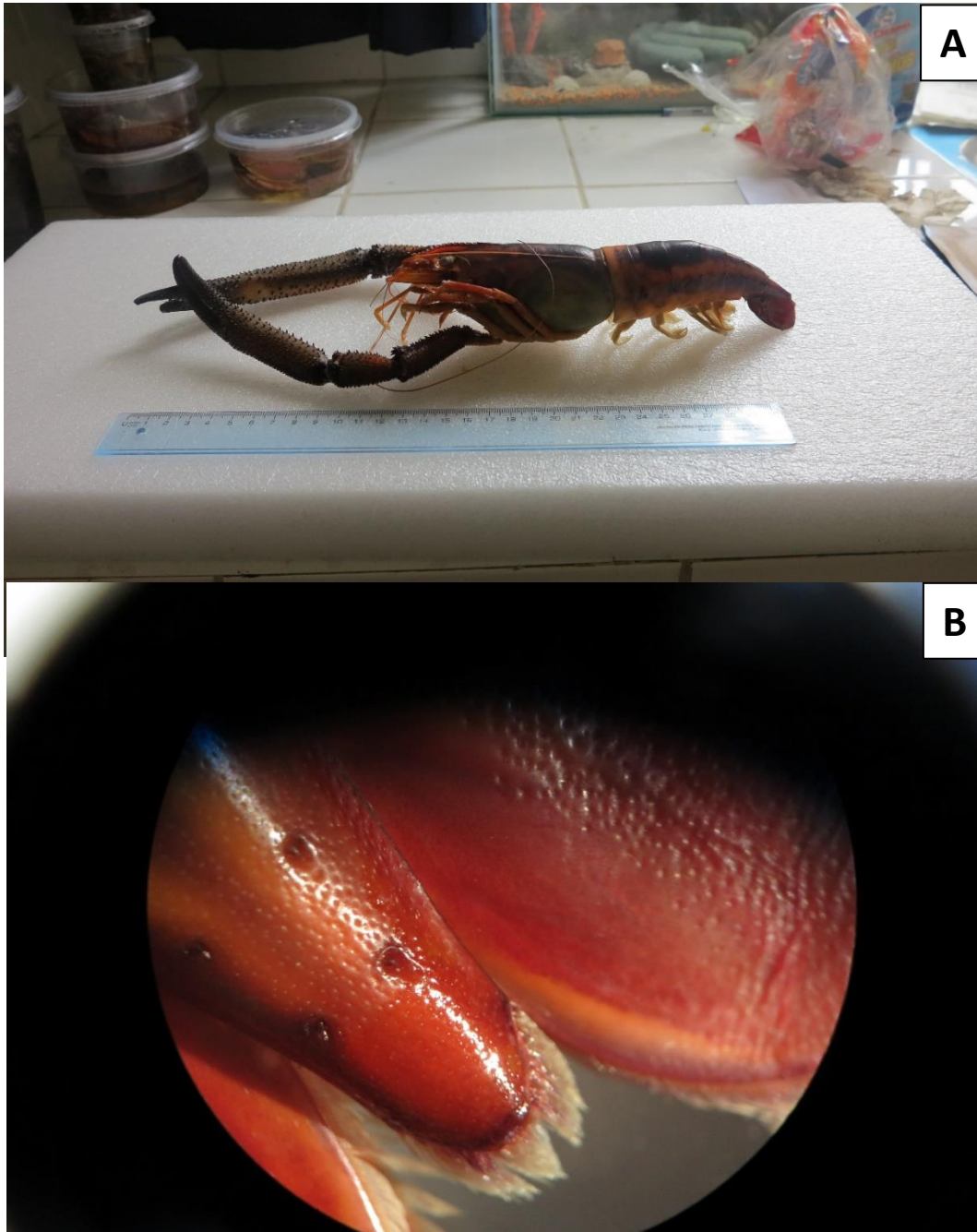


Foto 8: *Macrobrachium americanum* Holthius, 1950. A, Macho del río Zarumilla. B, detalle del telson

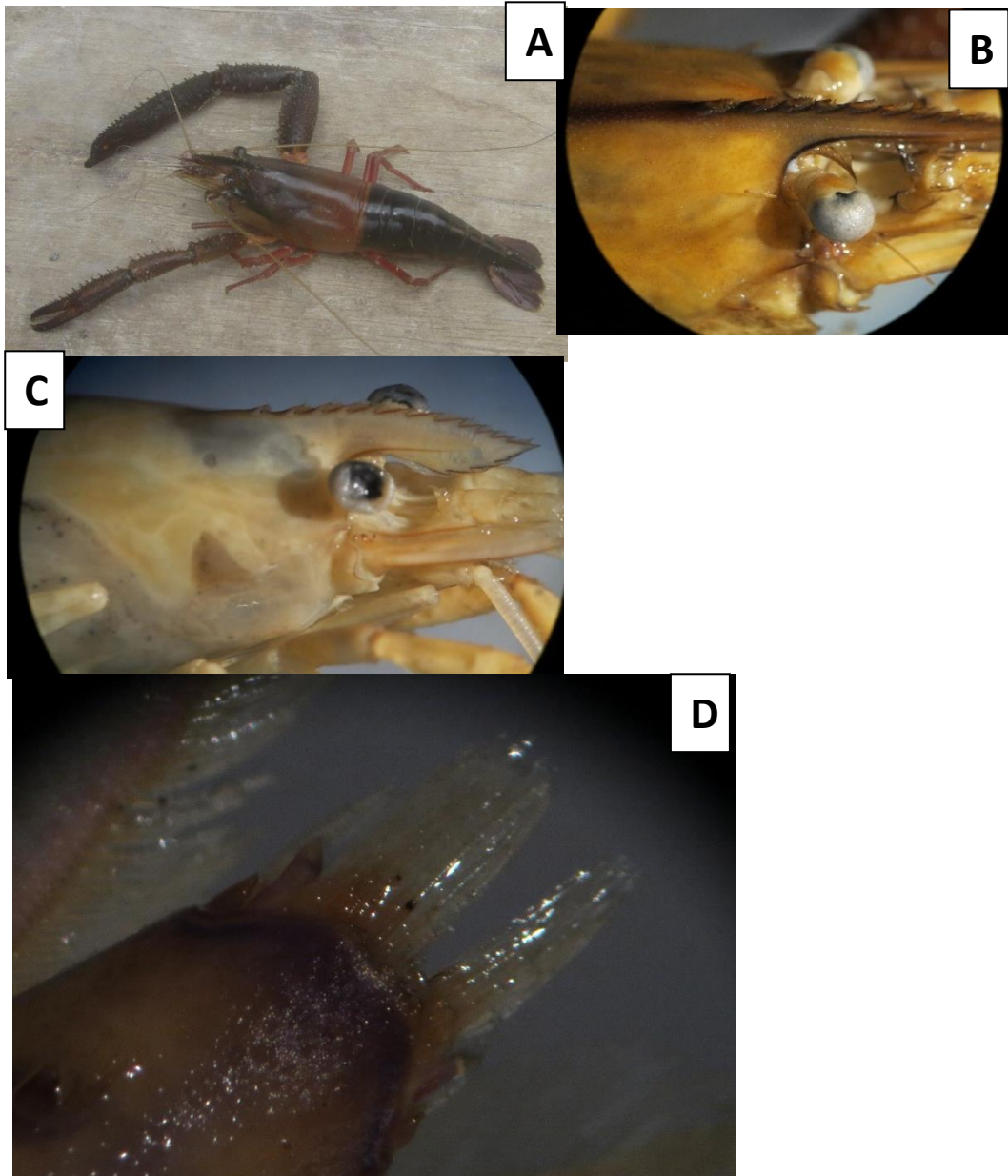


Foto 9: *Macrobrachium inca* Holthius, 1950. A, Macho del río Chicama. B, detalle del rostro; C, Detalle del rostro de hembra de río Santa; D, telson

hhhh

ANEXO 05

Modelos de Sustitución: Filogeografía *Macrobrachium inca* - *Macrobrachium gallus*

Matriz	AIC	kappa	ti/tv	K	p-inv	gamma	fNuc
<i>M.gallus-16S</i>	GTR+I+G			92	0.138	0.334	A:0.3477; C:0.2459; G:0.1198; T:0.2866
<i>M.gallus-COI</i>	HKY+I+G	16.694	8.197	92	0.509	0.266	A:0.2832; C:0.2338; G:0.1937; T:0.2894
<i>M.inca_16S</i>	GTR+I			685	0.521		A:0.3445; C:0.2312; G:0.1233; T:0.3011
<i>M.inca-COI</i>	GTR+I+G			668	0.623	3.844	A:0.2849; C:0.2608; G:0.1574; T:0.2969
Concatenado-16S-COI- <i>M. gallus</i>	GTR+I+G			74	0.393	0.356	A:0.3073; C:0.2443; G:0.1521; T:0.2963
Concatenado_16S-COI- <i>M. inca</i>	GTR+I+G			620	0.569	1.055	A:0.3097; C:0.2469; G:0.1459; T:0.2974
Matriz	BIC	kappa	ti/tv	K	p-inv	gamma	fNuc
<i>M.gallus-16S</i>	GTR+I+G			92	0.138	0.334	A:0.3477; C:0.2459; G:0.1198; T:0.2866
<i>M.gallus-COI</i>	K80+I+G	16.9392	8.4696	89	0.492	0.244	A:0.2821; C:0.2328; G:0.1964; T:0.2887
<i>M.inca-16S</i>	GTR+I			685	0.523		A:0.3445; C:0.2313; G:0.1241; T:0.3002
<i>M.inca-COI</i>	GTR+I+G			668	0.623	3.844	A:0.2849; C:0.2608; G:0.1574; T:0.2969
Concatenado_16S-COI- <i>M. gallus</i>	GTR+I+G			74	0.39	0.353	A:0.3073; C:0.2443; G:0.1521; T:0.2963
Concatenado_16S-COI- <i>M. inca</i>	GTR+I+G			620	0.569	1.055	A:0.3097; C:0.2469; G:0.1459; T:0.2974

Modelos de Sustitución: Filogenia de camarones *Macrobrachium* del Pacífico peruano

Matriz	AIC	kappa	ti/tv	K	p-inv	gamma	fNuc
Filogenia <i>Macrobrachium</i> Pacífico-COI	GTR+I+G			174	0	0.12	A:0.3058; C:0.2837; G:0.1367; T:0.2738
Filogenia <i>Macrobrachium</i> Pacífico-16S	GTR+G			197		0.276	A:0.3514; C:0.2368; G:0.1170; T:0.2949
Filogenia <i>Macrobrachium</i> Pacífico-28S	HKY+I+G	1.3881	0.6856	60	0.466	1.004	A:0.2221; C:0.2050; G:0.3144; T:0.2584
Concatenado_16S-COI	GTR+I+G			272	0.504	0.768	A:0.3271; C:0.2507; G:0.1344; T:0.2878
Concatenado_16S-28S	GTR+G			49		0.278	A:0.2867; C:0.2186; G:0.2327; T:0.2620
Concatenado_COI-28S	SYM+G			54		0.365	A:0.2467; C:0.2385; G:0.2502; T:0.2645

Matriz	BIC	kappa	ti/tv	K	p-inv	gamma	fNuc
Filogenia <i>Macrobrachium</i> Pacífico-COI	GTR+I+G			92	0.138	0.334	A:0.3477; C:0.2459; G:0.1198; T:0.2866
Filogenia <i>Macrobrachium</i> Pacífico-16S	K80+I+G	16.9392	8.4696	89	0.492	0.244	A:0.2821; C:0.2328; G:0.1964; T:0.2887
Filogenia <i>Macrobrachium</i> Pacífico-28S	GTR+I			685	0.523		A:0.3445; C:0.2313; G:0.1241; T:0.3002
Concatenado_16S-COI	GTR+I+G			668	0.623	3.844	A:0.2849; C:0.2608; G:0.1574; T:0.2969
Concatenado 16S-28S	GTR+I+G			74	0.393	0.356	A:0.3073; C:0.2443; G:0.1521; T:0.2963
Concatenado_COI-28S	GTR+I+G			620	0.569	1.055	A:0.3097; C:0.2469; G:0.1459; T:0.2974

Modelos de Sustitución: Filogenia de camarones *Macrobrachium* peruanos con especies hermanas de la vertiente del Atlántico

Matriz	AIC	kappa	ti/tv	K	p-inv	gamma	fNuc
Matriz <i>Macrobrachium</i>-gemelas 16Sar	HKY+I+G	14.9490	6.4123	98	0.3040	0.2760	A:0.2939; C:0.1114; G:0.2238; T:0.3709
Matriz <i>Macrobrachium</i>-todas 16Sar	HKY+I+G	13.0095	5.4939	140	0.3370	0.3550	A:0.2843; C:0.1108; G:0.2221; T:0.3828
Matriz <i>Macrobrachium</i>-gemelas <i>COIa</i>	GTR+G			49		0.3200	A:0.2967; C:0.2560; G:0.1556; T:0.2907
Matriz <i>Macrobrachium</i>_amxcar_<i>COIa</i>	GTR+I			161	0.6550		A:0.3012; C:0.3012; G:0.1455; T:0.2521

Matriz	BIC	kappa	ti/tv	K	p-inv	gamma	fNuc
Matriz <i>Macrobrachium</i>-gemelas 16Sar	HKY+G	14.7503	6.3331	97		0.1670	A:0.2493; C:0.1109; G:0.2248; T:0.3701
Matriz <i>Macrobrachium</i>-todas 16Sar	HKY+I+G	13.0095	5.4939	140	0.3370	0.3550	A:0.2843; C:0.1108; G:0.2221; T:0.3828
Matriz <i>Macrobrachium</i>-gemelas <i>COIa</i>	HKY+G	7.6134	3.6723	45		0.3160	A:0.3083; C:0.2562; G:0.1675; T:0.2681
Matriz <i>Macrobrachium</i>_amxcar_<i>COIa</i>	GTR+I			161	0.6550		A:0.3012; C:0.3012; G:0.1455; T:0.2521

ANEXO 06

Test de Saturación de las Secuencias del gen *COI* – *M. inca*

Test of substitution saturation (Xia et al. 2003; Xia and Lemey 2009)

Analysis performed on all sites.

Testing whether the observed Iss is significantly lower than Iss.c.

IssSym is Iss.c assuming a symmetrical topology.

IssAsym is Iss.c assuming an asymmetrical topology.

NumOTU	Iss	Iss.cSym	T	DF	P	Iss.cAsym	T	DF	P
4	0.161	0.804	40.750	631	0.0000	0.772	38.771	631	0.0000
8	0.155	0.763	35.014	631	0.0000	0.653	28.682	631	0.0000
16	0.149	0.741	33.120	631	0.0000	0.531	21.356	631	0.0000
32	0.150	0.716	31.026	631	0.0000	0.389	13.085	631	0.0000

Note: two-tailed tests are used.

Interpretation of results:

Significant Difference

Yes

No

Iss < Iss.c Little saturation | Substantial saturation

Iss > Iss.c Useless sequences | Very poor for phylogenetics

ANEXO 07

Frecuencia de Haplotipos – *M. inca COI*

	JR (n=18)	Chir (n=7)	Chic (n=27)	Chao (n=30)	For (n=10)	Hb (n=25)	Lcr (n=26)	Moch (n=23)	Pat (n=31)	San (n=23)	Sup (n=25)	Tb (n=5)	Vir (n=26)	Zan (25)	Zar (n=25)
H1					1 (0.1000)			2 (0.0869)			1 (0.0400)				1 (0.0400)
H2															1 (0.0400)
H3															1 (0.0400)
H4															1 (0.0400)
H5															1 (0.0400)
H6															1 (0.0400)
H7	6 (0.3333)	4 (0.5713)	10 (0.3703)	7 (0.2333)	1 (0.1000)	8 (0.3200)	7 (0.2695)	4 (0.1739)	10 (0.3226)	7 (0.3043)	10 (0.400)	1 (0.2000)	6 (0.2308)	8 (0.3200)	6 (0.2400)
H8	2 (0.1111)		2 (0.0741)	1 (0.0333)			4 (0.1540)	1 (0.0434)	3 (0.0968)	1 (0.0434)	1 (0.0400)		4 (0.1538)	1 (0.0400)	2 (0.0800)
H9										1 (0.0434)					1 (0.0400)
H10			1 (0.0370)				1 (0.0385)			1 (0.0434)					1 (0.0400)
H11															1 (0.0400)
H12															1 (0.0400)
H13															1 (0.0400)
H14															1 (0.0400)
H15														1 (0.0400)	1 (0.0400)
H16			1 (0.0370)		1 (0.1000)										1 (0.0400)
H17															1 (0.0400)
H18															1 (0.0400)
H19															1 (0.0400)
H20															1 (0.0400)
H21										1 (0.0434)			1 (0.0384)	1 (0.0400)	
H22															2 (0.0800)
H23															1 (0.0400)
H24															1 (0.0400)
H25															1 (0.0400)
H26															1 (0.0400)
H27															1 (0.0400)
H28															1 (0.0400)
H29															1 (0.0400)
H30	1 (0.0556)		1 (0.0370)	1 (0.0333)			2 (0.0770)						1 (0.0384)	1 (0.0400)	

continuación

H31									1 (0.0400)
H32									1 (0.0400)
H33									1 (0.0400)
H34									1 (0.0384)
H35									1 (0.0384)
H36									1 (0.0384)
H37									1 (0.0384)
H38									1 (0.0384)
H39									1 (0.0384)
H40									1 (0.0384)
H41									1 (0.0384)
H42			1 (0.0400)						1 (0.0384)
H43									1 (0.0384)
H44									1 (0.0384)
H45							1 (0.0322)		1 (0.0384)
H46									1 (0.0384)
H47									1 (0.0384)
H48								1 (0.2000)	
H49								1 (0.2000)	
H50		2 (0.0667)	1 (0.0400)	1 (0.0385)	1 (0.0434)	1 (0.0322)	2 (0.0800)	1 (0.2000)	
H51								1 (0.2000)	
H52							1 (0.0400)		
H53							1 (0.0400)		
H54							1 (0.0400)		
H55							1 (0.0400)		
H56							1 (0.0400)		
H57							1 (0.0400)		
H58		1 (0.1000)					1 (0.0400)		
H59							1 (0.0400)		
H60							1 (0.0400)		

continuación

H61			1 (0.0400)
H62			1 (0.0400)
H63			1 (0.0434)
H64			1 (0.0434)
H65		1 (0.0322)	1 (0.0434)
H66			1 (0.0434)
H67			1 (0.0434)
H68	1 (0.0385)		1 (0.0434)
H69			1 (0.0434)
H70			1 (0.0434)
H71			1 (0.0434)
H72			1 (0.0434)
H73			1 (0.0434)
H74			1 (0.0434)
H75		1 (0.0322)	
H76		1 (0.0322)	
H77		1 (0.0322)	
H78		1 (0.0322)	
H79		1 (0.0322)	
H80		1 (0.0322)	
H81		2 (0.0645)	
H82		1 (0.0322)	
H83		1 (0.0322)	
H84		1 (0.0322)	
H85		1 (0.0322)	
H86		1 (0.0322)	
H87		1 (0.0322)	
H88		1 (0.0434)	1 (0.0322)
H89		1 (0.0434)	
H90		1 (0.0434)	

continuación

H91			1 (0.0434)
H92			1 (0.0434)
H93		1 (0.0385)	1 (0.0434)
H94			1 (0.0434)
H95			1 (0.0434)
H96			1 (0.0434)
H97			1 (0.0434)
H98			1 (0.0434)
H99			1 (0.0434)
H100			1 (0.0434)
H101			1 (0.0434)
H102			1 (0.0434)
H103		1 (0.0385)	
H104	1 (0.0556)		1 (0.0385)
H105			1 (0.0385)
H106			1 (0.0385)
H107			1 (0.0385)
H108			1 (0.0385)
H109			1 (0.0385)
H110	1 (0.0556)	1 (0.1000)	1 (0.0385)
H111			1 (0.0385)
H112		1 (0.0400)	
H113		1 (0.0400)	
H114		1 (0.0400)	
H115		1 (0.0400)	
H116		1 (0.0400)	
H117		1 (0.0400)	
H118		1 (0.0400)	
H119		1 (0.0400)	
H120		1 (0.0400)	

continuación

H121			1 (0.0400)
H122			1 (0.0400)
H123			1 (0.0400)
H124			1 (0.0400)
H125			1 (0.0400)
H126			1 (0.0400)
H127			1 (0.1000)
H128			1 (0.1000)
H129			1 (0.1000)
H130			1 (0.1000)
H131			1 (0.1000)
H132	1 (0.1429)		
H133	1 (0.1429)		
H134	1 (0.1429)		
H135	1 (0.0370)	1 (0.0333)	
H136	1 (0.0370)		
H137	1 (0.0370)		
H138	1 (0.0370)		
H139	1 (0.0370)		
H140	1 (0.0370)		
H141	1 (0.0370)		
H142	1 (0.0370)		
H143	1 (0.0370)		
H144	1 (0.0370)		
H145	1 (0.0370)		
H146	1 (0.0370)		
H147		1 (0.0333)	
H148		1 (0.0333)	
H149		1 (0.0333)	
H150		1 (0.0333)	

continuación

H151	1 (0.0333)
H152	1 (0.0333)
H153	1 (0.0333)
H154	1 (0.0333)
H155	1 (0.0333)
H156	1 (0.0333)
H157	1 (0.0333)
H158	1 (0.0333)
H159	1 (0.0333)
H160	1 (0.0333)
H161	1 (0.0333)
H162	1 (0.0333)
H163	1 (0.0333)
H164	1 (0.0333)
H165	1 (0.0556)
H166	1 (0.0556)
H167	1 (0.0556)
H168	1 (0.0556)
H169	1 (0.0556)
H170	1 (0.0556)
H171	1 (0.0556)

ANEXO 08

Frecuencia de Haplotipos – *M. inca 16S*

Haplotipo	Haplotype Frequency																	
	JR (n=19)	Chir (n=6)	Chic (n=27)	Chao (n=29)	For (n=10)	Hb (n=26)	Lcr (n=25)	Moch (n=31)	Pat (n=31)	San (n=26)	Sup (n=24)	Tb (n=4)	Vir (n=26)	Zan (28)	Zar (n=23)			
H1	10 (0.5263)	2 (0.3333)	17 (0.6296)	22 (0.7586)		14 (0.5384)	10 (0.4000)	21 (0.6774)	10 (0.3220)	12 (0.4615)	18 (0.7500)	2 (0.5000)	13 (0.5000)	16 (0.5926)	14 (0.6087)			
H2			1 (0.0370)		1 (0.1000)										1 (0.0434)			
H3															1 (0.0434)			
H4															1 (0.0434)			
H5	3 (0.1579)	1 (0.1667)	2 (0.0741)	2 (0.0690)	5 (0.5000)	1 (0.0384)	2 (0.0800)	1 (0.0322)	7 (0.2258)	3 (0.1154)	3 (0.1250)		2 (0.0769)	2 (0.0740)	1 (0.0434)			
H6			1 (0.0370)												1 (0.0434)			
H7															1 (0.0434)			
H8															1 (0.0434)			
H9															1 (0.0434)			
H10						1 (0.0384)									1 (0.0434)			
H11														1 (0.0370)				
H12														1 (0.0370)				
H13									2 (0.0645)					1 (0.0370)				
H14														1 (0.0370)				
H15	1 (0.0526)					3 (0.1153)	3 (0.1200)	2 (0.0645)			2 (0.0769)	1 (0.0417)	4 (0.1538)	2 (0.0740)				
H16	1 (0.0526)		2 (0.0741)	2 (0.0690)	2 (0.2000)	1 (0.0384)	4 (0.1600)	1 (0.0322)	2 (0.0645)	2 (0.0769)	1 (0.0417)	2 (0.5000)	1 (0.0384)	2 (0.0740)				
H17													1 (0.0384)	1 (0.0370)				
H18	1 (0.0526)						1 (0.0400)		1 (0.0322)	1 (0.0384)			1 (0.0384)					
H19													1 (0.0384)					
H20													1 (0.0384)					
H21													1 (0.0384)					
H22													1 (0.0384)					
H23											1 (0.0417)							
H24								1 (0.0322)			1 (0.0384)							
H25											1 (0.0384)							
H26								1 (0.0322)			1 (0.0384)							
H27											1 (0.0384)							
H28											1 (0.0384)							
H29											1 (0.0384)							
H30									1 (0.0322)									

continuación

H31					1 (0.0322)
H32		1 (0.0370)			1 (0.0322)
H33					1 (0.0322)
H34					1 (0.0322)
H35			1 (0.1000)		1 (0.0322)
H36	1 (0.0526)			1 (0.0400)	1 (0.0322)
H37					1 (0.0322)
H38			1 (0.0384)		1 (0.0322)
H39					1 (0.0322)
H40					1 (0.0322)
H41					1 (0.0322)
H42				1 (0.0400)	
H43				1 (0.0400)	
H44				1 (0.0400)	
H45				1 (0.0400)	
H46			1 (0.0384)		
H47			1 (0.0384)		
H48			1 (0.0384)		
H49			1 (0.0384)		
H50			1 (0.0384)		
H51			1 (0.1000)		
H52		2 (0.3333)			
H53	1 (0.0526)	1 (0.1667)			
H54			1 (0.0370)		
H55			1 (0.0370)		
H56			1 (0.0370)		
H57				1 (0.0345)	
H58				1 (0.0345)	
H59				1 (0.0345)	
H60	1 (0.0526)				

ANEXO 09

Test de Saturación de las Secuencias del gen *COI* – *M. gallus*

Testing whether the observed Iss is significantly lower than Iss.c.

IssSym is Iss.c assuming a symmetrical topology.

IssAsym is Iss.c assuming an asymmetrical topology.

NumOTU	Iss	Iss.cSym	T	DF	P	Iss.cAsym	T	DF	P
4	0.055	0.803	91.646	615	0.0000	0.771	87.805	615	0.0000
8	0.054	0.762	83.527	615	0.0000	0.652	70.521	615	0.0000
16	0.056	0.739	81.020	615	0.0000	0.529	56.068	615	0.0000
32	0.058	0.714	77.924	615	0.0000	0.387	38.998	615	0.0000

Note: two-tailed tests are used.

Interpretation of results:

Significant Difference

Yes No

Iss < Iss.c Little saturation Substantial saturation

Iss > Iss.c Useless sequences Very poor for phylogenetics

Please cite:

Xia, X., Z. Xie, M. Salemi, L. Chen, Y. Wang. 2003. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Biology and Evolution* 20: 911-916.

Xia, X. and Lemey, P. 2009. Assessing substitution saturation with DAMBE. Pp. 615-630 in Philippe Lemey, Marco Salemi, and Patrick Dierckx (eds.), *Phylogenetic Analysis of Molecular Data*. Springer, New York.

ANEXO 10

Frecuencia de Haplotipos – *M. gallus COI*

Haplotype Frequency		
Haplotipo	Zar (n=21)	Tb (n=19)
H1	1 (0.476)	
H2	1 (0.476)	
H3	1 (0.476)	
H4	1 (0.476)	
H5	2 (0.0952)	
H6	1 (0.476)	
H7	1 (0.476)	
H8	1 (0.476)	
H9	2 (0.0952)	
H10	1 (0.476)	
H11	1 (0.476)	
H12	1 (0.476)	
H13	1 (0.476)	0.05263
H14	1 (0.476)	
H15	1 (0.476)	
H16	1 (0.476)	0.05263
H17	1 (0.476)	
H18	1 (0.476)	
H19	1 (0.476)	
H20		0.05263
H21		0.05263
H22		0.05263
H23		0.05263
H24		0.05263
H25		0.05263
H26		0.05263
H27		0.05263
H28		0.05263
H29		0.05263
H30		0.05263
H31		0.05263
H32		0.05263
H33		0.05263
H34		0.05263
H35		0.05263
H36		0.05263

ANEXO 11

Frecuencia de Haplotipos – *M. gallus 16S*

Haplotype Frequenc		
Haplotipo	Zar (n=22)	Tb (n=15)
H1	1 (0.0454)	
H2	2 (0.0909)	
H3	3 (0.1364)	3 (0.2000)
H4	2 (0.0909)	2 (0.1333)
H5	1 (0.0454)	
H6	2 (0.0909)	
H7	1 (0.0454)	
H8	1 (0.0454)	
H9	1 (0.0454)	
H10	1 (0.0454)	
H11	1 (0.0454)	
H12	1 (0.0454)	
H13	1 (0.0454)	
H14	1 (0.0454)	
H15	1 (0.0454)	
H16	1 (0.0454)	1 (0.0667)
H17	1 (0.0454)	
H18		1 (0.0667)
H19		2 (0.1333)
H20		1 (0.0667)
H21		1 (0.0667)
H22		2 (0.1333)
H23		1 (0.0667)
H24		1 (0.0667)

ANEXO 12

Algunos lugares de donde se obtuvieron los ejemplares



Río Zarumilla. Obsérvese la pequeña charca de donde los lugareños obtienen gran cantidad de especímenes de *M. gallus*, con abundante presencia de postlarvas



Río Zarumilla, captura de camarones con atarraya por lugareños del Puente Internacional – La Palma



Muestreo en río Tumbes, pescadores haciendo uso de calcaes



Canal del río Virú donde fue colectado el ejemplar de *M. americanum*



Pescador con ejemplar de *M. americanum* en canal de regadío de río Virú



Río Nepeña (Huambacho), pescador colectando camarones por buceo



Río Chao, pescadores colectando camarones por desvío de canales



Río Moche, pescador dedicado a la captura de camarones con ejemplar de *M. inca*



Muestreo en bolsas filtradoras en estanques de langostinos que captan agua por bombeo de la bocana del río Tumbes



Río Supe, muestreo levantando piedras por miembros del Comité de Pesca