

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



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**Estudio poblacional y búsqueda de Doble Herencia Uniparental en
Aulacomya atra (Molina, 1782) “choro”, en el litoral peruano, inferidas
mediante ADN mitocondrial y nuclear**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO
ACUICULTOR**

Tesista:

Bach. Yon Utrilla, Luis Angel

Asesor:

Dr. Zelada Mázmela, Eliana Victoria
ORCID: 0000-0002-5813-0954

Co-asesor:

M. Sc. Rodríguez Bernal, Karen Danai
ORCID: 0000-0002-7003-6100

Nuevo Chimbote – Perú

2025

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



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**Estudio poblacional y búsqueda de Doble Herencia Uniparental en
Aulacomya atra (Molina, 1782) “choro”, en el litoral peruano, inferidas
mediante ADN mitocondrial y nuclear**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO
ACUICULTOR**

Revisado y firmado por el Asesor y Co-asesor

Asesora
Dr. Zelada Mázmela, Eliana Victoria
DNI: 17842746
ORCID: 0000-0002-5813-0954

Co-asesora
M. Sc. Rodríguez Bernal, Karen Danai
DNI: 45417793
ORCID: 0000-0002-7003-6100

Nuevo Chimbote – Perú

2025

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



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**Estudio poblacional y búsqueda de Doble Herencia Uniparental en
Aulacomya atra (Molina, 1782) “choro”, en el litoral peruano, inferidas
mediante ADN mitocondrial y nuclear**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO
ACUICULTOR**

Revisado y aprobado por el jurado evaluador

Presidente
Dr. Quispe Villanueva, Manuel
DNI: 17916826
ORCID: 0000-0001-6120-8399

Secretario
Dr. Avalos Ramírez, Yosef Javier
DNI: 18127282
ORCID: 0000-0002-0071-8413

Integrante
Dr. Zelada Mázmela, Eliana Victoria
DNI: 17842746
ORCID: 0000-0002-5813-0954

Nuevo Chimbote – Perú

2025

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción, siendo las 13:00 horas del día 30 de Mayo del 2025, dando cumplimiento a la Resolución N° 475-2024-UNS-FC, se reunió el Jurado Evaluador presidido por Dr. Manuel Sixto Quespe Villanueva, teniendo como miembros a Dr. Yosef Javier Avalos Ramírez (secretario) (a), y Dr. Eltona Zelada Mázmele (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de Biólogo Acuicultor realizado por el, (la), (los) tesista (as) Lurs Angel Yon Utrilla

....., quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada: " Estudio poblacional y búsqueda de Doble Herencia Uniparental en Aulacomya atra (Molina, 1782) "choro", en el litoral peruano, inferidas mediante ADN mitocondrial y nuclear"

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

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como Excelente asignándole un calificativo de Diecinueve (19) puntos, según artículo 112° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 337-2024-CU-R-UNS).

Siendo las 13:00 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad


Nombre: Dr. Manuel Quespe Villanueva
Presidente


Nombre: Dr. Yosef Javier Avalos Ramirez
Secretario


Nombre: Dr. Eltona Zelada Mázmele
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (), tesistas () y archivo (02).



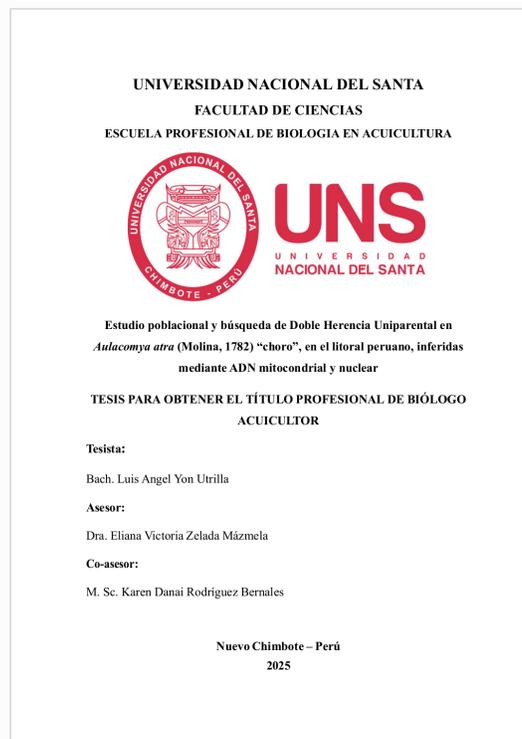


Recibo digital

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

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Luis Angel YON UTRILLA
Título del ejercicio: PROYECTO UNS 2025
Título de la entrega: Estudio poblacional y búsqueda de Doble Herencia Uniparent...
Nombre del archivo: l_peruano,_inferidas_mediante_ADN_mitocondrial_y_nuclear_1...
Tamaño del archivo: 6.56M
Total páginas: 106
Total de palabras: 31,560
Total de caracteres: 149,067
Fecha de entrega: 28-may.-2025 08:30a. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega: 2686815581



Estudio poblacional y búsqueda de Doble Herencia Uniparental en *Aulacomya atra* (Molina, 1782) "choro", en el litoral peruano, inferidas mediante ADN mitocondrial y nuclear

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%	14%	5%	2%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	4%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	3%
3	core.ac.uk Fuente de Internet	1%
4	cicese.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	1%
5	www.investigobiblioteca.uvigo.es Fuente de Internet	<1%
6	pneumocystis.uc.edu Fuente de Internet	<1%
7	Submitted to Universidad del Valle de Guatemala Trabajo del estudiante	<1%
8	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1%
9	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	<1%
10	ri.uaemex.mx Fuente de Internet	<1%
11	repositorio.unnoba.edu.ar Fuente de Internet	<1%
12	María Atencia, Angie Toro-Cantillo, Richard Hoyos-López. "Diversidad genética y estructura poblacional de <i>Anopheles triannulatus</i> s.l. en Córdoba, Colombia, determinadas mediante el método de región	<1%

DEDICATORIA

A mis padres, por haberme apoyado incondicionalmente en este largo camino. Su amor, paciencia y consejos fueron pilares fundamentales para alcanzar esta meta. Gracias por enseñarme a perseverar y creer en mí.

A mis hermanos, Andrea, Luis, José y Roberto, por ser mi soporte emocional en los momentos más difíciles. Su compañía y palabras de aliento fueron un impulso constante en esta etapa de mi vida.

LUIS ANGEL YON UTRILLA

AGRADECIMIENTO

La culminación de esta tesis representa el fruto del esfuerzo, la perseverancia y la dedicación personal, así como del constante apoyo de mi familia. A lo largo de este camino, muchas personas me brindaron su respaldo y aliento, por lo cual deseo expresar mi más sincera gratitud a cada una de ellas.

A la Dra. Eliana Zelada Mázmela, asesora de este trabajo, jefa del Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción, y una mentora ejemplar. Le estaré siempre profundamente agradecido por sus enseñanzas, por sus valiosos consejos —tanto académicos como personales— y por brindarme la oportunidad de formar parte del laboratorio. Gracias por abrirme las puertas al fascinante mundo de la Biología Molecular, por ser un ejemplo de perseverancia y pasión por la ciencia. Le expreso mi respeto, admiración y eterno agradecimiento.

A mi Co-asesora Karen Rodríguez Bernales, por su constante apoyo durante el procesamiento de muestras y su orientación en el aprendizaje de técnicas moleculares. Su compromiso y disposición fueron esenciales para el desarrollo de este trabajo.

Al Biólogo Eduardo Reyes, por su guía paciente durante el análisis bioinformático de esta investigación y por crear un ambiente de entusiasmo y camaradería en el laboratorio.

A la Autoridad Nacional de Sanidad e Inocuidad en Pesca y Acuicultura (SANIPES), por la donación de las muestras de *choro* empleadas en todas las estaciones de muestreo utilizadas en esta tesis. Su contribución fue fundamental para la realización de este estudio.

A mis compañeros del laboratorio: Luis Enrique, Lise, Claudia, Ángela, Daniela, Mariether y Diego. Gracias por su apoyo constante, sus aportes, la colaboración en los procedimientos moleculares y, sobre todo, por su valiosa amistad.

A mis padres, por creer siempre en mí, por su apoyo incondicional y por brindarme todo lo que estuvo a su alcance. No existen palabras suficientes para expresar lo agradecido que estoy por su amor y confianza.

A mis amigos Gazzo, Kiara, Frank y David, por su compañía y amistad durante todos estos años. Gracias por estar presentes y por creer en mí en cada etapa del camino.

A mi pareja, Leydi, por acompañarme en los momentos más importantes, por su apoyo constante y por confiar siempre en mis capacidades. Gracias por estar a mi lado en este proceso.

A todos y cada uno de ustedes, les expreso mi más profunda gratitud y cariño.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Descripción de la especie <i>Aulacomya atra</i>	5
2.2. Genética de poblaciones en bivalvos marinos	6
2.3. Estructura y conectividad genética poblacional.....	8
2.4. Diversidad genética intra e inter poblacional	8
2.5. El ADN mitocondrial.....	10
2.6. Marcadores del ADN mitocondrial	10
2.7. Marcadores del ADN nuclear.....	11
2.8. Marcadores mitocondriales y nucleares en estudios poblacionales	12
2.9. Doble Herencia Uniparental en bivalvos.....	14
2.10. Estudios poblacionales en <i>Aulacomya atra</i>	17
III. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo general.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1. Fuente de los ácidos nucleicos (ADN)	19
4.1.1. Material de estudio	19
4.1.2. Extracción de ADN genómico.....	21
4.1.3. Calidad e integridad del ADN	21
4.1.4. Cuantificación del ADN.....	21
4.1.5. Amplificación de los genes mitocondriales y nucleares	21

4.2. Caracterización de la identidad molecular y diferenciación genética de <i>A. atra</i> mediante el análisis de los genes nucleares <i>18S</i> e <i>ITS-28S</i>	22
4.2.1. Amplificación de los genes nucleares <i>18S</i> e <i>ITS-28S</i> por PCR.....	22
a) Amplificación del gen <i>18S</i>	22
b) Amplificación del gen <i>ITS-28S</i>	23
4.3. Detección de Doble Herencia Uniparental (DUI) en <i>A. atra</i> a través del análisis de los genes mitocondriales <i>16S</i> y <i>COI</i> en tejido gonadal.....	23
4.3.1. Selección de individuos y determinación del sexo	23
4.3.2. Amplificación de genes mitocondriales <i>COI</i> y <i>16S</i> por PCR	23
a) Amplificación del gen <i>COI</i>	23
b) Amplificación del gen <i>16S</i>	24
4.4. Evaluación de la heteroplasma en <i>A. atra</i> mediante la secuenciación de los genes mitocondriales <i>16S</i> y <i>COI</i> en tejido somático	24
4.5. Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de <i>A. atra</i> con base en marcadores mitocondriales y nucleares.....	24
4.6. Purificación y secuenciación Sanger de los fragmentos amplificados.....	25
4.6.1. Purificación de los productos PCR.....	25
4.6.2. Secuenciación Sanger de los fragmentos amplificados	25
4.7. Técnicas de procesamiento de datos	26
4.7.1. Caracterización de la identidad molecular y diferenciación genética de <i>A. atra</i> mediante el análisis de los genes nucleares <i>18S</i> e <i>ITS-28S</i>	27
4.7.2. Detección de Doble Herencia Uniparental (DUI) en <i>A. atra</i> a través del análisis de los genes mitocondriales <i>16S</i> y <i>COI</i> en tejido gonadal	28
4.7.3. Evaluación de la heteroplasma en <i>A. atra</i> mediante la secuenciación de los genes mitocondriales <i>16S</i> y <i>COI</i> en tejido somático.....	29
4.7.4. Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de <i>A. atra</i> con base en marcadores mitocondriales y nucleares	30
a) Estimación de la diversidad genética de <i>A. atra</i>	30
b) Determinación de la estructura poblacional de <i>A. atra</i>	30

c)	Análisis de las relaciones filogenéticas de <i>A. atra</i>	30
d)	Análisis del historial demográfico de <i>A. atra</i>	31
V.	RESULTADOS	32
5.1.	Fuente de secuencias de ADN.....	32
5.2.	Caracterización de la identidad molecular y diferenciación genética de <i>A. atra</i> mediante el análisis de los genes nucleares <i>18S</i> e <i>ITS-28S</i>	33
5.3.	Detección de Doble Herencia Uniparental (DUI) en <i>A. atra</i> a través del análisis de los genes mitocondriales <i>16S</i> y <i>COI</i> en tejido gonadal.....	36
5.4.	Evaluación de la heteroplasma en <i>A. atra</i> mediante la secuenciación de los genes mitocondriales <i>16S</i> y <i>COI</i> en tejido somático	39
5.5.	Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de <i>A. atra</i> con base en marcadores mitocondriales y nucleares.....	45
5.5.1.	Diversidad genética de los marcadores nucleares <i>18S</i> e <i>ITS-28S</i>	45
5.5.2.	Diversidad genética de los marcadores mitocondriales <i>16S</i> y <i>COI</i>	45
a)	Marcador <i>16S</i> (Mitotipos F y M).....	45
b)	Marcador <i>COI</i> (Mitotipos F y M).....	46
5.5.3.	Estructura poblacional de <i>A. atra</i> de los marcadores mitocondriales.....	47
a)	Estructura poblacional de los mitotipos F y M del gen <i>16S</i>	47
b)	Estructura poblacional de los mitotipos F y M del gen <i>COI</i>	50
5.5.4.	Relaciones filogenéticas entre los genes nucleares (<i>18S</i> e <i>ITS-28S</i>) y mitocondriales (<i>16S</i> y <i>COI</i>).....	54
5.5.5.	Historia demográfica de los genes mitocondriales <i>16S</i> y <i>COI</i>	58
a)	Mitotipos F y M del <i>16S</i>	58
b)	Mitotipos F y M del gen <i>COI</i>	59
VI.	DISCUSIÓN	60
VII.	CONCLUSIONES	68
VIII.	RECOMENDACIONES.....	69
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

X.	ANEXOS	82
10.1.	Anexo 1. Alineamiento de los genes mitocondriales (<i>COI</i> y <i>16S</i>) y nucleares (<i>18S</i> e <i>ITS-28S</i>).....	82
10.2.	Anexo 2. Haplotipos encontrados, sitios polimórficos y frecuencias de los marcadores mitocondriales <i>16S</i> y <i>COI</i> de 6 poblaciones de <i>A. atra</i>	85
10.3.	Anexo 3. Secuencias de referencia de <i>A. atra</i> y grupos externos utilizadas en los análisis filogenéticos	90
10.4.	Anexo 4. Tablas que registran la distribución de los mitotipos F y M en muestras de tejido gonadal.....	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ubicación geográfica de los bancos naturales de <i>A. atra</i>	19
Tabla 2. Descripción de <i>primers</i> mitocondriales (<i>COI</i> , <i>16S</i>) y nucleares (<i>18S</i> , <i>28S</i> , <i>ITS</i>)...22	22
Tabla 3. Distancias genéticas del gen <i>18S</i> de <i>A. atra</i> , basados en el modelo de Jukes-Cantor (JC).....34	34
Tabla 4. Distancias genéticas del gen <i>ITS-28S</i> de <i>A. atra</i> , basados en el modelo de Kimura de dos parámetros (K2P).	36
Tabla 5. Distancias genéticas promedio entre mitotipos F y M del gen <i>16S</i> de <i>A. atra</i> , calculadas bajo el modelo Tamura 3-parameter ($G = 1$).	37
Tabla 6. Distancias genéticas promedio entre mitotipos F y M del gen <i>COI</i> de <i>A. atra</i> , calculadas bajo el modelo Tajima-Nei.37	37
Tabla 7. Distancias genéticas (p-distancia) entre tejidos de <i>A. atra</i> (gen <i>16S</i>).39	39
Tabla 8. Distancias genéticas (p-distancia) entre tejidos de <i>A. atra</i> (gen <i>COI</i>).....39	39
Tabla 9. Distribución de los mitotipos F y M en el músculo aductor de machos y hembras de <i>A. atra</i> , basado en el gen mitocondrial <i>16S</i>	42
Tabla 10. Distribución de los mitotipos F y M en el músculo aductor de machos y hembras de <i>A. atra</i> , basado en el gen mitocondrial <i>COI</i>42	42
Tabla 11. Detección de mitotipos F y M en tejido somático (músculo aductor) de 40 individuos (20 hembras y 20 machos) de <i>A. atra</i> mediante el gen <i>16S</i> , provenientes de las localidades de Morro Sama y Marcona. (+ Presente, – Ausente).....43	43
Tabla 12. Detección de mitotipos F y M en tejido somático (músculo aductor) de 40 individuos (20 hembras y 20 machos) de <i>A. atra</i> mediante el gen <i>COI</i> , provenientes de las localidades de Morro Sama y Marcona. (+ Presente, – Ausente).....44	44
Tabla 13. Índices de diversidad genética de 6 poblaciones de <i>A. atra</i> basado en la región <i>16S</i>46	46
Tabla 14. Índices de diversidad genética de 6 poblaciones de <i>A. atra</i> basado en la región <i>COI</i>47	47
Tabla 15. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de los mitotipos F y M del gen <i>16S</i> de 6 poblaciones de <i>A. atra</i>50	50
Tabla 16. Diferenciación genética por pares de F_{st} de las 6 poblaciones de <i>A. atra</i> basados en el mitotipo F del gen <i>16S</i>	50
Tabla 17. Diferenciación genética por pares de F_{st} de las 6 poblaciones de <i>A. atra</i> basados en el mitotipo M del gen <i>16S</i>50	50

Tabla 18. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de los mitotipos F y M del gen <i>COI</i> de 6 poblaciones de <i>A. atra</i>	53
Tabla 19. Diferenciación genética por pares de F_{st} de las 6 poblaciones de <i>A. atra</i> basados en el mitotipo F del gen <i>COI</i>	53
Tabla 20. Diferenciación genética por pares de F_{st} de las 6 poblaciones de <i>A. atra</i> basados en el mitotipo M del gen <i>COI</i>	53
Tabla 21. Test de neutralidad de los haplotipos del mitotipo F del gen <i>16S</i> de las poblaciones de <i>A. atra</i>	58
Tabla 22. Test de neutralidad de los haplotipos del mitotipo M del gen <i>16S</i> de las poblaciones de <i>A. atra</i>	58
Tabla 23. Test de neutralidad de los haplotipos del mitotipo F del gen <i>COI</i> de las poblaciones de <i>A. atra</i>	59
Tabla 24. Test de neutralidad de los haplotipos del mitotipo M del gen <i>COI</i> de las poblaciones de <i>A. atra</i>	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología comparativa de la especie <i>Aulacomya atra</i>	6
Figura 2. Genoma mitocondrial típico de <i>Mytilus</i>	10
Figura 3. Diagrama esquemático del grupo génico de rDNA.....	12
Figura 4. Distribución tisular de los mitotipos M (azul) y F (rosado) en moluscos bivalvos con DUI.....	14
Figura 5. Ubicación geográfica de los bancos naturales de <i>A. atra</i>	20
Figura 6. Extracción de ADN mediante el protocolo CTAB-Fenol-Clorformo de <i>A. atra</i>	32
Figura 7. Amplificación de los genes mitocondriales <i>16S</i> y <i>COI</i> de <i>A. atra</i>	32
Figura 8. Amplificación de los genes nucleares <i>18S</i> e <i>ITS-28S</i> de <i>A. atra</i>	33
Figura 9. Árbol filogenético de <i>A. atra</i> basado en el gen <i>18S</i> , inferido mediante el método Neighbor-Joining (NJ).....	34
Figura 10. Árbol filogenético de <i>A. atra</i> basado en el gen <i>ITS-28S</i> , inferido mediante el método Neighbor-Joining (NJ).....	35
Figura 11. Árbol filogenético inferido por análisis bayesiano a partir de las secuencias concatenadas de los genes mitocondriales <i>16S</i> y <i>COI</i> de <i>A. atra</i>	38
Figura 12. Árbol filogenético inferido por Maximum Likelihood (ML) bajo el modelo Tamura 3-parameter (T92), basado en secuencias del gen mitocondrial <i>16S</i> de <i>A. atra</i>	40
Figura 13. Árbol filogenético inferido por Maximum Likelihood (ML) bajo el modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G), basado en secuencias del gen mitocondrial <i>COI</i> de <i>A. atra</i>	41
Figura 14. Red de haplotipos inferidas del mitotipo F del gen <i>16S</i> de 6 poblaciones de <i>A. atra</i>	48
Figura 15. Red de haplotipos inferidas del mitotipo M del gen <i>16S</i> de 6 poblaciones de <i>A. atra</i>	49
Figura 16. Red de haplotipos inferidas del mitotipo F del gen <i>COI</i> de 6 poblaciones de <i>A. atra</i>	51
Figura 17. Red de haplotipos inferidas del mitotipo M del gen <i>COI</i> de 6 poblaciones de <i>A. atra</i>	52
Figura 18. Árbol Neighbor Joining (NJ, modelo JC) basado en el mitotipo F del gen mitocondrial <i>16S</i> de 6 poblaciones de <i>A. atra</i>	54
Figura 19. Árbol Neighbor Joining (NJ, modelo JC) basado en el mitotipo M del gen mitocondrial <i>16S</i> de 6 poblaciones de <i>A. atra</i>	55

Figura 20. Árbol Neighbor Joining (NJ, modelo JC) basado en el mitotipo F del gen mitocondrial *COI* de 6 poblaciones de *A. atra*.56

Figura 21. Árbol Neighbor Joining (NJ, modelo JC) basado en el mitotipo M del gen mitocondrial *COI* de 6 poblaciones de *A. atra*.57

Estudio poblacional y búsqueda de Doble Herencia Uniparental en *Aulacomya atra* (Molina, 1782) “choro”, en el litoral peruano, inferidas mediante ADN mitocondrial y nuclear

RESUMEN

Aulacomya atra es un bivalvo marino de importancia ecológica y económica en el Perú, cuya explotación ha sido intensiva, afectando la viabilidad de sus poblaciones. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la estructura poblacional y la posible presencia de Doble Herencia Uniparental (DUI) en *A. atra*, mediante el análisis de marcadores moleculares mitocondriales (*16S* y *COI*) y nucleares (*18S* e *ITS-28S*). Se recolectaron muestras de seis bancos naturales distribuidos entre Ica y Tacna. La identidad molecular fue confirmada mediante el gen *18S*, que mostró una completa conservación, mientras que el gen *ITS-28S* evidenció la ausencia de divergencia genética entre individuos peruanos y secuencias de referencia de Sudáfrica y Nueva Zelanda. Los análisis filogenéticos y de distancias genéticas de los genes mitocondriales revelaron la existencia de dos linajes diferenciados (mitotipos F y M), asociados al sexo, confirmando la presencia de DUI. Además, se detectó heteroplasma en el tejido somático de machos. Los análisis de diversidad genética mostraron altos niveles haplotípicos en ambos mitotipos, especialmente en el mitotipo M. La estructura poblacional inferida por AMOVA y F_{st} indicó una alta conectividad genética entre poblaciones, sin diferenciación geográfica significativa. Finalmente, los test de neutralidad sugirieron una posible expansión poblacional reciente. Estos resultados proporcionan información esencial para la gestión y conservación de *A. atra* en el litoral peruano, destacando la importancia de considerar la DUI en estudios genéticos poblacionales.

Palabras claves: *Aulacomya atra*, Doble Herencia Uniparental (DUI), estructura poblacional, ADN mitocondrial, ADN nuclear, heteroplasma, filogenia molecular, diversidad genética

Population Study and Detection of Doubly Uniparental Inheritance in *Aulacomya atra* (Molina, 1782) “choro”, along the Peruvian coast, inferred through mitochondrial and nuclear DNA

ABSTRACT

Aulacomya atra is a marine bivalve of ecological and economic importance in Peru, whose overexploitation has impacted population viability. This study aimed to assess the population structure and the potential presence of Doubly Uniparental Inheritance (DUI) in *A. atra* using mitochondrial (*16S* and *COI*) and nuclear (*18S* and *ITS-28S*) molecular markers. Samples were collected from six natural banks between Ica and Tacna. Molecular identity was confirmed using the *18S* gene, which showed complete conservation, while the *ITS-28S* gene revealed no genetic divergence between Peruvian individuals and reference sequences from South Africa and New Zealand. Phylogenetic and genetic distance analyses based on mitochondrial genes revealed the existence of two sex-associated mitochondrial lineages (F and M mitotypes), confirming the presence of DUI. Additionally, heteroplasmy was detected in the somatic tissue of males. Genetic diversity analyses indicated high haplotypic levels in both mitotypes, especially in the M mitotype. AMOVA and *Fst* analyses revealed high genetic connectivity among populations, with no significant geographic differentiation. Finally, neutrality tests suggested a possible recent population expansion. These results provide essential insights for the management and conservation of *A. atra* along the Peruvian coast, emphasizing the importance of incorporating DUI in population genetic studies.

Keywords: *Aulacomya atra*, Doubly Uniparental Inheritance (DUI), population structure, mitochondrial DNA, nuclear DNA, heteroplasmy, molecular phylogeny, genetic diversity

I. INTRODUCCIÓN

El Perú ha obtenido el reconocimiento como uno de los diecisiete países considerados megadiversos debido a su vasta biodiversidad, que representa más del 70% de la biodiversidad global (MINAM, 2014, p. 14). Su extenso territorio abarca desde la costa desértica del Pacífico, pasando por la imponente cordillera de los Andes, hasta la vasta selva amazónica creando una amplia gama de hábitats que albergan una extraordinaria diversidad de especies. Además, la presencia de microclimas, como los producidos por la corriente de Humboldt y el fenómeno “El Niño”, también contribuyen a la diversidad al generar condiciones favorables para la vida y la evolución de numerosas especies (MINAM, 2014, p. 22; Tarazona *et al.*, 2003, p. 207).

De manera particular, la biodiversidad marina del Perú se caracteriza por ser amplia y variada, con una gran cantidad de especies que habitan en sus aguas. Se ha documentado la presencia de una gran diversidad de organismos, incluyendo peces, zooplancton, moluscos, equinodermos, crustáceos y otros invertebrados marinos (Uribe *et al.*, 2019, p. 333). Sin embargo, aún existen muchas incógnitas en la investigación de la biodiversidad marina en el Perú; llegando a existir grupos taxonómicos, como los microorganismos, las plantas marinas e invertebrados, que han sido poco estudiados y se desconoce su diversidad (Tarazona *et al.*, 2003, p. 223). Además, es importante considerar que se requiere de más estudios sistemáticos y de biogeografía para comprender mejor la diversidad y las relaciones evolutivas de las especies marinas en el país (Tarazona *et al.*, 2003, p. 223; Uribe *et al.*, 2019, p. 334).

Con respecto a los invertebrados, el mar peruano posee una gran diversidad resaltando una gran variedad de bivalvos, cuyo estudio más reciente presenta una lista taxonómica de alrededor de 401 especies distribuidas en 62 familias y 195 géneros (Paredes *et al.*, 2016, p. 128). Esta diversidad biológica se ve favorecida por la presencia de diferentes hábitats, como los arrecifes de coral, las praderas de algas y los bosques de manglares, que proporcionan refugio y alimento para una variedad de especies (Tarazona *et al.*, 2003, p. 223).

Sin embargo, la explotación pesquera se ha convertido en un serio problema que afecta a los bancos naturales de los invertebrados marinos (Gonzales y Espinoza, 2020, p. 73), disminuyendo las comunidades e influyendo en el funcionamiento y estructura de los ecosistemas (Tejada y Baldarrago, 2016, p. 63). En el caso particular de *Aulacomya atra* la sobreexplotación ha ocasionado selección artificial (Mena *et al.*, 2001, p. 75) y reducción de la talla media de sus poblaciones (Tejada y Baldarrago, 2016, p. 63); lo que sumado al evento

“El Niño” ha causado la desaparición de este bivalvo en algunas zonas del litoral peruano con la consiguiente pérdida de diversidad genética (Diaz y Ortlieb, 1993, p. 165; Soenens, 1985, p. 52). Por lo tanto, es crucial realizar estudios genético poblacionales de *A. atra* que permitan desarrollar planes de manejo y explotación sostenible para esta especie (Mena *et al.*, 2001, p. 76).

Por otro lado, la influencia de la dispersión o deriva larval en la diversidad genética de bivalvos es un problema importante en la conservación y explotación sostenible de estas especies. La deriva larval puede afectar la estructura genética de las poblaciones de bivalvos, ya que la capacidad de dispersión de las larvas puede variar entre especies y entre diferentes ambientes marinos (Hedgecock, 1986, p. 561). Además, la deriva larval puede llevar a la formación de poblaciones aisladas y a la pérdida de diversidad genética debido a la falta de flujo génico entre ellas (Hellberg, 1996, p. 1172), pudiendo estos procesos tener consecuencias negativas para la adaptabilidad y supervivencia de las poblaciones de bivalvos, especialmente en un contexto de cambio climático y alteraciones en los ecosistemas marinos (Kyle y Boulding, 2000, p. 841).

Otro aspecto importante a tener en cuenta en los estudios poblacionales, es que algunos bivalvos poseen un modo de transmisión asociado al género, llamado Doble Herencia Uniparental (DUI, por sus siglas en inglés) que comprende la herencia del ADNmt tanto por vía materna como paterna (Lubosny *et al.*, 2020, p. 7); considerándose una excepción a la herencia del ADNmt que suele ser estrictamente materna (SMI) en metazoos (Féral, 2002, p. 131). Por lo tanto, la DUI plantea desafíos en los estudios poblacionales porque puede afectar la interpretación de los patrones de diversidad genética y la inferencia de la historia demográfica de las especies, ya que la selección sexual y deriva genética pueden influir en ellos, llevando a una sobreestimación o subestimación de la diversidad poblacional (Stewart *et al.*, 2020, p. 315; Zouros, 2013, p. 9). Entonces, estos aspectos de la DUI plantean desafíos adicionales para comprender la evolución y la dinámica de las poblaciones de bivalvos; por tanto, es fundamental considerar que esta forma de herencia exige desarrollar métodos analíticos apropiados para abordar los desafíos que plantea en los estudios de diversidad genética poblacional.

Es importante tener en cuenta, que la presencia de DUI en mitílidos representa todo un reto en los estudios de diversidad genética, ya que las secuencias de ADNmt por sí solas no son suficientes para comprender completamente la estructura genética poblacional en estas especies (Liu *et al.*, 2017, p. 223). Por lo tanto, es necesario utilizar enfoques moleculares

más complejos y combinar diferentes marcadores para obtener una visión más completa de la diversidad genética en este grupo.

Aulacomya atra es una especie de mejillón que se encuentra tanto en hábitats submareales como intermareales y puede proporcionar hábitat y refugio para otras especies marinas, como crustáceos y moluscos más pequeños (Caza *et al.*, 2016, p. 4) lo que la convierte en una especie centinela importante para evaluar el efecto del estrés ambiental. Asimismo, *A. atra* es particularmente sensible al cambio climático, por lo que es una especie importante para el biomonitoreo del impacto de los contaminantes y el cambio climático proporcionando información valiosa para la conservación y gestión de estos ecosistemas (Caza *et al.*, 2016, p. 5; Gonzales y Espinoza, 2020, p. 72).

Asimismo, *A. atra* es una especie que debido a su delicioso sabor y su accesible precio es altamente consumida por la población peruana, principalmente para consumo directo (PRODUCE, 2022, p. 91). Su extracción fue de 1223 t en 2020 (PRODUCE, 2021, p. 48) y 1323 t en 2021 (PRODUCE, 2022, p. 55) desempeñando un papel significativo para los pescadores marisqueros. Sin embargo, la pesca artesanal ha experimentado una disminución a lo largo del tiempo que va desde 10 000 t en los años 50 a 1323 t en 2021 (IMARPE, 2018, p. 3; PRODUCE, 2022, p. 55), afectando de manera importante al mercado nacional (García, 2015, p. 5).

La falta de estudios genético poblacionales en bivalvos marinos dificulta la comprensión de la variabilidad genética presente en estas poblaciones y su importancia para su conservación y manejo adecuado (Andrews y Luikart, 2014, p. 1665). Sin esta información, es difícil determinar la salud y la viabilidad de las poblaciones de bivalvos marinos, así como su capacidad de adaptarse a cambios ambientales y resistir enfermedades (Féral, 2002, p. 133). Además, la falta de conocimiento sobre la genética de estas especies puede llevar a decisiones de gestión inadecuadas, como la sobreexplotación de poblaciones con una diversidad genética limitada o la introducción de individuos de origen desconocido que podrían tener consecuencias negativas para las poblaciones nativas (Plough, 2016, p. 574). Por lo tanto, es crucial realizar estudios poblacionales en bivalvos marinos para obtener información precisa sobre su diversidad genética y utilizarla como base para la gestión y conservación efectiva de estas especies.

Esta situación que, sumado a los cambios climáticos y la competencia con especies exóticas invasoras de mejillones, ejercen impacto sobre la biometría y la sostenibilidad de *A. atra*,

afectando negativamente a sus bancos naturales (Caza *et al.*, 2016, p. 2; Gonzales y Espinoza, 2020, p. 76, IMARPE, 2018, p. 28). Cabe señalar que *A. atra* es una especie cuya extracción data desde 1950 (IMARPE, 2018, p. 3); pero en cuya extracción, recientemente en 2020 se ha establecido un período de veda reproductiva para esta especie en el litoral peruano, abarcando los meses de septiembre a noviembre (R.M. N° 309-2020; PRODUCE, 2020). Esta falta de medidas de conservación adecuadas, dificulta también la explotación sostenible de este recurso (Gonzales y Espinoza, 2020, p. 78).

En este contexto, los estudios genético poblacionales desempeñan un papel crucial en la comprensión de la estructura y la dinámica de las poblaciones, lo que permitiría tomar medidas efectivas para la conservación y manejo sostenible de *A. atra* (Mena *et al.*, 2001, p. 76). Estos estudios proporcionarán información sobre la diversidad genética, la conectividad entre las poblaciones y la identificación de unidades de conservación, lo que contribuirá a la implementación de estrategias de gestión basadas en la genética y a la toma de decisiones informadas para la protección de la especie (Petrou *et al.*, 2021, p. 6). Por otro lado, los estudios genético poblacionales son fundamentales para abordar el problema de la sobreexplotación pesquera de *A. atra* en el Perú y para promover su conservación a largo plazo (Gandra *et al.*, 2020, p. 1410; Gonzales y Espinoza, 2020, p. 74).

Asimismo, el conocimiento de la estructura genética de las especies es clave para comprender los patrones de conectividad y definir las escalas espacio-temporales en las que se deben diseñar e implementar planes de gestión y conservación. La distribución de la diversidad genética (dentro y entre poblaciones) influye en gran medida en la capacidad de las especies para adaptarse a los cambios ambientales, lo que determina en última instancia su capacidad de recuperación a largo plazo frente a las perturbaciones ecológicas como la sobreexplotación pesquera (Gandra *et al.*, 2020, p. 1409; Gonzales y Espinoza, 2020, p. 74; Zhou *et al.*, 2015, p. 138). De esta manera, los estudios poblacionales pueden proporcionar información valiosa para la conservación de especies a largo plazo al identificar poblaciones críticas, evaluar la conectividad entre ellas y diseñar estrategias de gestión adaptativas que promuevan la diversidad genética y la resiliencia de las poblaciones (Gandra *et al.*, 2020, p. 1403).

Por otra parte, la evaluación de la DUI del ADN mitocondrial es de gran importancia en los estudios genético-poblacionales de moluscos bivalvos, debido a que la DUI puede afectar la estructura genética de las poblaciones y la diversidad genética, lo que puede tener implicaciones importantes para la conservación de las especies (Stewart *et al.*, 2020, p. 313).

Además, la DUI puede proporcionar información valiosa sobre la historia evolutiva de las especies y las relaciones filogenéticas entre ellas (Zouros, 2013, p. 15). Por lo tanto, la evaluación de la DUI es esencial para comprender la biología y la evolución de los moluscos bivalvos y para desarrollar estrategias efectivas de conservación y manejo de estas especies.

A pesar que la biodiversidad de organismos acuáticos es fundamental para lograr un desarrollo sostenible y una gestión adecuada de los recursos marinos (Zhou *et al.*, 2015, p. 138), hasta el momento no se ha llevado a cabo ningún estudio genético poblacional que proporcione información sobre el estado de *A. atra*. Además, no existen investigaciones que aborden la delimitación de los dos posibles linajes o DUI en el género *Aulacomya*. Por lo tanto, resulta imperativo realizar estudios que analicen las poblaciones de *A. atra* y examinen la posible DUI en esta especie en el litoral peruano.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Descripción de la especie *Aulacomya atra*

Aulacomya atra pertenece al filo Mollusca, clase Bivalvia y familia Mytilidae. El género *Aulacomya* incluye cuatro especies, a saber: *A. regia*, *A. atra*, *A. maoriana* y *A. capensis*, pero es *A. atra* la que tiene una distribución más amplia que las demás (Caza *et al.*, 2016, p. 2; WORMS, 2023). Estudios previos realizados por Rodríguez (2021, p. 77) sugiere que, esta especie presenta dos linajes mitocondriales, lo cual indica la posible existencia de especies crípticas o un fenómeno de DUI en las costas peruanas, pero que esta situación plantea interrogantes y aún requiere una mayor claridad (Rodríguez, 2021, p. 77).

La especie *A. atra*, conocida popularmente como cholga o choro, es un molusco bivalvo de gran importancia que habita en las costas del Perú (IMARPE, 2018, p. 3). Su valva, de forma ovalada, exhibe colores que van desde el negro y el negro violáceo hasta tonalidades cafés, con notables estrías concéntricas de crecimiento y costillas radiales (Figura 1). En contraste, su cara interna presenta una apariencia nacarada con matices en tonos violáceos y rosados (Guzmán *et al.*, 1998, p. 61). Este bivalvo se adhiere firmemente a sustratos sólidos y rocosos, formando grandes agregaciones en la zona del mesolitoral e infralitoral hasta los 30 m de profundidad, que proporciona microhábitats para macroalgas, epibiontes y especies de la macrofauna (Avendaño y Cantillánez, 2014, p. 2; Zaixso, 2004, p. 72; Zuñiga, 2002, p. 63).

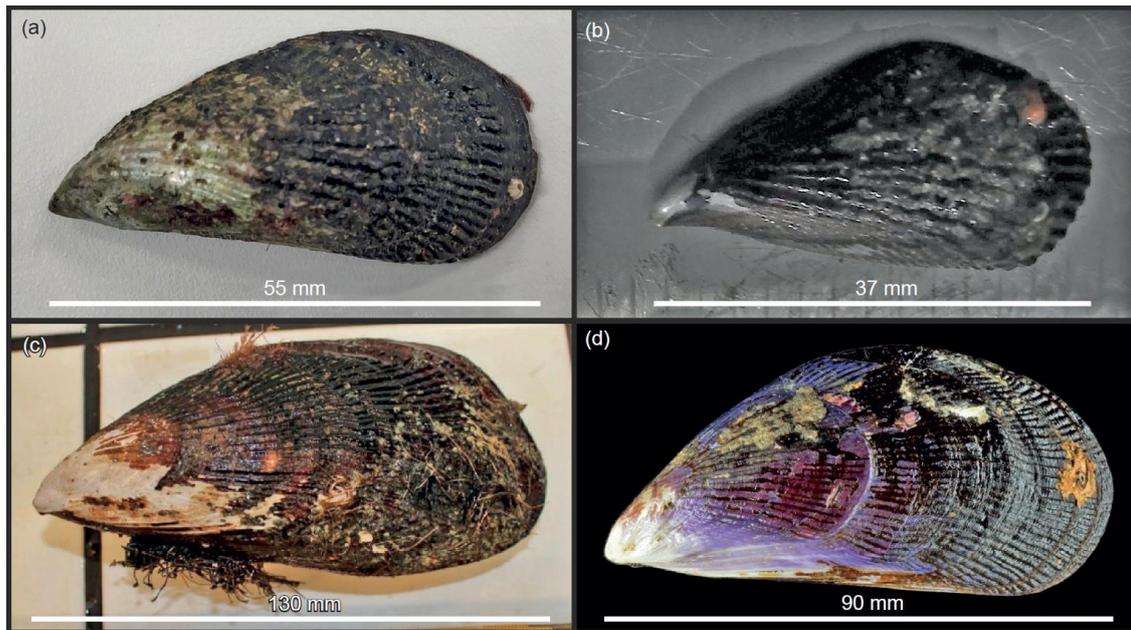


Figura 1. Morfología comparativa de la especie *Aulacomya atra* de Sudáfrica (a, b), Chile (c) y Nueva Zelanda (d) (Grobler *et al.*, 2023, p. 31).

El mejillón *A. atra* se distribuye en el océano Pacífico desde el Callao (Perú) hasta el Estrecho de Magallanes (Chile); en el océano Atlántico, desde el sur de Argentina hasta el sur de Brasil; y en África, desde Rocky Point en el norte hasta Port Alfred en la costa sureste (Caza *et al.*, 2016, p. 2; IMARPE, 2018, p. 3). Además, se encuentra en las costas de Nueva Zelanda, las islas Kerguelen y las islas Malvinas (Caza *et al.*, 2016, p. 2).

2.2. Genética de poblaciones en bivalvos marinos

La diversidad genética y su relación con la distribución geográfica y la interconexión de las poblaciones, son aspectos de gran importancia en la biología evolutiva y la conservación de especies. Varios estudios han abordado estos temas en diferentes especies de mejillones, por ejemplo, en un trabajo realizado por Kijewski *et al.* (2011, p. 228), se emplearon marcadores moleculares nucleares *Me 15/16*, *ITS* y *EF-bis*, y mitocondriales *COIII* para examinar la distribución de diferentes especies del género *Mytilus* en áreas costeras europeas. Los resultados revelaron una elevada diversidad genética en el ADNmt (ADN mitocondrial) de *Mytilus galloprovincialis*, lo que estaría indicando la existencia de divergencia genética entre sus poblaciones.

Mao *et al.* (2010, p. 31) investigaron la filogenia del género *Mytilus* mediante secuencias de los genes mitocondriales *COI* y *16S*, y observaron una relación entre la diversidad genética de las distintas especies de *Mytilus* y su distribución geográfica, sugiriendo que la distancia entre poblaciones de mejillones afecta considerablemente. De igual forma, Mathiesen *et al.*

(2016, p. 49) analizaron la diversidad genética y la conexión entre especies de *Mytilus* en las regiones ártica y subártica, concluyendo que la diversidad genética estaba influida tanto por la distancia geográfica, como por la conectividad entre las poblaciones.

Los patrones de haplotipos en moluscos bivalvos también proporcionan información sobre procesos evolutivos, lo que puede indicar la recuperación de un cuello de botella, barridos selectivos, expansión y origen poblacional común. Patrones en forma de estrella, por ejemplo, señalan el origen de las poblaciones actuales a partir de una expansión demográfica compartida (Martínez *et al.*, 2015, p. 11; Ni *et al.*, 2015, p. 12; Wang *et al.*, 2017, p. 6).

En cuanto a los índices de fijación (F_{ST}), estos indican diferencias genéticas, flujo de genes, divergencia y estructuración genética en las poblaciones de bivalvos marinos. Valores altos de F_{ST} (0.572), como se observó en secuencias del gen *18S* y *COIII* en Zhou *et al.* (2015, p. 139), señalan un bajo flujo de genes y una alta diferenciación genética entre las poblaciones. Por el contrario, valores más bajos de F_{ST} (-0.014), como se encontró en Ye *et al.* (2015, p. 475), indican una baja divergencia genética.

Por otro lado, un aspecto importante a tener en cuenta es la deriva larval la que puede significar un gran impacto en la diversidad genética de los bivalvos marinos. La falta de barreras físicas para el intercambio genético en el mar y la fase de natación libre de las larvas de muchos taxa marinos, predicen tasas de dispersión altas (Luttikhuizen *et al.*, 2003, p. 2216). Sin embargo, estudios genéticos han demostrado que algunas poblaciones de bivalvos marinos presentan una estructura genética más divergente de lo esperado, lo que sugiere que la deriva larval puede limitar la conectividad entre poblaciones (Luttikhuizen *et al.*, 2003, p. 2227). Por ejemplo, estudios en la especie *Macoma balthica* han encontrado una estructura genética divergente entre poblaciones europeas, incluyendo poblaciones altamente divergentes en el mar Báltico y diferencias significativas entre poblaciones del Atlántico noreste y noroeste (Hummel *et al.*, 2000, p. 630). Estos patrones sugieren que la deriva larval puede limitar la dispersión efectiva y la mezcla genética entre poblaciones de bivalvos marinos, lo que puede tener consecuencias importantes para la adaptación y la conservación de estas especies.

En resumen, la diversidad genética, la distribución geográfica y la estructura de las poblaciones de mejillones están estrechamente relacionadas, pudiendo la diversidad genética revelar procesos evolutivos, así como proporcionar información valiosa para la conservación de estas especies.

2.3. Estructura y conectividad genética poblacional

El análisis de la estructura genética de las poblaciones es clave para identificar unidades reproductivas aisladas y entender los mecanismos que generan los patrones de variación genética. Y que es esencial para comprender los procesos microevolutivos y aplicar dichos conocimientos en la gestión de recursos explotados. La diferenciación genética entre las poblaciones puede ser producto de barreras físicas o biológicas y se origina a partir de la interacción de distintos procesos evolutivos, como la mutación, selección natural, deriva genética y flujo de genes (Hellberg *et al.*, 2002, p. 277).

El flujo genético y el tamaño efectivo de la población son factores determinantes en los patrones de variabilidad genética de las poblaciones (Hellberg *et al.*, 2002, p. 278; Dudgeon *et al.*, 2012, p. 1822). Cuando el flujo genético es elevado, las poblaciones evolucionan de forma conjunta, a menos que la selección natural actúe en dirección opuesta. En cambio, cuando el flujo de genes es bajo, las poblaciones tienden a divergir por efectos de la deriva genética, lo que resulta en un aislamiento reproductivo y en la formación de linajes evolutivamente independientes (Hellberg *et al.*, 2002, p. 278).

Generalmente, en condiciones de bajo flujo genético y tamaño poblacional efectivo reducido, las poblaciones presentan altas tasas de reclutamiento local, son más cerradas y genéticamente diferenciadas. Por el contrario, con un flujo genético y tamaño efectivo altos, las poblaciones se comportan como sistemas abiertos y genéticamente homogéneos. Pudiendo existir entre estos extremos patrones intermedios de diferenciación genética, como el modelo de aislamiento por distancia, donde la variación genética entre poblaciones aumenta con la distancia geográfica que las separa (Hellberg *et al.*, 2002, p. 279-280).

2.4. Diversidad genética intra e inter poblacional

La variación genética dentro y entre poblaciones es fundamental para la adaptación y evolución de las especies en entornos cambiantes, ya que permite a las poblaciones responder a fluctuaciones ambientales, contribuyendo a su resiliencia y a la preservación de la biodiversidad, para una gestión eficaz y sostenible de los recursos acuáticos, es crucial comprender la diversidad genética y los factores que influyen en su distribución y conservación.

La diversidad genética se observa en características morfológicas, proteínas, y en las secuencias de ADN entre individuos de una población, y ha sido ampliamente documentada

en diversas especies de bivalvos explotadas comercialmente (Saavedra, 2007, p. 67). Además de esta variabilidad intra poblacional, resulta relevante analizar la diversidad genética entre poblaciones, ya que la diferenciación genética puede indicar procesos evolutivos independientes. A pesar de la alta capacidad de dispersión en el océano que es favorecida por la ausencia de barreras geográficas, grandes tamaños poblacionales, y una fase larvaria planctónica, la diferenciación genética entre poblaciones marinas tiende a ser baja (Ward, 2000, p. 11; Launey *et al.*, 2002, p. 335). Sin embargo, en ciertos casos se ha detectado una diferenciación genética significativa, tanto a escalas grandes como pequeñas, en especies como *Mytilus galloprovincialis*, *Cerastoderma edule*, y *Ensis siliqua* en la costa atlántica de la Península Ibérica (Diz y Presa, 2008, p. 284; Martínez *et al.*, 2013, p. 187; Arias *et al.*, 2011, p. 88).

La estructura genética poblacional resulta de una interacción compleja entre el ambiente y factores evolutivos como la deriva genética, la mutación, la selección natural, y la dispersión (Beaumont *et al.*, 2010, p. 50). Factores ambientales, como las corrientes marinas, la temperatura, y la salinidad, también influyen en la capacidad de dispersión y, en consecuencia, en el flujo génico, favoreciendo la diferenciación local. Además, eventos de cuello de botella poblacional, pequeños tamaños efectivos de población, y colonización por un número limitado de individuos pueden inducir cambios aleatorios en las frecuencias alélicas, llevando a la divergencia genética. La magnitud de este efecto de deriva genética está estrechamente ligada al tamaño efectivo poblacional, que idealmente representa una población con apareamiento aleatorio y sin fluctuaciones en el tamaño poblacional (Kliman *et al.*, 2008).

Adicionalmente, la selección natural y las mutaciones acumuladas a lo largo del tiempo contribuyen a la diferenciación poblacional, moldeando las poblaciones locales en unidades genéticamente distintas o stocks (Beaumont *et al.*, 2010, p. 51). Para una gestión adecuada, es esencial reconocer esta estructura genética, ya que la mezcla de poblaciones puede invalidar los resultados de estudios sobre crecimiento, supervivencia, y éxito reproductivo. Asimismo, cada stock refleja una porción de la variabilidad genética, por lo que la sobreexplotación o extinción de un stock específico implica la pérdida de diversidad genética. La conservación sostenible de estos stocks requiere una gestión diferenciada, y la evaluación genética resulta esencial para considerar los riesgos asociados a la translocación de individuos y en programas de repoblación (Ward, 2006, p. 14).

2.5. El ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (ADNmt) fue descubierto en 1963 por Margit M. K. Nass y Sylvan Nass en células de hígado de rata (Nass y Nass, 1963, p. 605). Es en general, una molécula circular pequeña que codifica para proteínas relacionadas con la respiración celular, así como tRNA y rRNA (Gissi *et al.*, 2008, p. 301) (Figura 2). Ha demostrado ser una herramienta inestimable en la ecología molecular y la filogeografía, permitiendo inferir el pasado evolutivo y demográfico de diversas especies (Ballard y Whitlock, 2004, p. 733) y es ampliamente utilizado en estudios de genética y evolución, en donde se destaca por su alta tasa de mutación y su herencia materna. Además, se utiliza para analizar la diversidad genética, el flujo de genes, el polimorfismo y reconstruir relaciones filogenéticas en bivalvos marinos (Dragomir-Cosmin y Dario, 2011, p. 4; Fernández-Pérez *et al.*, 2017, p. 134; Zhou *et al.*, 2015, p. 140).

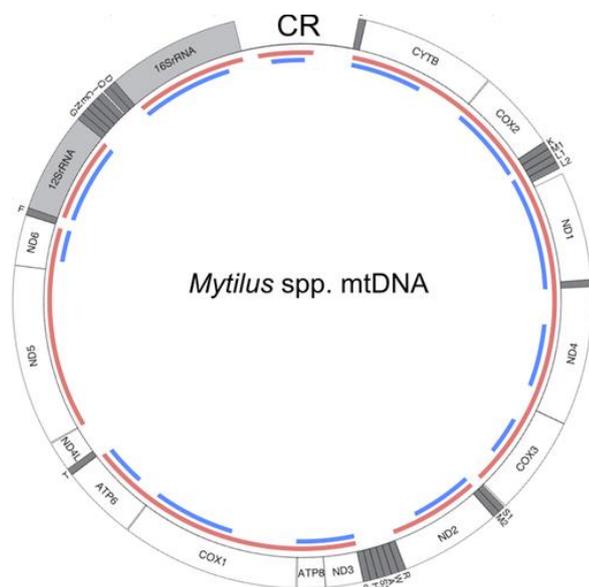


Figura 2. Genoma mitocondrial típico de *Mytilus* (Modificado de Breton *et al.*, 2011, p. 3).

2.6. Marcadores del ADN mitocondrial

En los estudios de bivalvos, se utilizan frecuentemente marcadores mitocondriales como el *16S* rDNA, *Cytb*, *12S* rDNA, *COI* y *COIII*, los que han demostrado su utilidad en la investigación de la variabilidad genética, filogenia y biogeografía en estos organismos (Dragomir-Cosmin y Dario, 2011, p. 4). Así se observó que en *Donax vittatus*, los marcadores *COI* y Citocromo b (*Cytb*) muestran altos niveles de divergencia genética (Fernández-Pérez *et al.*, 2017, p. 130). Asimismo, el uso de secuencias *COI* como marcador mitocondrial ha permitido distinguir especies crípticas de bivalvos del género *Etheria*, sin embargo, los autores recomiendan combinarlos con otros marcadores moleculares para

obtener una mayor resolución genética (Elderkin *et al.*, 2016, p. 378). Por otro lado, según el trabajo de Zhou *et al.* (2015, p. 139) el marcador *COIII* ha revelado una alta diversidad de nucleótidos y haplotipos en *Mytilus galloprovincialis*, lo que indica un nivel significativo de divergencia entre sus poblaciones.

Así también, en la superfamilia Unionoidea, se ha encontrado que las distancias entre clados utilizando el marcador *COI* sugieren la posible presencia de especies crípticas, con una divergencia del 4.7% en el código de barras de ADN (Bespalaya *et al.*, 2017, p. 2). Además, los marcadores *16S* rDNA y *COI* han sido capaces de identificar especies crípticas en *Brachidontes*, mostrando una divergencia del 10.3% y 21.9%, respectivamente (Terranova *et al.*, 2007, p. 296).

Debido a su alta tasa de evolución y transmisión materna, los marcadores mitocondriales son herramientas fundamentales en los estudios de genética de poblaciones y filogenia en bivalvos, ya que permiten investigar la diversidad genética, descubrir especies crípticas y establecer relaciones filogenéticas, lo cual contribuye a nuestro entendimiento de la evolución y la biología de estas especies.

2.7. Marcadores del ADN nuclear

Los marcadores nucleares son ampliamente utilizados en estudios de genética de poblaciones y filogenia debido a su alta variabilidad y capacidad para codificar proteínas. Se emplean con frecuencia los marcadores nucleares *18S*, *ITS* y *28S* en estudios filogenéticos y de variabilidad genética en una amplia gama de organismos, como bivalvos, plantas y mamíferos (Dragomir-Cosmin y Dario, 2011, p. 6).

Los marcadores nucleares *18S* y *28S* corresponden a regiones del ADN ribosomal (Figura 3) que se utilizan comúnmente en estudios filogenéticos debido a su alta conservación y su capacidad para resolver relaciones filogenéticas en niveles taxonómicos profundos. Por su parte, el marcador nuclear *ITS* (región interna transcrita) se encuentra entre los genes ribosomales *18S* y *28S* rDNA y resulta útil para investigar la variabilidad genética y la filogenia en bivalvos (Vierna *et al.*, 2010, p. 33).

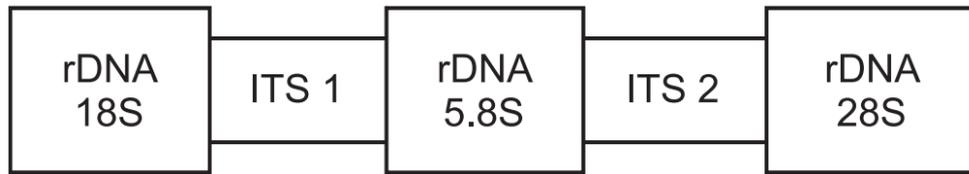


Figura 3. Diagrama esquemático del grupo génico de rDNA. Los genes que codifican las subunidades de ARN ribosómico 18S, 5.8S y 28S están separados por las secuencias transcritas internas 1 (ITS1) y 2 (ITS2) que se eliminan después de la transcripción (Modificado de Brasileiro *et al.*, 2004, p. 206).

En relación con la estructura genética de poblaciones, se ha observado que los marcadores nucleares pueden mostrar patrones de heterogeneidad u homogeneidad genética entre poblaciones de *Mytilus chilensis* (Larraín *et al.*, 2015, p. 1004). Además, se ha encontrado que el uso de marcadores nucleares como *ITS1* e *ITS2* son útiles para distinguir diferentes estructuras poblacionales en especies del género *Ensis* (Vierna *et al.*, 2010, p. 33).

Por otro lado, los estudios realizados en especies de bivalvos con marcadores nucleares han permitido clarificar las relaciones filogenéticas y la historia evolutiva de este grupo de moluscos. En un estudio sobre la filogenia del orden Arcida, se analizaron tres marcadores moleculares: dos genes ribosomales nucleares *18S* y *28S* rDNA, y un gen nuclear *H3* que codifica para la histona H3. Los resultados permitieron establecer relaciones filogenéticas más precisas entre las especies de bivalvos analizadas y proporcionaron información sobre la evolución de este grupo de moluscos (Combosch y Giribet, 2015, p. 13). Asimismo, un estudio utilizó el gen *18S* rDNA para investigar la filogenia de varios géneros de bivalvos, incluyendo *Mytilus*, *Arca*, *Atrina* y *Crassostrea* (Steiner y Muller, 1996, p. 68). Así también, utilizando el gen *ITS* se ha estudiado la filogenia de especies como *Ensis directus* (Vierna *et al.*, 2010, p. 33), *Meretrix Meretrix*, *Cyclina sinensis*, *Mercenaria mercenaria* y *Protothaca jodoensis* (Cheng *et al.*, 2006, p. 708), encontrándose que secuencia del gen *ITS* son útiles para diferenciar entre especies de la familia Veneridae y del género *Ensis*. Por otro lado, también se ha estudiado la filogenia de especies de la familia Unionidae utilizando los genes *ITS1-2* y *5.8S* (Kallersjo *et al.*, 2005, p. 419) y se encontró una estrecha relación en especies del género *Unio*. Por lo tanto, estos estudios demuestran que estos marcadores nucleares son adecuados para estudios de variabilidad genética y filogenia en moluscos bivalvos.

2.8. Marcadores mitocondriales y nucleares en estudios poblacionales

En estudios moleculares de bivalvos, el uso combinado de marcadores mitocondriales y nucleares ha demostrado ser ventajoso en varios aspectos. Por un lado, el uso de múltiples marcadores, tanto mitocondriales como nucleares, es útil en estudios filogenéticos, de estructura genética de poblaciones y en la identificación de especies comerciales, y puede

proporcionar una imagen más completa de la variabilidad genética en una población o especie (Dragomir-Cosmin y Dario, 2011, p. 4).

La divergencia observada entre el ADNmt y los genes nucleares puede ser resultado de barreras geográficas de larga duración, lo que respalda la hipótesis de la influencia de estas barreras en las distribuciones alopátricas de linajes (Liu *et al.*, 2011, p. 4341). Por ejemplo, en el caso de *Meretrix petechialis*, la combinación del marcador nuclear *ITS* y el marcador mitocondrial *COI* ha revelado variaciones genéticas significativas, con valores del 93.22% y 84.2% respectivamente, lo cual ha sido útil para el análisis de la estructura de la población y su expansión (Wang *et al.*, 2017, p. 6).

En este sentido, la combinación de marcadores mitocondriales y nucleares ha sido especialmente útil en estudios filogenéticos de bivalvos. Por ejemplo, se ha encontrado que la combinación de *COI*, *18S* y *28S* rDNA es más efectiva que el uso de un solo gen (Giribet y Wheeler, 2002, p. 292). Además, las secuencias de ADN nucleares son útiles para analizar variaciones genéticas a diferentes niveles taxonómicos en Mytilidae, así como en estudios filogenéticos de géneros y familias (Garland y Zimmer, 2002, p. 303; Liu *et al.*, 2017, p. 223).

En la identificación de especies de bivalvos, en los géneros *Aulacomya*, *Mytilus* y *Perna*, se ha empleado marcadores nucleares como *ITS-1* y *18S* rDNA, logrando identificar especies como *Mytilus* spp., *M. californianus*, *Perna* spp. y *A. atra* (Santaclara *et al.*, 2006, p. 8464). El trabajo de Rodríguez (2021, p. 77) con *COI* da como resultado una posible presencia de dos linajes, lo que requiere análisis genéticos y morfológicos más exhaustivos para revelar posibles especies crípticas o con DUI (Lemer *et al.*, 2014, p. 17; Wang *et al.*, 2017, p. 14).

En la evaluación de la diversidad genética y filogenética, así como en la identificación de nuevas especies de moluscos bivalvos, se utilizan tanto las secuencias nucleares como las secuencias de ADNmt (Vierna *et al.*, 2012, p. 2210; Fernández-Pérez *et al.*, 2017, p. 128). Los marcadores nucleares como *18S* rDNA, *28S* rDNA, *Me 15/16*, *H3*, *EF-bis* e *ITS* junto a marcadores mitocondriales como *COIII*, *COI*, *Cytb* y *16S* son comúnmente empleados en la determinación de la diversidad genética en bivalvos marinos (Kijewski *et al.*, 2011, p. 225; Larraín *et al.*, 2012, p. 1079; Fernández-Pérez *et al.*, 2017, p. 128).

En cuanto a la identificación de especies comerciales, se ha utilizado la combinación de marcadores mitocondriales y nucleares en bivalvos con éxito (Garland y Zimmer, 2002, p. 303). Por ejemplo, en la familia Pinnidae, donde la identificación morfológica puede ser compleja debido a la plasticidad fenotípica y la estasis morfológica, las secuencias mitocondriales (*16S* rRNA) y nucleares (*18S* y *28S* rDNA) han revelado especies crípticas

en *Pinna muricata*, *Atrina assimilis*, *Atrina exusta*, *Pinna saccata* y *Atrina rigida* (Lemer *et al.*, 2014, p. 19).

En resumen, la combinación de marcadores mitocondriales y nucleares en estudios moleculares de bivalvos proporciona una visión más completa de la variabilidad genética, lo cual es útil en estudios filogenéticos, de estructura genética de poblaciones y en la identificación de especies. Los marcadores nucleares son particularmente útiles para analizar variaciones genéticas a diferentes niveles taxonómicos y para estudios filogenéticos, mientras que los marcadores mitocondriales son útiles para identificar especies crípticas o DUI y evaluar la diversidad genética.

2.9. Doble Herencia Uniparental en bivalvos

La DUI es un fenómeno de herencia mitocondrial que implica la contribución de ambos progenitores, tanto la madre como el padre, en la transmisión de su propio conjunto de mitocondrias a la descendencia. Aunque el mtDNA se transmite principalmente de forma uniparental, se han encontrado excepciones en las que se produce una transmisión doble uniparental (Zouros *et al.*, 1992, p. 414).

En bivalvos con DUI, están presentes dos genomas mitocondriales distintos con un patrón de distribución tisular, donde el mitotipo F se encuentra en el tejido gonadal de las hembras y tejidos somáticos de ambos sexos, y el mitotipo M solo en el tejido gonadal de machos (Passamonti y Ghiselli, 2009, p. 80). Sin embargo, se ha detectado la aparición del mitotipo M en los tejidos somáticos (pie, branquias y manto) de machos (Dégletagne *et al.*, 2021, p. 4). Por lo tanto, las hembras son homoplásmicas (solo mitotipo F) y los machos son heteroplásmicos (mitotipo F y M) (Figura 4) (Breton *et al.*, 2007, p. 466).

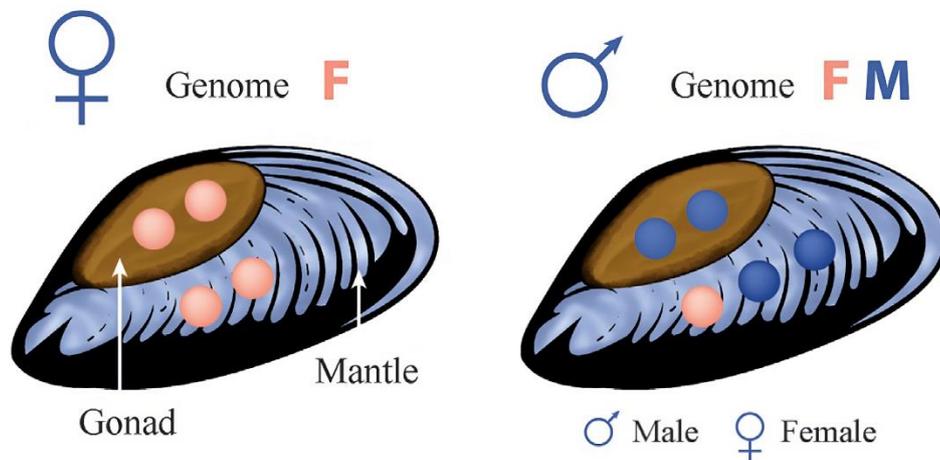


Figura 4. Distribución tisular de los mitotipos M (azul) y F (rosado) en moluscos bivalvos con DUI (Vargas *et al.*, 2015, p. 176).

Los mitotipos del ADNmt (F y M) muestran un alto nivel de divergencia, entre el 6 al 51%, reportándose la mayor divergencia en unionidos (Breton *et al.*, 2007, p. 470, Zouros, 2013, p. 5). La gran divergencia entre los mitotipos F y M podrían no permitir que los mismos cebadores amplifiquen ambos mitotipos, debido a que los cebadores pueden no ser similares al sitio de cebado en el mitotipo M como para permitir la amplificación (Passamonti y Ghiselli, 2009, p. 82). Además, el mitotipo F puede interferir la amplificación del mitotipo M en muestras de gónadas masculinas contaminadas con células somáticas (Zouros, 2013, p. 8). En consecuencia, los resultados negativos de PCR podrían reflejar la falta de cebado y amplificación del mitotipo M debido a su alta divergencia (Breton *et al.*, 2007, p. 466). La DUI ha despertado interés en la comunidad científica debido a su rareza y al potencial que ofrece para comprender la evolución de los genomas mitocondriales y la diversidad genética en poblaciones (Gissi *et al.*, 2008, p. 314). La presencia de dos secuencias distintas mitocondriales en mitílidos indica la existencia de dos posibles explicaciones: la existencia de dos especies crípticas o la presencia de DUI (Dos Santos *et al.*, 2012, p. 183; Zouros, 2013, p. 16).

Para hallar la presencia de DUI en moluscos bivalvos, se han venido desarrollando investigaciones en especies pertenecientes a la superclase Autolamellibranchia, y se han detectado más de 40 especies con DUI (Theologidis *et al.*, 2008, p. 962; Zouros, 2013, p. 8). Dentro de esta superclase, tanto las subdivisiones Pteriomorphia como Heteroconchia están representadas en esta colección de especies (Giribet y Wheeler, 2002, p. 272). Por otro lado, se han realizado varios estudios para detectar la presencia de DUI en la familia Mytilidae. Uno de los primeros trabajos en este campo fue realizado por Zouros *et al.* (1994, p. 7465) quienes descubrieron la presencia de DUI en la especie *Mytilus edulis* y *Mytilus tossulus*. Posteriormente, se han llevado a cabo estudios en otras especies de mitílidos, como *Mytilus galloprovincialis* (Breton *et al.*, 2007, p. 470), *Brachidontes exustus* (Lee y Foighil, 2004, p. 3539), *Geukensia demissa* (Hoeh *et al.*, 1996, p. 2282), *Mytella charuana* (Dos Santos *et al.*, 2012, p. 183) y *Perumytilus purpuratus* (Vargas *et al.*, 2015, p. 177), en los que también se ha confirmado la presencia de DUI. Además, se ha identificado la presencia de dos linajes mitocondriales distintos en las familias Veneridae y Mytilidae, uno transmitido por la madre y otro por el padre, lo que proporciona evidencia adicional de la DUI en estas familias de moluscos (Breton *et al.*, 2007, p. 468).

En estudios más recientes, se ha utilizado la secuenciación de genomas mitocondriales completos para investigar la DUI en los mitílidos (Breton *et al.*, 2007, p. 468). Por ejemplo, Breton *et al.* (2011, p. 1652) identificaron nuevos genes proteicos en el ADN mitocondrial

de varias especies de la familia Unionidae y Margaritiferidae, incluyendo un sistema de determinación sexual en las especies de agua dulce. Asimismo, Kyriakou *et al.* (2015, p. 11) utilizaron técnicas de secuenciación de nueva generación para analizar el transcriptoma de la especie *Mytilus galloprovincialis* y descubrieron la presencia de varios genes mitocondriales codificados por el ADN mitocondrial masculino (M ADNmt) que se expresan en la línea germinal femenina. Estos genes están involucrados en la regulación de la expresión génica y en la replicación del ADN mitocondrial, lo que sugiere que la DUI en mitílidos está regulada por una compleja red de interacciones moleculares.

Se ha demostrado que la DUI en mitílidos está asociada con la masculinización de la línea germinal femenina, lo que permite la transmisión del ADN mitocondrial masculino a través de la descendencia masculina (Stewart *et al.*, 2009, p. 165). Por otro lado, Cao *et al.* (2004, p. 892) demostraron que los espermatozoides de *M. edulis* contienen mitocondrias que se segregan de manera diferencial en los embriones, lo que confirma que la DUI ocurre en esta especie.

Además, se ha demostrado que la DUI ofrece un experimento natural para el estudio de la dinámica, evolución y mantenimiento de la herencia uniparental de los genomas citoplásmicos. También se ha utilizado la DUI como herramienta para estudiar cómo la heteroplasmia afecta a la célula, su estabilidad y cómo se descompone en homoplasmia (Breton *et al.*, 2011, p. 1656)

Es importante tener en cuenta que la presencia de DUI en mitílidos plantea desafíos en los estudios de diversidad genética, ya que las secuencias de ADNmt por sí solas no son suficientes para comprender completamente la variabilidad genética en estas especies (Liu *et al.*, 2017, p. 223). Por lo tanto, es necesario utilizar enfoques moleculares más complejos y combinar diferentes marcadores para obtener una visión más completa de la diversidad genética en mitílidos.

En conclusión, la DUI en mitílidos es un fenómeno interesante que desafía la idea tradicional de la transmisión uniparental del ADNmt, ofreciendo una perspectiva única sobre la evolución de los genomas mitocondriales y la diversidad genética en estas poblaciones. Sin embargo, para comprender completamente este fenómeno y su impacto en la diversidad genética, se requiere el uso de múltiples marcadores moleculares y enfoques complementarios.

2.10. Estudios poblacionales en *Aulacomya atra*

Mena *et al.* (2001, p. 74) realizaron un estudio sobre la variabilidad genética de *Aulacomya atra*, en el sur de Chile, utilizando la técnica de electroforesis en gel de almidón, encontraron polimorfismos en seis loci y una deficiencia significativa de heterocigotos en todas las localidades. A pesar de esto, se observó una alta similitud genética entre las poblaciones, lo que sugiere un alto flujo génico. Estos resultados indican que *A. atra* en el sur de Chile debe considerarse como una unidad en futuros planes de manejo.

En contraste, se han llevado a cabo estudios sobre la estructura genética de las poblaciones de *A. atra* a lo largo de la costa sur de Sudáfrica. Utilizando la región *COI* del ADN mitocondrial y el gen nuclear *ITS1* como marcadores genéticos, se analizó la diversidad genética y la estructura poblacional. Los resultados revelaron una estructura filogeográfica limitada a lo largo de la costa sur de Sudáfrica, con haplotipos de las tres regiones entremezclados en el árbol filogenético y las redes de haplotipos, lo que sugiere que la estructura geográfica de *A. atra* puede ser influenciada por factores como la dispersión larval, el aislamiento geográfico, las barreras o facilitadores del flujo génico, y la selección. Además, al comparar las poblaciones de Sudáfrica con otras regiones del hemisferio sur, se observó que las poblaciones de Sudáfrica son genéticamente diversas en comparación con las poblaciones de otras regiones (Grobler *et al.*, 2023, p. 36).

Sin embargo, es importante destacar que existe una falta de estudios genéticos en *A. atra* en otras áreas geográficas. La comprensión de la estructura genética y la diversidad de esta especie en diferentes regiones es crucial para una gestión adecuada y la conservación de *A. atra* como especie.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Evaluar la estructura poblacional y presencia de Doble Herencia Uniparental en *Aulacomya atra* (Molina, 1782) “choro” en el litoral peruano, inferidas mediante el ADN mitocondrial y nuclear.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la identidad molecular y la diferenciación genética de *A. atra* mediante el análisis de los genes nucleares *18S* e *ITS-28S*.
- Detectar la presencia de Doble Herencia Uniparental (DUI) en *A. atra* mediante la secuenciación de los genes mitocondriales *16S* y *COI* a partir de tejido gonadal.
- Evaluar la existencia de heteroplasmia mitocondrial en tejidos somáticos de *A. atra* mediante la secuenciación de los genes *16S* y *COI*.
- Analizar la diversidad genética y la estructura poblacional de *A. atra* en el litoral peruano utilizando marcadores moleculares mitocondriales y nucleares.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Fuente de los ácidos nucleicos (ADN)

4.1.1. Material de estudio

Las muestras de *A. atra* fueron recolectadas en 6 bancos naturales del litoral peruano (Marcona, Punta El Faro, El Túnel, El Ancla, Bufadero y Morro Sama) ubicados desde el departamento de Ica hasta Tacna (Tabla 1, Figura 5). Se recolectaron 20 individuos por banco natural (120 individuos), lo que se encuentra dentro del rango recomendado para estudios genético poblacionales (Pruett y Winker, 2008, p. 255).

La recolecta de los individuos fue de manera manual mediante buceo de la zona meso e infralitoral rocosa, hasta los 30 m de profundidad, respetando la talla media de captura (>65 mm de longitud valvar; Tejada y Baldarrago, 2016, p. 47). Posteriormente, fueron almacenados en bolsas de plástico de 2 L dentro de un cooler con hielo y transportados al Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción de Organismos Acuáticos de la Universidad Nacional del Santa.

En el laboratorio, se diseccionó tejido del músculo aductor y gónada de cada individuo, y se conservaron en etanol al 96% en tubos Eppendorf de 1.5 mL a -20 °C. Asimismo, el reconocimiento de la especie se realizó de acuerdo a caracteres morfológicos mediante la clave taxonómica de IMARPE (2015, p. 15), así como la determinación del género mediante un examen macroscópico del tejido gonadal (Incio, 2018, p. 30; Oyarzún *et al.*, 2020, p. 5). Finalmente, los organismos fueron codificados y registrados en una base de datos, considerando lo siguiente: código del individuo, nombre científico, sexo, tejido, fecha, localidad y coordenadas geográficas del banco natural.

Tabla 1. Ubicación geográfica de los bancos naturales de *A. atra*.

Departamento	Banco natural	Código	Coordenadas
Ica	Marcona	MA	15°23'36.6"S 75°9'40.2"W
Arequipa	Punta El Faro	PF	16°14'21.1"S 73°42'8.5"W
	El Túnel	TN	16°26'9.5"S 73°9'1.0"W
	El Ancla	AN	16°49'42.9"S 72°18'2.7"W
Moquegua	Bufadero	BU	17°22'14.1"S 71°25'44.3"W
Tacna	Morro Sama	MS	18°00'2.0"S 70°53'36.0"W

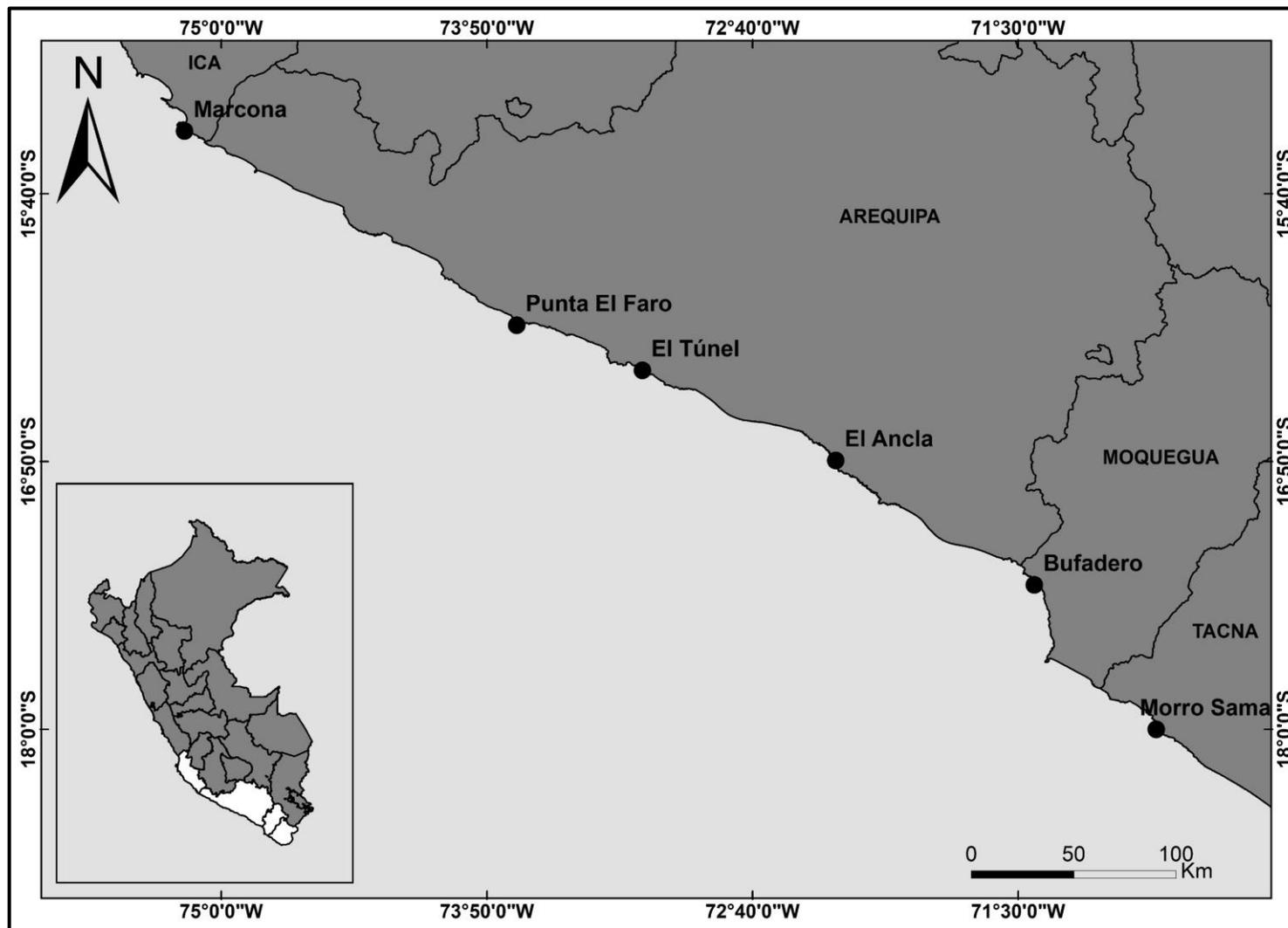


Figura 5. Ubicación geográfica de los bancos naturales de *A. atra*.

4.1.2. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico total se extrajo de fragmentos de aproximadamente 3 mm³ de tejido de músculo aductor y gónada mediante el método de CTAB-Fenol-Cloroformo (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% (w/v) CTAB) y 10 µL de Proteínasa K (Taggart *et al.*, 1992, modificado por el Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción).

4.1.3. Calidad e integridad del ADN

La calidad e integridad del ADN extraído fue evaluado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (BioRad, Molecular Biology Agarosa) en una cámara electroforética Clever Scientific MultiSUB Choice ST de 18 cm, conectada a una fuente de poder Cleaver Scientific omniPAC Midi CS-300V, con buffer de corrida TAE 0.5X (Tris-HCL, Acetato, EDTA). La corrida electroforética se llevó a cabo aplicando a 90 V de voltaje y 100 A de corriente durante 45 min.

Asimismo, se empleó GelRed Nucleic Acid Gel Stain y 6X Loading Dye (*ThermoFisher Scientific*) como buffer de carga de la corrida. Sumado a ello, se utilizó un marcador de peso molecular de 10000 pb (MassRuler ADN Ladder low range de *Thermo Scientific*). La visualización de los geles se llevó a cabo bajo luz UV, utilizando para ello un fotodocumentador Uvidoc HD6 (Uvitec Cambridge), donde bandas definidas y de alto peso molecular al inicio del gel fueron consideradas como válidas. Al detectar presencia de ARN al final del gel, las muestras se incubaron con 1 µL de RNAsa en un baño seco a 37 °C toda la noche.

4.1.4. Cuantificación del ADN

La cantidad y pureza del ADN se estimó mediante los ratios de absorbancia 260/280 nm en un cuantificador Epoch (*Biotek*), donde valores entre 1.8 y 2.0 fueron aceptados para la posterior realización técnicas como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Gallagher, 2017, p. 3). Finalmente, se prepararon alícuotas mediante dilución con agua de calidad molecular, alcanzando una concentración final de 50 ng/µL, seguido de su almacenamiento a -20 °C.

4.1.5. Amplificación de los genes mitocondriales y nucleares

La amplificación por PCR de regiones parciales de los genes mitocondriales (*COI* y *16S*) y nucleares (*18S*, *ITS* y *28S*) se realizaron usando los *primers* listados en la Tabla 2.

Tabla 2. Descripción de *primers* mitocondriales (*COI*, *16S*) y nucleares (*18S*, *28S*, *ITS*).

Región	<i>Primers</i>		Secuencias (5'-3')	(°C)	pb	Referencia
<i>COI</i>	LCO-1490	F	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	55	700	Folmer <i>et al.</i> (1994)
	HCO-2198	R	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA			
<i>16S</i>	16Sar-5	F	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	56	530	Palumbi (1996)
	16Sbr-3	R	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT			
<i>ITS-28S</i>	ITS5	F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	50	900	Wood <i>et al.</i> (2007)
	ITS28	R	CGCCGTTACTAGGGGAATCCTTGTAAG			
<i>18S</i>	Myt18S	F	CAACCTGGTTGATCCTGCCAGT	56	919-924	Santaclara <i>et al.</i> (2006)
		R	CACCTCTAACACCGTAATACGA			

4.2. Caracterización de la identidad molecular y diferenciación genética de *A. atra* mediante el análisis de los genes nucleares *18S* e *ITS-28S*

A partir de la problemática planteada por Rodríguez (2021), quien sugirió la posible existencia de dos especies crípticas dentro de *A. atra* o la presencia de Doble Herencia Uniparental (DUI), se llevó a cabo el análisis de los genes nucleares *18S* e *ITS-28S* para evaluar la diferenciación genética de esta especie en el litoral peruano.

A raíz de lo expuesto anteriormente, se procedió a la amplificación de 8 individuos procedentes de dos bancos naturales (Ica y Tacna, con cuatro individuos por localidad). Se empleó ADN genómico extraído del músculo aductor para determinar las distancias genéticas entre las secuencias obtenidas y llevar a cabo análisis filogenéticos detallados, con el objetivo de caracterizar la identidad molecular de la especie.

4.2.1. Amplificación de los genes nucleares *18S* e *ITS-28S* por PCR

a) Amplificación del gen *18S*

Para el gen nuclear *18S*, se emplearon los *primers* Myt18S (Tabla 2). La reacción de PCR fue preparada con 6.75 µL de agua PCR, 1.20 µL de buffer *Taq* (10X), 0.96 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.57 µL de dNTPs (2.5 mM), 0.18 µL de cada primer (10 µM), 0.15 µL de *Taq* polimerasa (5 U/µL) y 2.00 µL de ADN (50 ng/µL), alcanzando un volumen total de 12 µL.

El programa de PCR utilizado incluyó un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 56°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. El protocolo finalizó con un

paso de extensión a 72°C durante 5 minutos.

b) Amplificación del gen *ITS-28S*

La amplificación de los genes *ITS* y *28S* se realizó utilizando los *primers* ITS5 e ITS28 (Tabla 2). La mezcla de PCR incluyó 8.23 µL de agua PCR, 1.20 µL de buffer *Taq* (10X), 0.48 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.57 µL de dNTPs (2.5 mM), 0.18 µL de cada primer (10 µM), 0.15 µL de *Taq* polimerasa (5 U/µL) y 1.00 µL de ADN (50 ng/µL), alcanzando un volumen total de 12 µL.

El programa de PCR inició con un paso de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 50°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 2 minutos. Finalmente, se realizó un paso de extensión a 72°C durante 10 minutos. Por último, los productos de PCR se almacenaron a -20 °C para preservar su integridad y prevenir la degradación.

4.3. Detección de Doble Herencia Uniparental (DUI) en *A. atra* a través del análisis de los genes mitocondriales *16S* y *COI* en tejido gonadal

4.3.1. Selección de individuos y determinación del sexo

Para determinar la presencia de Doble Herencia Uniparental (DUI) en *A. atra*, se evaluaron un total de 40 individuos adultos, seleccionados de manera equitativa en dos localidades (Tabla 1, Figura 5). Se incluyeron 20 organismos provenientes de Marcona, Ica (10 machos y 10 hembras) y 20 de Morro Sama, Tacna (10 machos y 10 hembras). El ADN genómico del tejido gonadal fue utilizado para identificar los mitotipos (M y F) y se amplificaron los genes mitocondriales *COI* y *16S* (Tabla 2).

4.3.2. Amplificación de genes mitocondriales *COI* y *16S* por PCR

a) Amplificación del gen *COI*

El gen mitocondrial *COI* fue amplificado utilizando los *primers* LCO-1490 y HCO-2198 (Tabla 2). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 12 µL, siguiendo las condiciones estandarizadas para este gen. Se utilizó 4.81 µL de agua PCR, 1.14 µL de buffer *Taq* (10X), 1.10 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.57 µL de dNTPs (2.5 mM), 2.40 µL de TBT-par (5X), 0.15 µL de cada primer (10 µM), 0.15 µL de *Taq* polimerasa (5 U/µL) y 1.50 µL de ADN (50 ng/µL).

El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 40 segundos, alineamiento a 55°C por 40 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto con 10 segundos. Finalmente, se realizó una extensión final a 72°C por 7 minutos.

b) Amplificación del gen *16S*

El gen mitocondrial *16S* fue amplificado utilizando los *primers 16Sar-5* y *16Sbr-3* (Tabla 2). La mezcla de PCR para este gen incluyó 8.09 µL de agua PCR, 1.20 µL de buffer *Taq* (10X), 0.62 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.57 µL de dNTPs (2.5 mM), 0.18 µL de cada primer (10 µM), 0.15 µL de *Taq* polimerasa (5 U/µL) y 1.00 µL de ADN (50 ng/µL), alcanzando un volumen total de 12 µL.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 9 minutos, seguido de 25 ciclos con desnaturalización a 93°C por 30 segundos, alineamiento a 56°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, finalizando con un paso de extensión a 72°C durante 10 minutos.

4.4. Evaluación de la heteroplasmia en *A. atra* mediante la secuenciación de los genes mitocondriales *16S* y *COI* en tejido somático

Para evaluar la presencia de heteroplasmia mitocondrial en *A. atra*, se analizaron 40 individuos adultos, seleccionados equitativamente de dos localidades. Se incluyeron 20 organismos de Marcona, Ica (10 machos y 10 hembras) y 20 de Morro Sama, Tacna (10 machos y 10 hembras). A diferencia del análisis de DUI, donde se utilizó tejido gonadal, en esta etapa del estudio se extrajo ADN genómico a partir de tejido del músculo aductor, con el propósito de detectar la coexistencia de los mitotipos M y F en tejidos somáticos. Se amplificaron los marcadores mitocondriales *16S* y *COI* mediante PCR empleando los protocolos anteriormente descritos.

4.5. Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de *A. atra* con base en marcadores mitocondriales y nucleares

Para analizar la diversidad genética y la estructura poblacional de *A. atra*, se examinaron 120 individuos distribuidos equitativamente en seis localidades a lo largo del litoral peruano (Tabla 1, Figura 5). En cada sitio de muestreo, se seleccionaron 20 organismos (10 machos y 10 hembras), lo que permitió una evaluación diferenciada de los mitotipos F y M debido a

la presencia de DUI. Dado este fenómeno, se empleó ADN genómico extraído de tejido gonadal.

Los análisis preliminares con los marcadores nucleares *18S* e *ITS-28S* no evidenciaron variabilidad entre los individuos secuenciados (Marcona y Morro Sama), por lo que se decidió excluir estos genes del estudio poblacional. En su lugar, se utilizaron los genes mitocondriales *16S* y *COI*, que fueron amplificados mediante PCR empleando cebadores específicos y los protocolos anteriormente descritos (Tabla 2).

4.6. Purificación y secuenciación Sanger de los fragmentos amplificados

Con el fin de confirmar la eficacia de la amplificación de los fragmentos, se llevó a cabo una electroforesis del producto PCR utilizando un marcador de peso molecular de 1500 pb (MassRuler ADN Ladder low range de *Thermo Scientific*). La identificación de una única banda, en concordancia con el tamaño esperado del fragmento según la Tabla 2, fue considerada como criterio de éxito y permitió avanzar con la secuenciación Sanger del fragmento (Wittmeier y Hummel, 2022, p. 157).

4.6.1. Purificación de los productos PCR

La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo mediante el uso de Fosfatasa Alcalina termosensible FastAP (1 U/ μ L) de *Thermo Scientific*. Se procesaron 5 μ L del producto de PCR junto con 0.5 μ L de Exonucleasa I (Exo I) y 1 μ L de FastAP (SAP). La incubación se realizó a 37 °C durante 15 minutos, seguida de una etapa a 85 °C durante 15 minutos en un termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler. Este procedimiento garantizó la eliminación de *primers*, nucleótidos y otros componentes no incorporados durante la PCR, preparando así las muestras para su posterior secuenciación.

4.6.2. Secuenciación Sanger de los fragmentos amplificados

La secuenciación de los fragmentos amplificados se realizó en un Genetic Analyzer 3500 (*Applied Biosystems*) en el Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción de la Universidad Nacional del Santa. Las reacciones se llevaron a cabo empleando el kit *BigDye Terminator v3.1* (*Thermo Fisher Scientific*). Cada reacción incluyó un volumen final de 20 μ L, compuesto por 1.00 μ L de *BigDye Terminator v3.1*, 3.50 μ L de buffer 5X, 2.00 μ L de primer (10 μ M), 2.00 μ L del producto PCR (300 ng/ μ L), y 11.50 μ L de agua PCR.

La amplificación mediante ciclos de secuenciación incluyó un ciclo inicial a 96 °C durante

1 minuto, seguido de 15 ciclos de desnaturalización a 96 °C por 10 segundos, alineamiento a 50 °C por 5 segundos y extensión a 60 °C por 1 minuto y 15 segundos. Posteriormente, se realizaron 5 ciclos adicionales con extensión prolongada a 60 °C durante 1 minuto y 45 segundos, y finalmente 5 ciclos más con extensión extendida a 60 °C por 2 minutos y 45 segundos. La reacción concluyó en una etapa de mantenimiento a temperatura ambiente.

La purificación de los productos de secuenciación se efectuó mediante un protocolo estandarizado que involucró la adición de 2.5 µL de EDTA (125 mM, pH 8) y 60 µL de etanol absoluto (-20 °C). Las mezclas fueron agitadas a 1800 RPM por 5 minutos y centrifugadas a 2200 RCF a 4 °C por 15 minutos, seguidas de un centrifugado final a 12800 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante fue cuidadosamente removido, asegurando no perturbar el sedimento de ADN, el cual podía ser imperceptible. Posteriormente, se secaron las reacciones y se añadieron 10 µL de formamida, las cuales fueron agitadas a 2000 RPM durante 2 minutos y sometidas a una denaturación a 95 °C durante 5 minutos.

Los resultados obtenidos de cada reacción fueron archivos en formato *.ab1*, correspondientes a las secuencias forward y reverse de cada muestra, los cuales permitieron el análisis bioinformático subsecuente.

4.7. Técnicas de procesamiento de datos

Las secuencias fueron editadas mediante el software *Geneious Prime*, que posibilitó el ensamblaje de las secuencias forward y reverse de cada muestra. Posteriormente, se realizó una edición manual para excluir regiones de baja calidad y los cebadores, con el fin de obtener una secuencia consenso definitiva. Estas secuencias consenso fueron posteriormente exportadas en formato *fasta* (*.fasta*).

Las secuencias consenso resultantes se sometieron a análisis mediante la herramienta BLAST del NCBI para validar su asignación a los genes mitocondriales (COI) y los genes nucleares (18S, ITS-28S) de *A. atra*. Esta validación se llevó a cabo debido a la presencia de secuencias de referencia debidamente anotadas en el GenBank, a diferencia del gen 16S.

La creación de la matriz integral de secuencias para cada fragmento de los genes mitocondriales y nucleares se efectuó mediante un alineamiento múltiple empleando el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994, p. 4673-4680), implementado en el programa

Mega v.10 (Kumar *et al.*, 2016, p.1870-1874). Todas las secuencias fueron sometidas a edición manual con el propósito de eliminar regiones mal alineadas y divergentes.

4.7.1. Caracterización de la identidad molecular y diferenciación genética de *A. atra* mediante el análisis de los genes nucleares *18S* e *ITS-28S*

Con el objetivo de confirmar la identidad molecular y evaluar la posible diferenciación genética de *A. atra* en la zona sur del litoral peruano, se examinaron las secuencias de los genes nucleares *18S* e *ITS-28S*. En el análisis del gen *18S* se incluyeron secuencias de referencia de *A. atra* provenientes de Chile (ver Anexos 3), y se utilizó *Perumytilus purpuratus* como grupo externo (outgroup).

Para establecer las relaciones filogenéticas, se elaboró un árbol utilizando el método Neighbor-Joining (NJ) con 10 000 réplicas de bootstrap, y se calcularon las distancias genéticas aplicando el modelo de sustitución Jukes-Cantor (JC). El análisis incluyó todas las posiciones codificantes (primeras, segundas y terceras bases) así como las no codificantes, y se excluyeron las posiciones ambiguas mediante la técnica de eliminación por pares (*pairwise deletion*). El alineamiento final comprendió 779 sitios nucleotídicos pertenecientes a un total de 11 secuencias. Los resultados se visualizaron mediante un árbol filogenético a escala y una tabla de distancias genéticas, expresadas como el número promedio de sustituciones por sitio, utilizando el software MEGA v.10 (Kumar *et al.*, 2016, pp. 1870-1874).

Adicionalmente, se realizó el análisis del gen *ITS-28S* como una medida complementaria para confirmar la identidad molecular de los ejemplares peruanos. El árbol filogenético correspondiente se generó también mediante el método NJ, esta vez empleando el modelo evolutivo de Kimura de dos parámetros (K2P), que distingue entre transiciones y transversiones. El conjunto de datos incluyó 378 sitios alineados, y el árbol se representó a escala, con las longitudes de rama reflejando las distancias evolutivas.

La raíz del árbol se estableció utilizando *Brachidontes modiolus* como grupo externo, lo que permitió definir la orientación evolutiva de los clados. Además de las secuencias peruanas, se incorporaron secuencias de GenBank correspondientes a ejemplares de Sudáfrica y Nueva Zelanda (ver Anexos 3). Las posiciones ambiguas fueron nuevamente eliminadas por el método de eliminación por pares. Al igual que con el gen *18S*, los resultados se plasmaron en un árbol filogenético y en una tabla de distancias genéticas según el modelo K2P, expresadas como el promedio de sustituciones por sitio.

4.7.2. Detección de Doble Herencia Uniparental (DUI) en *A. atra* a través del análisis de los genes mitocondriales *16S* y *COI* en tejido gonadal

Las secuencias mitocondriales de los genes *COI* y *16S* fueron obtenidas a partir de tejidos gonadales de 120 ejemplares de *Aulacomya atra*, con el objetivo de identificar y comparar los mitotipos M y F. Para cada marcador genético se realizó un análisis filogenético independiente, permitiendo contrastar la estructura de los clados asociados a cada mitotipo.

Previamente, se seleccionó el modelo evolutivo más adecuado para cada gen aplicando el criterio de información bayesiano (BIC) en el software jModelTest (Posada, 2008), siendo el modelo Hasegawa-Kishino-Yang (HKY) con distribución gamma (G) el que presentó el mejor ajuste. Posteriormente, se implementó un enfoque de inferencia bayesiana mediante el programa BEAST v1.10.4 (Drummond & Rambaut, 2007), utilizando un reloj molecular estricto y el modelo HKY+I. Como prior del árbol filogenético se consideró un modelo de coalescencia con tamaño poblacional constante.

Cada análisis fue ejecutado durante 10 millones de generaciones en una cadena de Markov, con muestreo de parámetros cada 1000 generaciones. Los árboles resultantes, correspondientes a los genes *16S* y *COI*, fueron visualizados y editados en el software FigTree v1.4.4, permitiendo identificar claramente la presencia de dos clados principales representativos de los mitotipos F (femenino) y M (masculino).

Además, se estimaron las distancias genéticas promedio entre los grupos F y M para cada gen. En el caso del gen *16S*, el análisis se realizó en MEGA11 (Tamura et al., 2021) bajo el modelo Tamura 3-parameter con una distribución gamma (forma = 1), considerando 382 posiciones alineadas. Para el gen *COI*, las distancias se calcularon mediante el modelo Tajima-Nei, con un total de 490 posiciones. En ambos casos, se consideraron todas las posiciones del codón (1.^a, 2.^a, 3.^a) y las regiones no codificantes, eliminando posiciones ambiguas mediante el método de eliminación por pares (*pairwise deletion*).

4.7.3. Evaluación de la heteroplasma en *A. atra* mediante la secuenciación de los genes mitocondriales *16S* y *COI* en tejido somático

Con el objetivo de evaluar la presencia de heteroplasma mitocondrial en *Aulacomya atra*, se analizaron secuencias de los genes mitocondriales *16S* y *COI* obtenidas a partir de tejido somático (músculo aductor) y gonadal, en organismos previamente sexados. Las secuencias brutas fueron inspeccionadas visualmente en el software Geneious Prime v2023.0 y depuradas manualmente para asegurar la calidad de lectura, detectando la presencia de picos dobles o solapamientos, indicativos de coexistencia de haplotipos mitocondriales (heteroplasma) en los cromatogramas Sanger, particularmente en muestras de tejido muscular de individuos machos.

Posteriormente, las secuencias limpias fueron alineadas usando el algoritmo ClustalW implementado en MEGA11 (Tamura et al., 2021), y se compararon entre sí por tipo de tejido y sexo. Para inferir las relaciones filogenéticas y distinguir los mitotipos, se construyeron árboles de Maximum Likelihood (ML) por separado para cada gen. En el caso del gen *16S*, se empleó el modelo Tamura 3-parameter (T92), mientras que para el gen *COI* se aplicó el modelo Hasegawa-Kishino-Yano con distribución gamma (HKY+G). La selección de los modelos de sustitución más adecuados fue realizada a través del criterio de información bayesiano (BIC) utilizando el software jModelTest v2.1.10 (Posada, 2008).

Los árboles ML fueron generados con 1 000 réplicas de bootstrap, y visualizados y editados en FigTree v1.4.4 para la identificación de clados correspondientes a los mitotipos F (femenino) y M (masculino). En paralelo, se calcularon las distancias genéticas entre tipos de tejido y mitotipos mediante el método de p-distancia en MEGA11. Para el gen *16S*, se consideraron 382 posiciones alineadas, mientras que para el gen *COI* se analizaron 490 posiciones. Las distancias fueron evaluadas entre gónada F, gónada M, músculo aductor F y músculo aductor M, eliminando posiciones ambiguas mediante la opción de eliminación por pares (pairwise deletion).

4.7.4. Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de *A. atra* con base en marcadores mitocondriales y nucleares

a) Estimación de la diversidad genética de *A. atra*

Cada matriz general, en formato fasta (.fasta), fue sometida a análisis en el programa DnaSP 6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017, p. 3299–3302). Dentro de esta aplicación, las secuencias fueron categorizadas por punto de muestreo (Tabla 1), calculándose diversos datos moleculares y los índices de diversidad genética para cada grupo, tales como el Número de haplotipos (NH), la diversidad haplotípica (h), el número de sitios polimórficos (S) y la diversidad nucleotídica (π). Por otro lado, el Número privado de haplotipos únicos para cada población (NP) fue determinado conforme a la lista de haplotipos generada para cada población en Arlequin 3.5.2.2. (Excoffier y Lischer, 2010, p. 564–567).

Las representaciones de las redes de haplotipos se generaron utilizando el algoritmo de parsimonia estadística TCS, implementado en PopART 1.7 (Leigh y Bryant, 2015, p. 1110–1116). Cada haplotipo se graficó proporcionalmente a su frecuencia en cada punto de muestreo, proporcionando una visualización gráfica de la variación genética intrapoblacional. Esta aproximación no solo permitió apreciar la distribución de los haplotipos, sino que también facilitó la identificación de relaciones y estructuras genéticas particulares dentro de las poblaciones estudiadas.

b) Determinación de la estructura poblacional de *A. atra*

Con el propósito de investigar la estructura poblacional, se procedió a calcular el índice de fijación F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984, p. 1358–1370) mediante Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010), utilizando 10,000 permutaciones para establecer la significancia estadística.

Para una evaluación más detallada de la estructuración genética de *A. atra*, se aplicó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992, p. 479–491) basado en las frecuencias haplotípicas, utilizando el software Arlequin v.3.5 v.3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010, p. 564–567).

c) Análisis de las relaciones filogenéticas de *A. atra*

Las secuencias mitocondriales correspondientes a los genes *COI* y *16S*, obtenidas de 120 individuos de *A. atra*, fueron concatenadas para realizar los análisis posteriores. La elección del modelo de sustitución más adecuado se llevó a cabo aplicando el criterio de información bayesiano (BIC), utilizando el software jModelTest (Posada, 2008). El modelo que presentó

el mejor ajuste a los datos fue el Hasegawa-Kishino-Yang (HKY) con una distribución gamma (G).

Además, se investigaron las relaciones filogenéticas entre las secuencias mitocondriales de *A. atra* pertenecientes a los mitotipos F y M de los genes COI y 16S mediante inferencia bayesiana, empleando el programa BEAST v1.10.4 (Drummond & Rambaut, 2007). Para este análisis se utilizó un reloj molecular estricto junto con el modelo HKY+I. Como modelo previo (prior) del árbol filogenético se aplicó un modelo de coalescencia con tamaño poblacional constante. La cadena de Markov fue ejecutada durante 10 millones de generaciones, con un muestreo de parámetros cada 1000 generaciones. Finalmente, todos los árboles generados fueron visualizados y editados con el software FigTree v1.4.4.

d) Análisis del historial demográfico de *A. atra*

La historia demográfica de la población y la neutralidad evolutiva de *A. atra* se sometieron a evaluación mediante dos pruebas, Fu's F_s (Fu, 1997) y Tajima's D (Tajima, 1989, p. 585–595). Los p-valores se calcularon mediante 10,000 simulaciones implementadas en Arlequin. Además, se realizó un análisis de distribución "mismatch" utilizando un modelo de expansión repentina en DnaSP v5.0, comparando las diferencias por pares entre haplotipos (Harpending, 1994, p. 591–600; Rogers y Harpending, 1992, p. 552–569).

V. RESULTADOS

5.1. Fuente de secuencias de ADN

El ADN genómico obtenido mediante la implementación de una versión modificada del método CTAB-Fenol-Cloroformo fue de alta calidad, empleando un total de 120 muestras provenientes del tejido gonadal y 40 muestras del tejido somático (músculo aductor). Asimismo, en la Figura 6, se aprecian bandas distintivas de alto peso molecular (>10,000 bp) en el gel de agarosa al 1%. Cabe destacar que los ratios 260/280 del ADN se situaron dentro del rango óptimo, y oscilando entre 1.8-2.0.

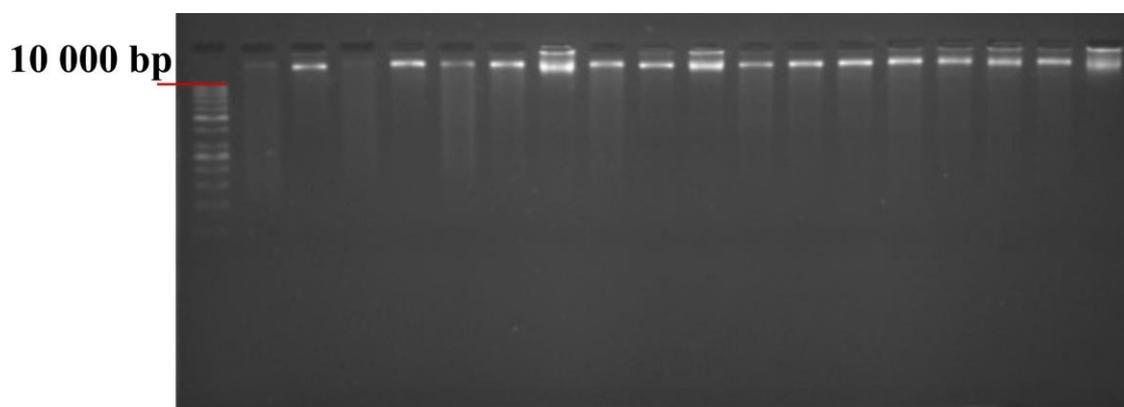


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de extracción de ADN mediante el protocolo CTAB-Fenol-Cloroformo de *A. atra*.

Por otro lado, los fragmentos amplificados correspondientes a las regiones parciales de los genes mitocondriales *16S* y *COI* presentaron longitudes concordantes con las expectativas (Tabla 2), alcanzando 500 y 700 pares de bases (pb), respectivamente (Figura 7). De manera similar, las regiones amplificadas de los genes nucleares *18S* e *ITS-28S* exhibieron una longitud aproximada de 900 pb, como ilustra la Figura 8.

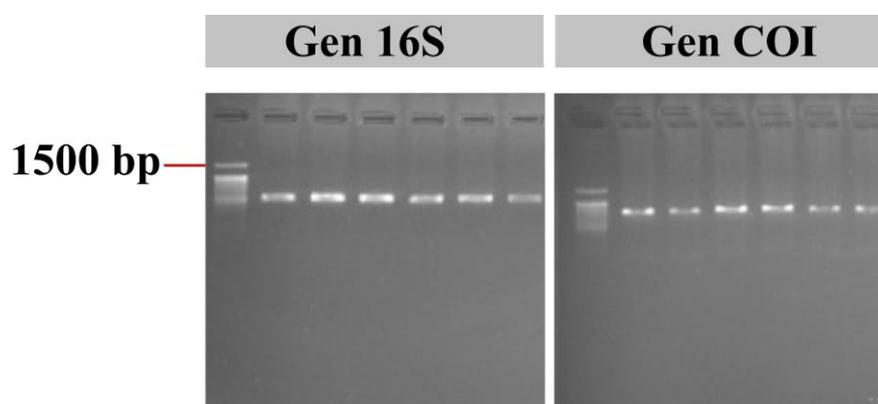


Figura 7. Amplificación de los genes mitocondriales *16S* y *COI* de *A. atra*.

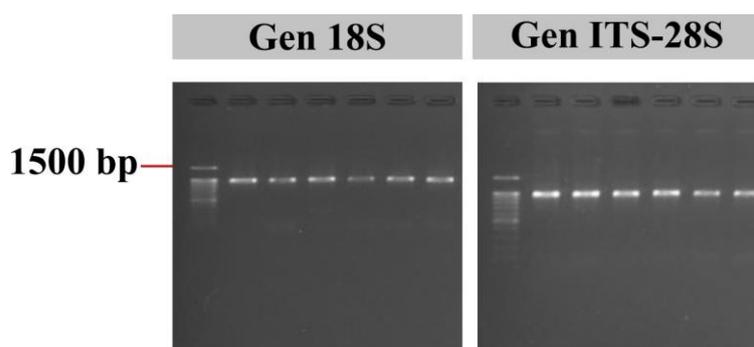


Figura 8. Amplificación de los genes nucleares *18S* e *ITS-28S* de *A. atra*.

Por último, la matriz de alineación del gen *16S* se extendió a 382 pares de bases después de la exclusión de las regiones de baja calidad. De manera similar, el gen *COI* presentó una longitud de 490 pb, el gen *18S* abarcó 779 pb, y el gen *ITS-28S* comprendió 775 pb (Ver Anexo 1).

5.2. Caracterización de la identidad molecular y diferenciación genética de *A. atra* mediante el análisis de los genes nucleares *18S* e *ITS-28S*

El análisis filogenético basado en las secuencias del gen nuclear *18S* permitió esclarecer la identidad molecular de los individuos de *A. atra* procedentes de distintas localidades del litoral sur peruano. En la Figura 9, el árbol filogenético inferido mediante el método Neighbor-Joining (NJ) muestra que todas las secuencias analizadas, independientemente de su localidad de origen (Tacna e Ica), se agrupan en un único clado bien definido, junto con las secuencias de referencia de *A. atra* provenientes de Chile. Esto indica una alta similitud genética entre los ejemplares analizados y las secuencias de referencia, respaldando su correcta identificación taxonómica como *A. atra*.

Adicionalmente, *Perumytilus purpuratus*, empleado como grupo externo (outgroup), se ubicó fuera del clado principal, lo cual valida la agrupación monofilética de las secuencias correspondientes a *A. atra*. Este patrón filogenético sugiere la ausencia de divergencia genética en el gen *18S* entre los individuos peruanos analizados y sus contrapartes chilenas.

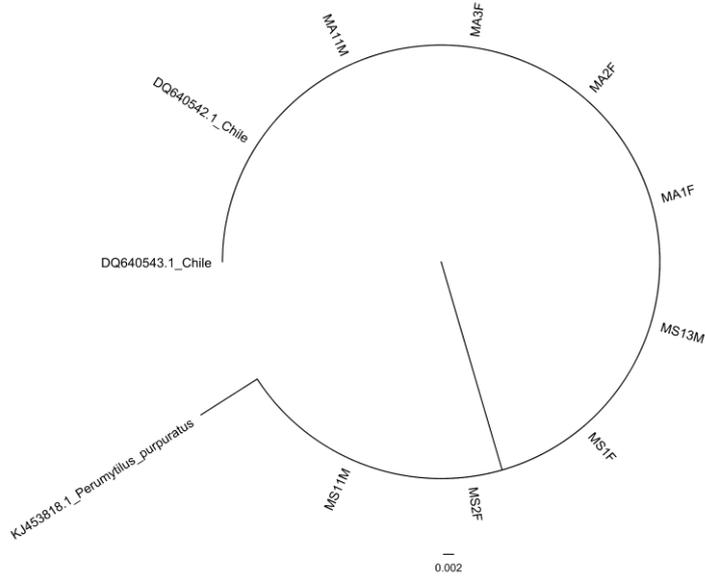


Figura 9. Árbol filogenético de *A. atra* basado en el gen *18S*, inferido mediante el método Neighbor-Joining (NJ). Las distancias evolutivas se calcularon mediante el modelo de Jukes-Cantor (JC). *Perumytilus purpuratus* se utilizó como grupo externo (outgroup).

En concordancia con el árbol filogenético anterior, los resultados obtenidos en la Tabla 3 revelan que todas las distancias genéticas entre pares de secuencias fueron de 0.000, lo que corresponde a un 0 % de divergencia genética. Esto indica que no se detectaron sustituciones de bases en las 779 posiciones nucleotídicas analizadas del gen *18S*. La ausencia de variabilidad genética en este marcador sugiere que el gen *18S* es altamente conservado en *A. atra*, y aunque resulta útil para confirmar la identidad molecular de la especie, su baja tasa de evolución limita su utilidad para detectar diferenciación genética entre poblaciones geográficamente cercanas.

Estos resultados confirman que los individuos estudiados pertenecen inequívocamente a *Aulacomya atra*, pero también evidencian que el gen *18S* no proporciona resolución suficiente para evaluar estructuras poblacionales o divergencia intraespecífica en escalas geográficas reducidas.

Tabla 3. Distancias genéticas del gen *18S* de *A. atra*, basados en el modelo de Jukes-Cantor (JC).

	MS1F	MS2F	MS11M	MS13M	MA1F	MA2F	MA3F
MS1F							
MS2F	0.000						
MS11M	0.000	0.000					
MS13M	0.000	0.000	0.000				
MA1F	0.000	0.000	0.000	0.000			
MA2F	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
MA3F	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
MA11M	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Para complementar la identidad molecular de *A. atra*, el análisis filogenético realizado con el gen nuclear *ITS-28S* permitió esclarecer aún más la identificación molecular de *A. atra*. La Figura 10 muestra el árbol filogenético construido mediante el método Neighbor-Joining (NJ), empleando el modelo evolutivo de Kimura de dos parámetros (K2P), donde se observa que todas las secuencias peruanas analizadas se agrupan en un único clado sin evidencia de divergencia entre ellas.

Asimismo, este clado incluye también secuencias de referencia procedentes de *A. atra* de Sudáfrica y Nueva Zelanda, indicando una relación filogenética estrecha entre estos linajes geográficamente distantes. Este patrón sugiere que las secuencias peruanas del gen *ITS-28S* presentan una alta conservación con respecto a poblaciones extranjeras, y que no existen mutaciones detectables en las 378 posiciones analizadas que permitan distinguirlas a nivel intraespecífico.

La validez de esta agrupación es reforzada por la inclusión de *Brachidontes modiolus* como grupo externo (outgroup), el cual se ubica claramente fuera del clado principal, permitiendo delimitar con precisión la monofilia del grupo *A. atra*. Este resultado respalda tanto la identificación correcta de los ejemplares analizados como su pertenencia inequívoca a la especie *A. atra*.

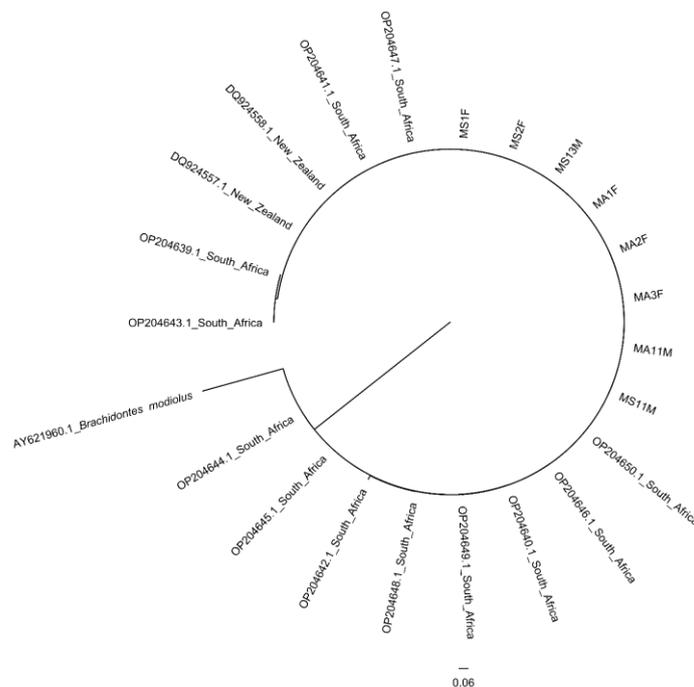


Figura 10. Árbol filogenético de *A. atra* basado en el gen ITS-28S, inferido mediante el método Neighbor-Joining (NJ). Las distancias evolutivas se calcularon mediante el modelo de Kimura de dos parámetros (K2P). *Brachidontes modiolus* se utilizó como grupo externo (outgroup).

En complemento, los resultados de la Tabla 4 evidencian que todas las distancias genéticas calculadas entre pares de secuencias fueron de 0 % de divergencia genética. Esta total ausencia de variabilidad sugiere que el gen *ITS-28S*, al igual que el *18S*, es altamente conservado y no presenta diferenciación a nivel poblacional dentro del rango geográfico muestreado.

En conjunto, estos hallazgos reafirman que las secuencias de *A. atra* del litoral sur peruano pertenecen a una única unidad taxonómica y comparten una estrecha relación evolutiva con linajes sudafricanos y neozelandeses, aunque el marcador *ITS-28S* no ofrece la resolución necesaria para detectar estructuras poblacionales ni variación genética a pequeña escala.

Tabla 4. Distancias genéticas del gen *ITS-28S* de *A. atra*, basados en el modelo de Kimura de dos parámetros (K2P).

	MS1F	MS2F	MS11M	MS13M	MA1F	MA2F	MA3F
MS1F							
MS2F	0.000						
MS11M	0.000	0.000					
MS13M	0.000	0.000	0.000				
MA1F	0.000	0.000	0.000	0.000			
MA2F	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
MA3F	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
MA11M	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

5.3. Detección de Doble Herencia Uniparental (DUI) en *A. atra* a través del análisis de los genes mitocondriales *16S* y *COI* en tejido gonadal

El análisis filogenético realizado a partir de las secuencias mitocondriales de los genes *16S* y *COI*, obtenidas del tejido gonadal de *A. atra*, evidenció la existencia de Doble Herencia Uniparental (DUI) en esta especie. La topología del árbol inferido mediante análisis bayesiano (Figura 11) reveló una dicotomía filogenética robusta, conformada por dos clados altamente diferenciados que corresponden a los mitotipos F (femenino, color rosado) y M (masculino, color azul). Esta segregación mitogenómica se correlacionó estrechamente con el sexo de los organismos, observándose que las hembras presentaron exclusivamente el mitotipo F, mientras que los machos portaron el mitotipo M (ver Anexo 4). La clara estructuración de linajes mitocondriales en función del sexo constituye un rasgo distintivo de los sistemas de DUI en bivalvos marinos, confirmando la transmisión diferenciada de genomas mitocondriales en función del linaje germinal.

La robustez de esta diferenciación fue reforzada por las distancias genéticas promedio obtenidas entre mitotipos. En el caso del gen *16S*, la divergencia entre las secuencias de gónadas femeninas y masculinas fue de 12.45% sustituciones por sitio (Tabla 5), calculada bajo el modelo de Tamura 3-parameter con distribución gamma. Por su parte, el gen *COI* mostró una distancia genética aún mayor entre mitotipos, con un valor de 23.5% sustituciones por sitio (Tabla 6), estimado mediante el modelo Tajima-Nei. Estas diferencias sustanciales respaldan la presencia de linajes mitocondriales diferenciados y refuerzan la hipótesis de DUI.

Tabla 5. Distancias genéticas promedio entre mitotipos F y M del gen *16S* de *A. atra*, calculadas bajo el modelo Tamura 3-parameter (G = 1).

	Gónada F	Gónada M
Gónada F		
Gónada M	0.12447	

Tabla 6. Distancias genéticas promedio entre mitotipos F y M del gen *COI* de *A. atra*, calculadas bajo el modelo Tajima-Nei.

	Gónada F	Gónada M
Gónada F		
Gónada M	0.235	

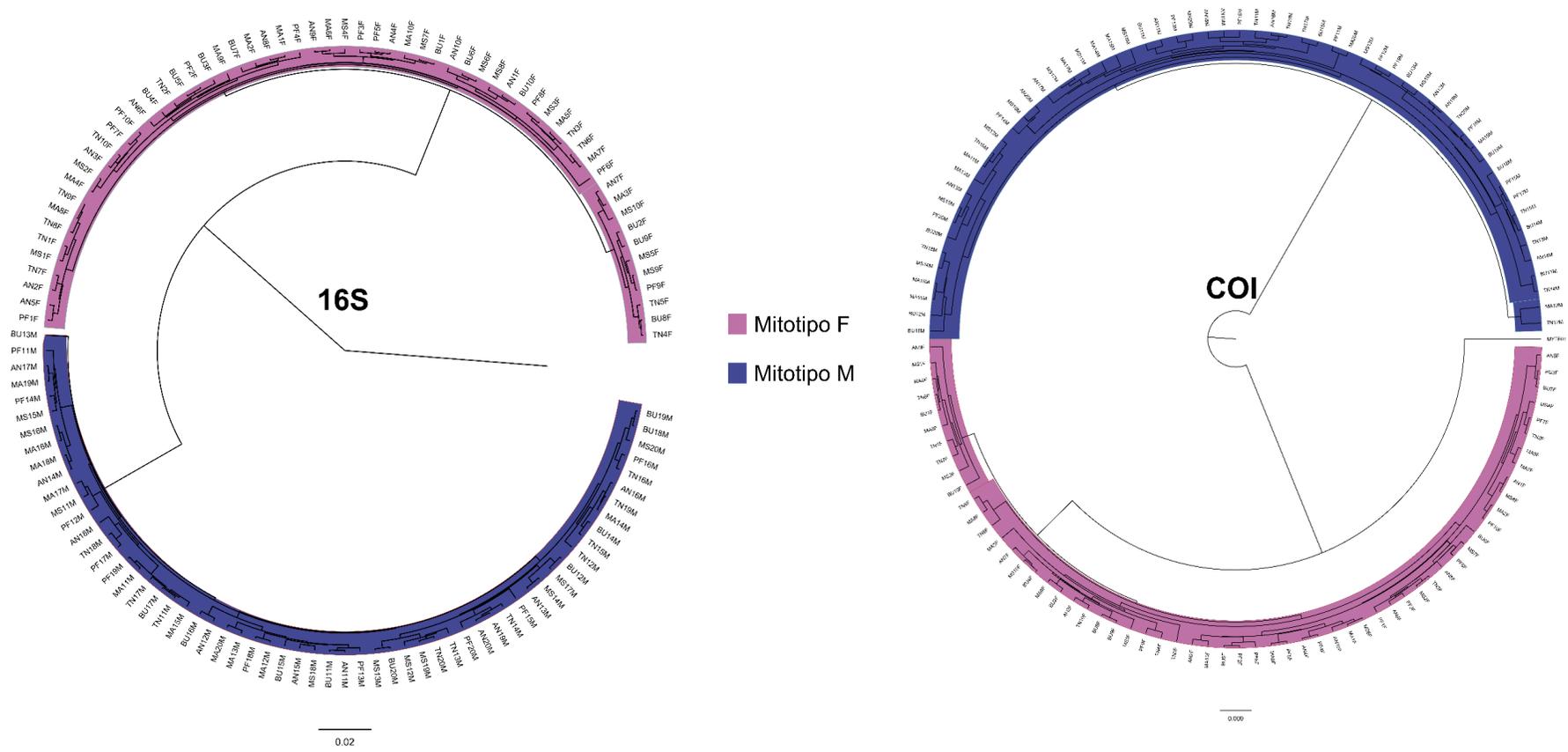


Figura 11. Árbol filogenético inferido por análisis bayesiano a partir de las secuencias concatenadas de los genes mitocondriales *16S* y *COI* de *A. atra*. El árbol fue construido bajo un modelo de coalescencia con tamaño poblacional constante, utilizando un reloj molecular estricto y el modelo evolutivo HKY+I.

5.4. Evaluación de la heteroplasma en *A. atra* mediante la secuenciación de los genes mitocondriales *16S* y *COI* en tejido somático

Las comparaciones genéticas entre las secuencias del gen mitocondrial *16S*, obtenidas de tejido gonadal y del músculo aductor de *A. atra*, evidenciaron la existencia de dos linajes mitocondriales asociados al sexo. Se observó una divergencia del 12.4% entre las gónadas femeninas y masculinas, lo que respalda firmemente la presencia de DUI. Asimismo, la diferencia genética del 8.7% entre la gónada masculina y el músculo aductor masculino sugiere la persistencia del mitotipo M en el tejido somático de los machos, indicativa de un posible estado de heteroplasma.

Tabla 7. Distancias genéticas (p-distancia) entre tejidos de *A. atra* (gen *16S*).

TEJIDO	Gónada F	Gónada M	Músculo Aductor F
Gónada F	0		
Gónada M	0.12447	0	
Músculo Aductor F	0.00275	0.12447	0
Músculo Aductor M	0.02800	0.08773	0.02779

De manera complementaria, el análisis del gen *COI* mostró una distancia genética del 5.1% entre el músculo aductor y la gónada masculina, mientras que entre las gónadas femeninas y masculinas se registró una mayor divergencia del 23.5%. Estos valores refuerzan la hipótesis de que el mitotipo M está presente en tejidos somáticos masculinos, apoyando la coexistencia de ambos linajes mitocondriales en un mismo individuo y, por tanto, la existencia de heteroplasma asociada al sexo en *A. atra*.

Tabla 8. Distancias genéticas (p-distancia) entre tejidos de *A. atra* (gen *COI*).

TEJIDO	Gónada F	Gónada M	Músculo Aductor F
Gónada F	0		
Gónada M	0.235	0	
Músculo Aductor F	0.00606	0.235	0
Músculo Aductor M	0.18977	0.05183	0.18978

La generación de árboles de Maximum Likelihood (ML) basados en los genes mitocondriales *16S* (Figura 12) y *COI* (Figura 13) confirmó la coexistencia de ambos mitotipos, F y M. Específicamente, se pudo observar que los individuos de género masculino (M) presentan el Mitotipo M en ambas muestras, tanto en tejido somático (MS) como en tejido gonadal (G), mientras que únicamente exhiben el Mitotipo F en el tejido somático (MS). En contraste, los individuos de género femenino (F) poseen exclusivamente el

mitotipo F en forma homoplásmica, tanto en el tejido somático (MS) como en el tejido gonadal (G) (Tabla 11 y 12). Estos resultados brindan una perspectiva detallada sobre la distribución y persistencia de los mitotipos en relación con el género y el tipo de tejido examinado para ambos genes.

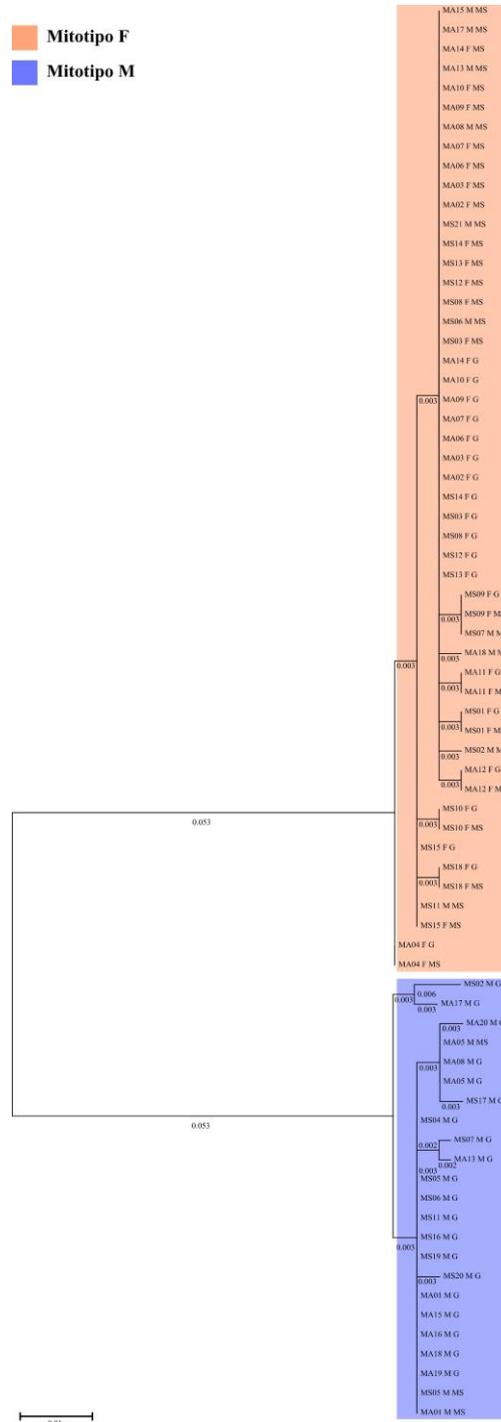


Figura 12. Árbol filogenético inferido por Maximum Likelihood (ML) bajo el modelo Tamura 3-parameter (T92), basado en secuencias del gen mitocondrial *16S* de *A. atra*. Los colores representan la diferenciación entre mitotipos F y M, considerando tejidos de gónada (G) y músculo aductor (MS).

Los resultados obtenidos revelaron patrones claros de herencia mitocondrial asociados al sexo en *A. atra* a partir del análisis del tejido somático (músculo aductor) en los genes mitocondriales *16S* y *COI*. En las hembras, se constató una presencia homoplásmica del mitotipo F, observándose exclusivamente este mitotipo en todas las muestras analizadas (Tablas 9 y 10). Esto indica que, en el tejido muscular y gonadal de las hembras, todas las mitocondrias compartieron la misma variante mitocondrial.

Por el contrario, en los machos se detectó la coexistencia de ambos mitotipos, evidenciándose un patrón de heteroplasmia en el tejido somático. Para el gen *16S*, el 35% de los machos presentaron ambos mitotipos (F y M) de manera simultánea, mientras que el 50% exhibieron únicamente el mitotipo F y el 15% el mitotipo M en forma homoplásmica (Tabla 9).

En el caso del gen *COI*, el patrón de heteroplasmia fue aún más pronunciado, ya que el 55% de los machos mostraron la coexistencia de los mitotipos F y M, el 5% presentaron solamente el mitotipo F, y el 40% exclusivamente el mitotipo M (Tabla 10). Estos resultados sugieren que el gen *COI* presenta una mayor proporción de organismos homoplásmicos para el mitotipo M en el músculo aductor en comparación con el gen *16S*, lo que podría reflejar una mayor persistencia o amplificación diferencial del mitotipo M en este gen.

La evidencia de heteroplasmia en machos, junto con la homoplasmia observada en hembras, respalda la presencia de un sistema de Doble Herencia Uniparental (DUI) en *A. atra*, donde los machos mantienen ambos linajes (M y F) en tejidos somáticos, mientras que en las hembras predomina exclusivamente el linaje F.

Tabla 9. Distribución de los mitotipos F y M en el músculo aductor de machos y hembras de *A. atra*, basado en el gen mitocondrial *16S*.

Sexo	N	Mitotipo FM		Mitotipo F		Mitotipo M	
		n	%	n	%	n	%
Macho	20	7	35	10	50	3	15
Hembra	20	0	0	20	100	0	0

Tabla 10. Distribución de los mitotipos F y M en el músculo aductor de machos y hembras de *A. atra*, basado en el gen mitocondrial *COI*.

Sexo	N	Mitotipo FM		Mitotipo F		Mitotipo M	
		n	%	n	%	n	%
Macho	20	11	55	1	5	8	40
Hembra	20	0	0	20	100	0	0

Tabla 11. Detección de mitotipos F y M en tejido somático (músculo aductor) de 40 individuos (20 hembras y 20 machos) de *A. atra* mediante el gen *16S*, provenientes de las localidades de Morro Sama y Marcona. (+ Presente, – Ausente)

Muestra	Sexo	Mitotipo F	Mitotipo M	Localidad
MS01_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS02_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS03_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS04_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS05_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS06_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS07_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS08_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS09_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS10_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS11_M_MS	M	+	-	Morro Sama
MS13_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS14_M_MS	M	+	-	Morro Sama
MS15_M_MS	M	+	-	Morro Sama
MS16_M_MS	M	+	-	Morro Sama
MS17_M_MS	M	+	+	Morro Sama
MS18_M_MS	M	+	+	Morro Sama
MS19_M_MS	M	+	+	Morro Sama
MS20_M_MS	M	+	+	Morro Sama
MS21_M_MS	M	+	-	Morro Sama
MA01_F_MS	F	+	-	Marcona
MA02_F_MS	F	+	-	Marcona
MA03_F_MS	F	+	-	Marcona
MA04_F_MS	F	+	-	Marcona
MA05_F_MS	F	+	-	Marcona
MA06_F_MS	F	+	-	Marcona
MA07_F_MS	F	+	-	Marcona
MA08_F_MS	F	+	-	Marcona
MA09_F_MS	F	+	-	Marcona
MA10_F_MS	F	+	-	Marcona
MA11_M_MS	M	-	+	Marcona
MA12_M_MS	M	-	+	Marcona
MA13_M_MS	M	+	-	Marcona
MA14_M_MS	M	+	-	Marcona
MA15_M_MS	M	+	-	Marcona
MA16_M_MS	M	+	+	Marcona
MA17_M_MS	M	+	-	Marcona
MA18_M_MS	M	+	-	Marcona
MA19_M_MS	M	+	+	Marcona
MA20_M_MS	M	+	+	Marcona

Tabla 12. Detección de mitotipos F y M en tejido somático (músculo aductor) de 40 individuos (20 hembras y 20 machos) de *A. atra* mediante el gen *COI*, provenientes de las localidades de Morro Sama y Marcona. (+ Presente, – Ausente)

Muestra	Sexo	Mitotipo F	Mitotipo M	Localidad
MS01_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS02_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS03_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS04_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS05_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS06_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS07_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS08_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS09_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS10_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS11_M_MS	M	+	+	Morro Sama
MS13_M_MS	M	+	+	Morro Sama
MS14_M_MS	M	+	+	Morro Sama
MS15_M_MS	M	+	+	Morro Sama
MS16_M_MS	M	+	+	Morro Sama
MS17_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS18_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS19_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS20_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS21_M_MS	M	+	+	Morro Sama
MA01_F_MS	F	+	-	Marcona
MA02_F_MS	F	+	-	Marcona
MA03_F_MS	F	+	-	Marcona
MA04_F_MS	F	+	-	Marcona
MA05_F_MS	F	+	-	Marcona
MA06_F_MS	F	+	-	Marcona
MA07_F_MS	F	+	-	Marcona
MA08_F_MS	F	+	-	Marcona
MA09_F_MS	F	+	-	Marcona
MA10_F_MS	F	+	-	Marcona
MA11_M_MS	M	-	+	Marcona
MA12_M_MS	M	-	+	Marcona
MA13_M_MS	M	+	+	Marcona
MA14_M_MS	M	+	+	Marcona
MA15_M_MS	M	+	+	Marcona
MA16_M_MS	M	+	-	Marcona
MA17_M_MS	M	+	+	Marcona
MA18_M_MS	M	+	+	Marcona
MA19_M_MS	M	-	+	Marcona
MA20_M_MS	M	-	+	Marcona

5.5. Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de *A. atra* con base en marcadores mitocondriales y nucleares

5.5.1. Diversidad genética de los marcadores nucleares *18S* e *ITS-28S*

En los análisis de los genes nucleares *18S* e *ITS-28S* realizados en *A. atra*, se observó que las ocho secuencias analizadas para cada gen fueron idénticas entre sí, sin diferencias nucleotídicas ni sitios polimórficos detectados (Anexo 1). Como resultado, no se encontraron haplotipos en ninguna de las poblaciones evaluadas, indicando una ausencia de diversidad genética en estos marcadores nucleares. Estos hallazgos sugieren un alto nivel de conservación genética en los genes *18S* e *ITS-28S* en las poblaciones de *A. atra* del litoral peruano.

5.5.2. Diversidad genética de los marcadores mitocondriales *16S* y *COI*

a) Marcador *16S* (Mitotipos F y M)

El análisis detallado de haplotipos reveló la presencia de 20 y 24 haplotipos para los mitotipos F y M, respectivamente, en una muestra total de 120 organismos secuenciados (60 machos, 60 hembras). Se observó que el mitotipo F exhibió 17 sitios polimórficos y un total de 15 haplotipos privados, mientras que el mitotipo M mostró una mayor diversidad con 25 sitios polimórficos y 20 haplotipos privados (Tabla 13). Esta discrepancia sugiere que el mitotipo M presenta una variabilidad genética más amplia en comparación con el mitotipo F.

Los valores de diversidad haplotípica para el mitotipo F oscilaron entre 0.5333 y 0.8667, siendo Marcona la localidad con el valor más bajo y Punta El Faro con el más alto. Por otro lado, el mitotipo M registró valores de diversidad haplotípica más elevados, variando desde 0.6444 (El Túnel) hasta 0.9778 (Punta El Faro) (Tabla 13).

Entre los haplotipos más prevalentes, se destacaron H1 y H2 en el mitotipo F, con H1 siendo el más dominante, alcanzando un 70% de prevalencia en el banco natural Marcona y un 60% en Bufadero (Anexo 2). En el mitotipo M, los haplotipos H1, H4 y H5 fueron los más comunes, destacando H1 con una prevalencia del 60% compartida entre Morro Sama y El Túnel (Anexo 2).

Los valores de diversidad nucleotídica (π) se mantuvieron relativamente homogéneos en el mitotipo F, con el menor valor de 0.00209 en Marcona y el mayor de 0.00343 en El Túnel. En contraste, el mitotipo M presentó rangos más amplios, con un valor mínimo de 0.00198

en El Túnel y un valor máximo de 0.00419 en Morro Sama. Comparativamente, el mitotipo M (0.00374) exhibió una diversidad nucleotídica superior al mitotipo F (0.00285) (Tabla 513. Estos resultados sugieren una dinámica genética diferencial entre los mitotipos F y M en la población estudiada de *A. atra*.

Tabla 13. Índices de diversidad genética de 6 poblaciones de *A. atra* basado en la región 16S.

	ICA		AREQUIPA		MOQUEGUA	TACNA	TOTAL
	MA	PF	TN	AN	BF	MS	
16S Mitotipo F							
N	10	10	10	10	10	10	60
h	4	7	5	6	4	6	20
ph	2	3	2	3	1	4	15
Hd	0.53333	0.86667	0.82222	0.77778	0.64444	0.77778	0.72260
π	0.00209	0.00343	0.00343	0.00262	0.00227	0.00332	0.00285
S	4	5	5	5	3	5	17
16S Mitotipo M							
N	10	10	10	10	10	10	60
h	5	9	4	6	5	5	24
ph	2	7	2	2	3	4	20
Hd	0.75556	0.97778	0.64444	0.77778	0.75556	0.66667	0.75876
π	0.00384	0.00512	0.00198	0.00355	0.00407	0.00419	0.00374
S	6	9	3	6	7	8	25

N = Número de individuos; h = número de haplotipos; ph = número de haplotipos privados; Hd = Diversidad de haplotipos; π = diversidad nucleotídica; S = número de sitios segregantes

b) Marcador COI (Mitotipos F y M)

El análisis exhaustivo de haplotipos reveló la existencia de 32 y 44 haplotipos para los mitotipos F y M, respectivamente, en una muestra total de 120 organismos secuenciados, distribuidos equitativamente entre machos y hembras. Se observó que el mitotipo F presentó 36 sitios polimórficos y un total de 29 haplotipos privados, mientras que el mitotipo M demostró una mayor diversidad con 44 sitios polimórficos y 38 haplotipos privados (Tabla 14). Esta disparidad implica que el mitotipo M exhibe una variabilidad genética más extensa en comparación con el mitotipo F.

Los índices de diversidad haplotípica para el mitotipo F oscilaron entre 0.5333 y 0.9778, siendo Punta El Faro la localidad con el valor más bajo y El Túnel y El Ancla con el valor más alto. Por otro lado, el mitotipo M registró valores de diversidad haplotípica más elevados, variando desde 0.9333 (Punta El Faro) hasta 1.000 (El Túnel, Bufadero, Morro Sama) (Tabla 14).

Entre los haplotipos predominantes, se destacaron H2, H5 y H12 en el mitotipo F, siendo H2 el más prevalente, con un 70% en Punta El Faro y un 40% en Marcona (Anexo 2). En el mitotipo M, los haplotipos H7, H9 y H10 fueron los más comunes, destacando H7 con una prevalencia del 30% en Punta El Faro (Anexo 2).

Los valores de diversidad nucleotídica (π) se mantuvieron relativamente uniformes en el mitotipo F, con el valor más bajo de 0.00163 en Punta El Faro y el más alto de 0.00821 en El Túnel. En contraste, el mitotipo M exhibió rangos más amplios, con un valor mínimo de 0.00503 en El Ancla y un valor máximo de 0.01084 en El Túnel. Comparativamente, el mitotipo M (0.00704) mostró una diversidad nucleotídica superior al mitotipo F (0.00609) (Tabla 14). Estos resultados sugieren una dinámica genética diferencial entre los mitotipos F y M en la población de *A. atra* bajo estudio, ofreciendo una visión más completa de la variabilidad genética en esta especie.

Tabla 14. Índices de diversidad genética de 6 poblaciones de *A. atra* basado en la región COI.

	ICA	AREQUIPA			MOQUEGUA	TACNA	
	MA	PF	TN	AN	BF	MS	TOTAL
COI Mitotipo F							
N	10	10	10	10	10	10	60
h	6	4	9	9	7	8	32
ph	4	2	7	7	3	5	29
Hd	0.84444	0.53333	0.97778	0.97778	0.91111	0.93333	0.89096
π	0.00676	0.00163	0.00821	0.00662	0.00644	0.00576	0.00609
S	12	4	12	14	11	10	36
COI Mitotipo M							
N	10	10	10	10	10	10	60
h	8	8	10	9	10	10	44
ph	4	6	6	7	9	6	38
Hd	0.95556	0.93333	1.00000	0.97778	1.00000	1.00000	0.97345
π	0.00753	0.00472	0.01084	0.00503	0.00707	0.00680	0.00704
S	14	9	21	11	14	12	53

N = Número de individuos; h = número de haplotipos; ph = número de haplotipos privados; Hd = Diversidad de haplotipos; π = diversidad nucleotídica; S = número de sitios segregantes;

5.5.3. Estructura poblacional de *A. atra* de los marcadores mitocondriales

Al igual que la ausencia de diversidad genética observada en los marcadores nucleares *18S* e *ITS-28S*, los análisis de estructura poblacional no mostraron evidencias de diferenciación significativa entre las poblaciones de *A. atra* en el litoral peruano. Los valores de los índices de estructura genética, como *Fst* y los resultados de análisis de varianza molecular (AMOVA), indicaron una homogeneización genética entre las poblaciones, lo que sugiere que, a pesar de la amplia distribución geográfica, las poblaciones de *A. atra* no presentan una diferenciación poblacional clara basada en estos genes nucleares.

a) Estructura poblacional de los mitotipos F y M del gen *16S*

La representación en red del mitotipo F del gen *16S* de *A. atra* no revela agrupaciones definidas o estructuración poblacional aparente. Contrariamente, los haplotipos más frecuentes, H1 y H2, están estrechamente vinculados con una diferencia de un solo paso. Asimismo, los 15 haplotipos privados exhiben fuertes relaciones con los haplotipos

fundadores, a una máxima distancia de aproximadamente 3 pasos (Figura 14). De manera similar, los haplotipos más comunes (H1, H4 y H5) del mitotipo M, están estrechamente relacionados entre sí, y los 20 haplotipos privados presentan proximidad con los haplotipos fundadores (Figura 15).

Por otro lado, se observa la presencia de una estructura en forma de estrella en ambos Networks, un patrón común en bivalvos marinos. Esto sugiere que los haplotipos están fuertemente asociados con los haplotipos H1 (mitotipo F) y H1 (mitotipo M). Por lo tanto, estos resultados indican una escasa estructuración poblacional y diferenciación genética en la población de *A. atra*, proporcionando información valiosa sobre la conectividad genética en esta especie.

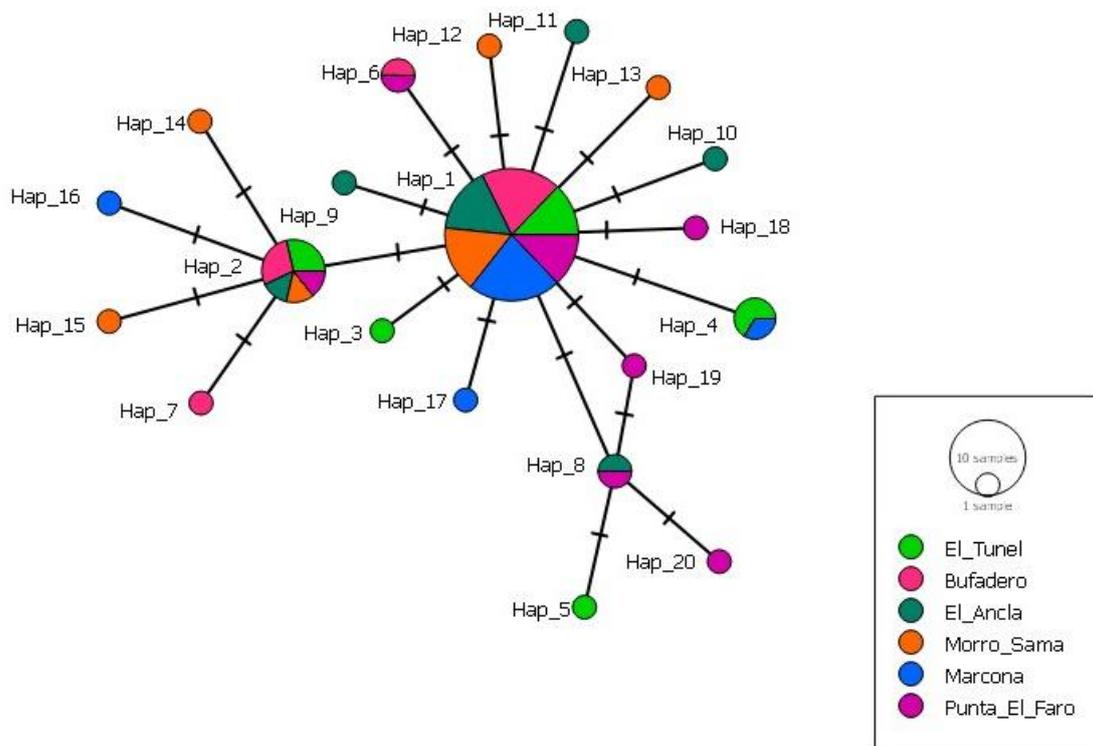


Figura 14. Red de haplotipos inferidas del mitotipo F del gen *16S* de 6 poblaciones de *A. atra*. Cada nodo representa un haplotipo distinto, cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia. Las líneas transversales indican el número de sustituciones de nucleótidos entre haplotipos adyacentes.

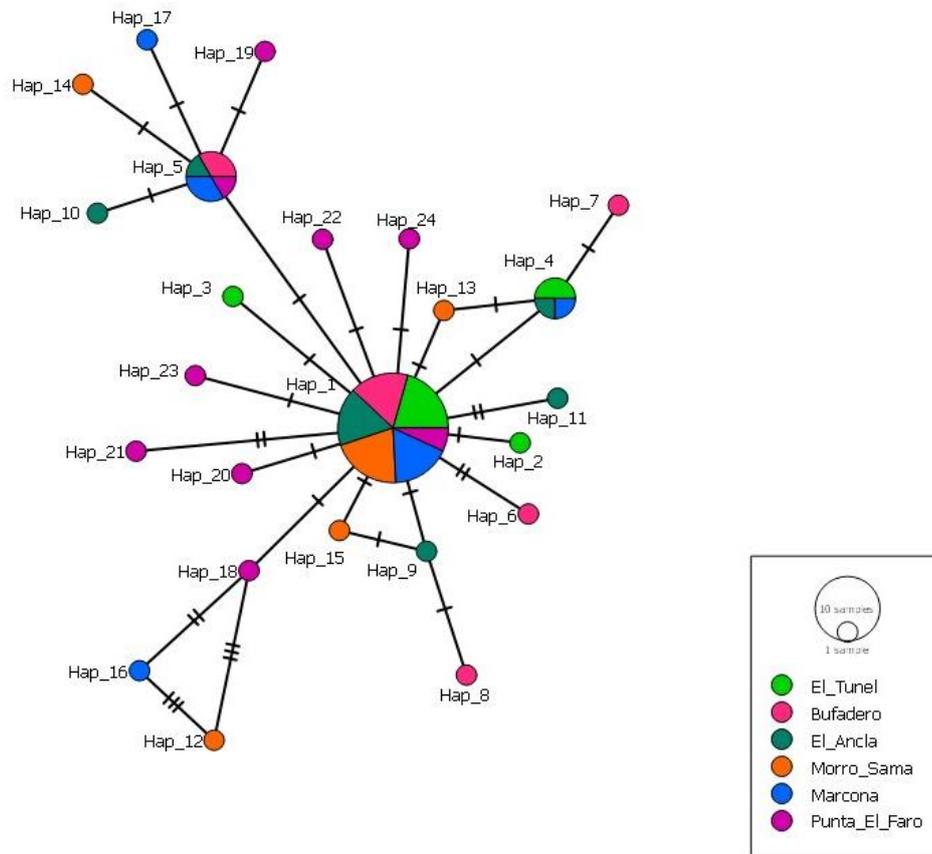


Figura 15. Red de haplotipos inferidas del mitotipo M del gen *16S* de 6 poblaciones de *A. atra*. Cada nodo representa un haplotipo distinto, cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia. Las líneas transversales indican el número de sustituciones de nucleótidos entre haplotipos adyacentes.

La aplicación de la prueba de Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) considerando todas las poblaciones como un único grupo para los mitotipos F y M del gen 16S reveló valores en los cuales el mayor porcentaje de variación genética se encuentra dentro de las poblaciones, alcanzando un 100.30% y 101.74%, respectivamente. No se observó significancia estadística en el estadístico F (Tabla 15).

En el análisis de comparaciones a pares de F_{st} para el mitotipo F, empleado para evaluar la diferenciación genética entre poblaciones, se registraron valores muy cercanos a 0 (-0.04 a 0.02) y no se evidenció significancia estadística (los valores negativos se asumieron como 0, y los cercanos a 1 indican diferenciación genética). Estos resultados sugieren una homogeneización considerable entre las localidades analizadas (Tabla 16).

En relación con el mitotipo M, la comparación a pares de F_{st} reveló diferenciación genética entre poblaciones en un rango de -0.05 a 0.025 (Tabla 17), sin alcanzar significancia estadística. Esto confirma la alta homogeneización entre las localidades en el contexto del gen 16S.

Tabla 15. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de los mitotipos F y M del gen 16S de 6 poblaciones de *A. atra*.

16S Mitotipo F					
	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	% de variación	
Entre poblaciones	5	2.650	-0.00163 Va	-0.30	Fst = -0.00299
Dentro de poblaciones	54	29.500	0.54630 Vb	100.30	
Total	59	32.150	0.54467		
16S Mitotipo M					
Entre poblaciones	5	3.000	-0.01241 Va	-1.74	Fst = -0.01743
Dentro de poblaciones	54	39.100	0.72407 Vb	101.74	
Total	59	42.100	0.71167		

Tabla 16. Diferenciación genética por pares de Fst de las 6 poblaciones de *A. atra* basados en el mitotipo F del gen 16S.

EST	AN	BU	MA	MS	PF	TN
AN	0					
BU	0.00709	0				
MA	-0.02273	0.00794	0			
MS	0.00585	-0.04575	0.00641	0		
PF	-0.02262	0.0101	0.02263	0.03814	0	
TN	-0.01365	-0.00823	-0.03486	-0.00694	-0.00085	0

Tabla 17. Diferenciación genética por pares de Fst de las 6 poblaciones de *A. atra* basados en el mitotipo M del gen 16S.

EST	AN	BU	MA	MS	PF	TN
AN	0					
BU	-0.05475	0				
MA	-0.05307	-0.03501	0			
MS	-0.02623	-0.02453	-0.02908	0		
PF	-0.02195	-0.02067	-0.03079	-0.02171	0	
TN	0.00419	0.00383	0.04215	0.00188	0.03175	0

b) Estructura poblacional de los mitotipos F y M del gen *COI*

La red de haplotipos del mitotipo F del gen *COI* de *A. atra* no revela agrupaciones definidas o estructuración poblacional aparente. En cambio, los haplotipos más prevalentes, H2, H5 y H12, están conectados por una diferencia de 3 o 4 pasos. Adicionalmente, los 29 haplotipos privados presentan vínculos significativos con los haplotipos fundadores, con una distancia

máxima de aproximadamente 3 pasos (Figura 16). Del mismo modo, los haplotipos más comunes del mitotipo M (H7 y H10) están estrechamente relacionados entre sí, y los 38 haplotipos privados exhiben proximidad con los haplotipos fundadores (Figura 16).

Es relevante señalar la presencia de una estructura en forma de estrella en ambas redes, un patrón recurrente en bivalvos marinos. Este hallazgo sugiere una fuerte asociación de los haplotipos con los haplotipos H2 (mitotipo F) y H10 (mitotipo M) (Figura 17). Estos resultados respaldan la idea de una escasa estructuración poblacional y diferenciación genética en la población de *A. atra*, proporcionando valiosa información sobre la conectividad genética en esta especie.

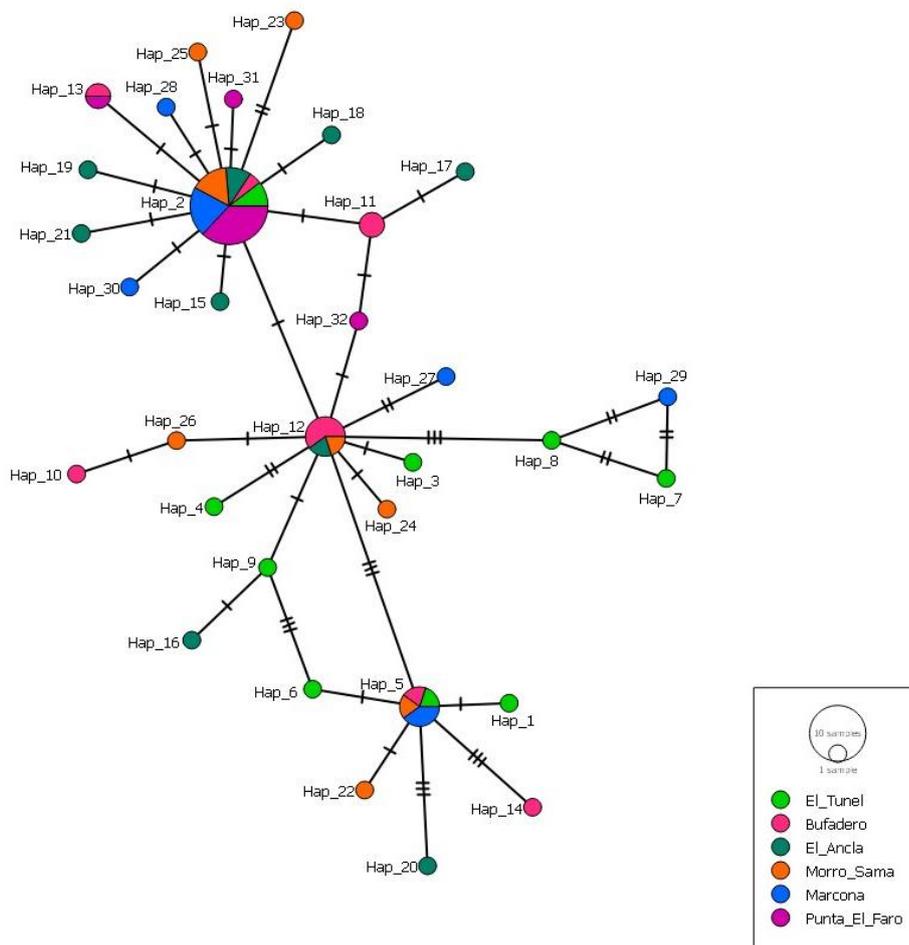


Figura 16. Red de haplotipos inferidas del mitotipo F del gen *COI* de 6 poblaciones de *A. atra*. Cada nodo representa un haplotipo distinto, cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia. Las líneas transversales indican el número de sustituciones de nucleótidos entre haplotipos adyacentes.

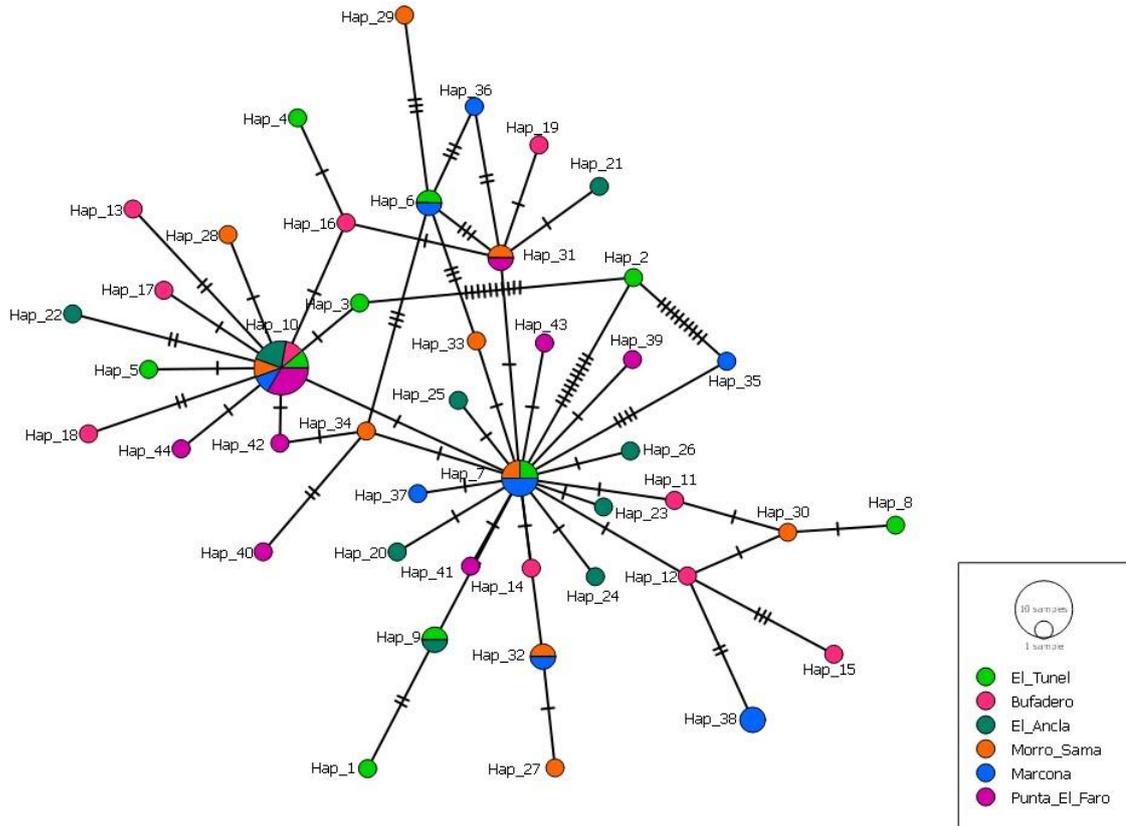


Figura 17. Red de haplotipos inferidas del mitotipo M del gen *COI* de 6 poblaciones de *A. atra*. Cada nodo representa un haplotipo distinto, cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia. Las líneas transversales indican el número de sustituciones de nucleótidos entre haplotipos adyacentes.

La aplicación del análisis de Varianza Molecular (AMOVA) considerando todas las poblaciones como un único grupo para los mitotipos F y M del gen *COI* reveló valores en los cuales el mayor porcentaje de variación genética se encuentra dentro de las poblaciones, alcanzando un 96.38% y 99.26%, respectivamente. No se observó significancia estadística en el estadístico F (Tabla 18).

En el análisis de comparaciones a pares de F_{st} para el mitotipo F, utilizado para evaluar la diferenciación genética entre poblaciones, se registraron valores muy cercanos a 0 (-0.001 a 0.28). Estos resultados indican una homogeneización considerable entre las localidades analizadas (Tabla 19).

Los resultados del test exacto de diferenciación poblacional mostraron valores cercanos a 0, similares a los obtenidos en la comparación a pares. Sin embargo, se observaron valores estadísticamente significativos entre Punta El Faro, El Túnel y Bufadero (Tabla 19).

Respecto al mitotipo M, la comparación a pares de F_{st} reveló diferenciación genética entre poblaciones en un rango de -0.002 a 0.068 (Tabla 20), sin alcanzar significancia estadística, excepto entre la localidad Punta El Faro y Marcona. Esto confirma la alta homogeneización entre las localidades en el contexto del gen *COI*.

Tabla 18. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de los mitotipos F y M del gen *COI* de 6 poblaciones de *A. atra*.

COI Mitotipo F				
	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	% de variación
Entre poblaciones	5	9.950	0.05437 Va	3.62
Dentro de poblaciones	54	78.100	1.44630 Vb	96.38
Total	59	88.050	1.50067	
Fst = 0.03623				
COI Mitotipo M				
	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	% de variación
Entre poblaciones	5	9.217	0.01285 Va	0.74
Dentro de poblaciones	54	92.600	1.71481 Vb	99.26
Total	59	101.817	1.72767	
Fst = 0.00744				

Tabla 19. Diferenciación genética por pares de F_{st} de las 6 poblaciones de *A. atra* basados en el mitotipo F del gen *COI*.

EST	AN	BU	MA	MS	PF	TN
AN	0					
BU	-0.00629	0				
MA	-0.01794	-0.04301	0			
MS	-0.0179	-0.05243	-0.05023	0		
PF	-0.0011	0.10911*	0.07407	0.09444	0	
TN	0.10066	0.01943	0.01434	0.0387	0.27811*	0

Tabla 20. Diferenciación genética por pares de F_{st} de las 6 poblaciones de *A. atra* basados en el mitotipo M del gen *COI*.

EST	AN	BU	MA	MS	PF	TN
AN	0					
BU	-0.00225	0				
MA	0.03819	0.04337	0			
MS	0.01361	0.01163	-0.01185	0		
PF	-0.00373	-0.0101	0.06832*	0.02006	0	
TN	-0.00229	-0.01595	0	-0.01461	-0.00823	0

5.5.4. Relaciones filogenéticas entre los genes nucleares (*18S* e *ITS-28S*) y mitocondriales (*16S* y *COI*)

La exploración filogenética empleando el método Neighbor Joining (NJ) basado en distancias genéticas del gen *16S* brindó una perspectiva inicial de las relaciones entre los individuos de *A. atra* recolectados de seis localidades en el mar peruano. Se observó una escasa estructuración genética tanto para el mitotipo F (Figura 18) como para el mitotipo M (Figura 19).

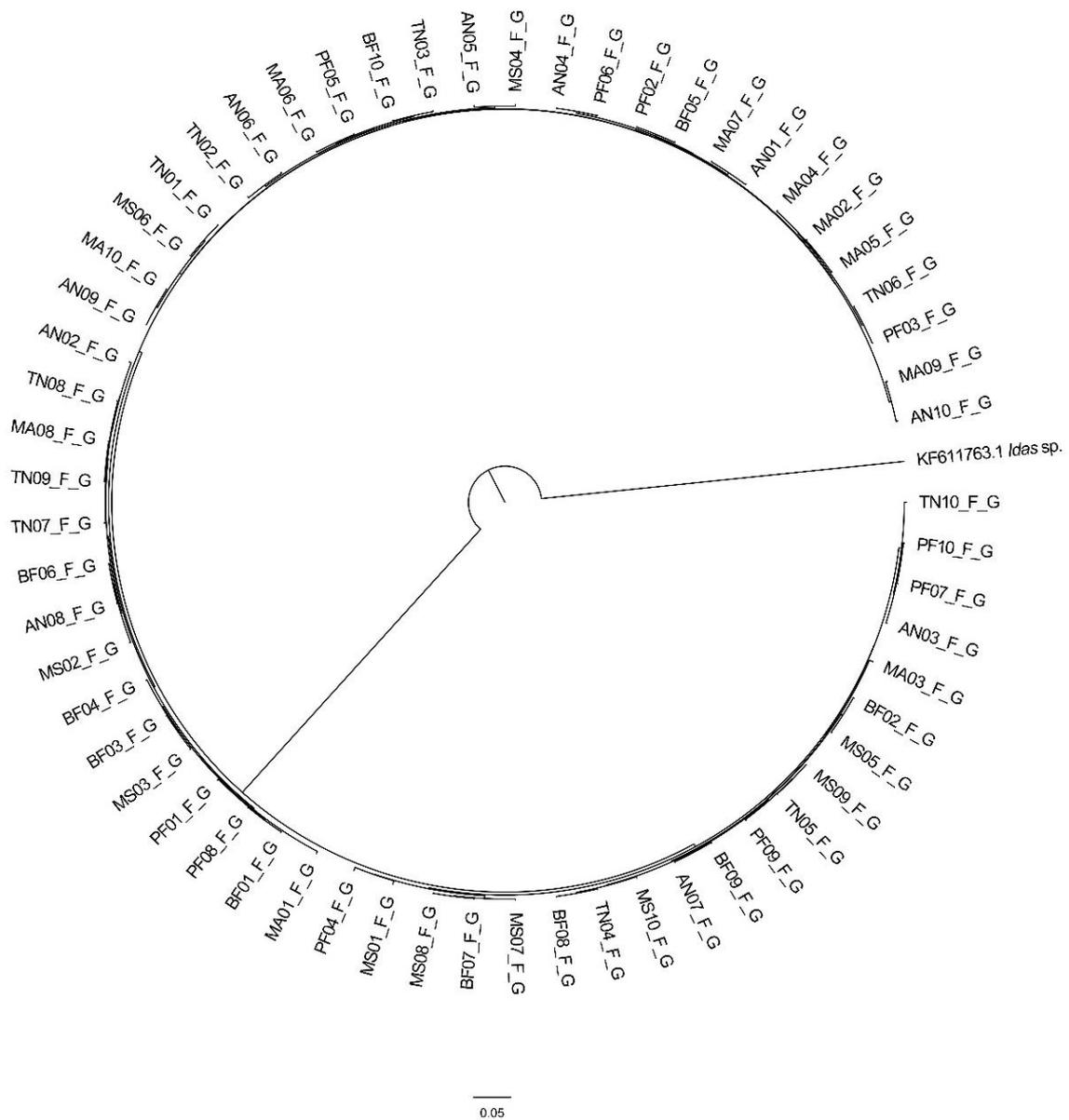


Figura 18. Árbol Neighbor Joining (NJ, modelo JC) basado en el mitotipo F del gen mitocondrial *16S* de 6 poblaciones de *A. atra*.

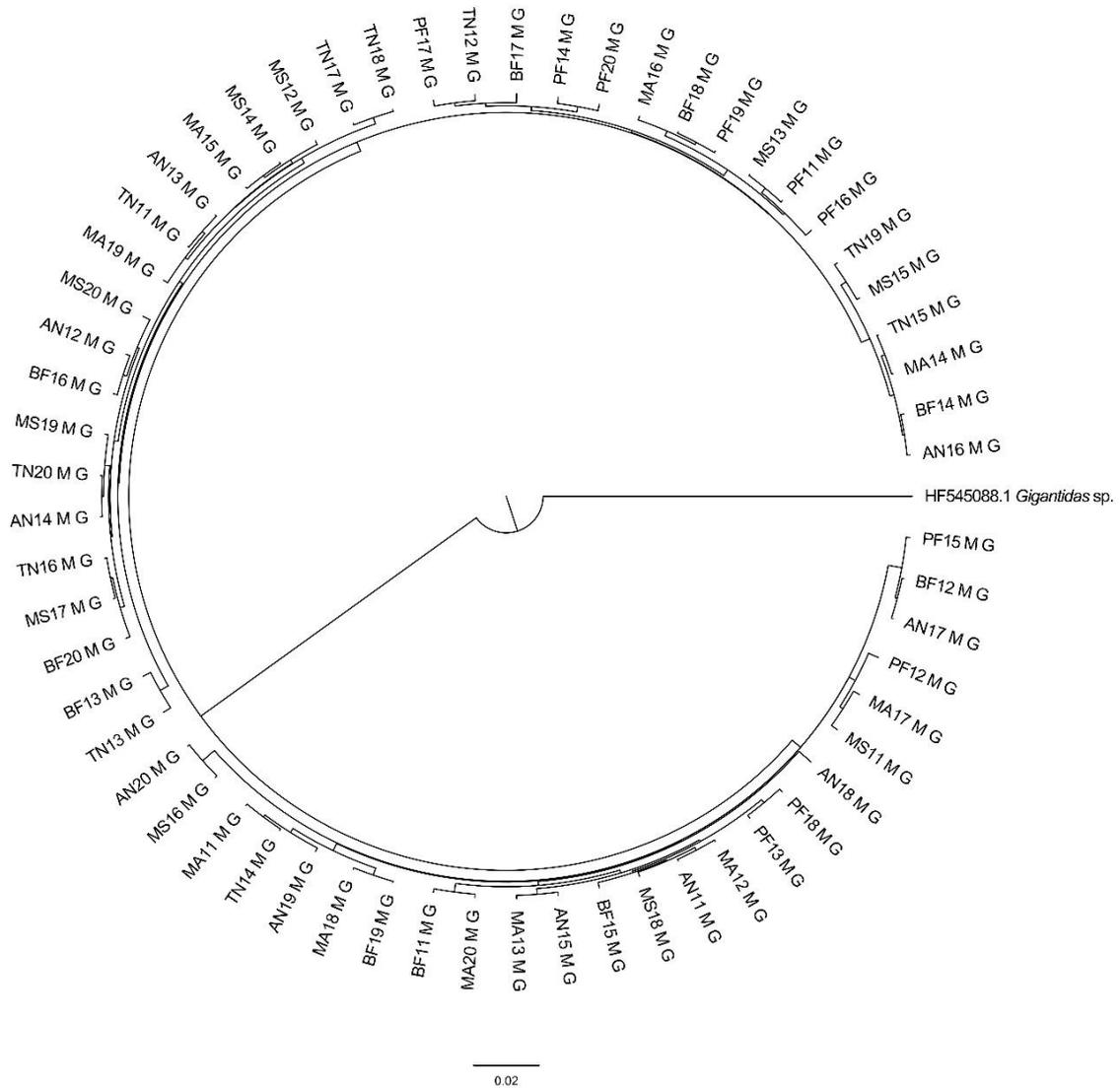


Figura 19. Árbol Neighbor Joining (NJ, modelo JC) basado en el mitotipo M del gen mitocondrial *16S* de 6 poblaciones de *A. atra*.

El análisis filogenético a través del método Neighbor Joining (NJ), fundamentado en distancias genéticas del gen *COI*, proporcionó una primera visión de las interconexiones entre los individuos de *A. atra* obtenidos de seis localidades en el mar peruano. Se evidenció una limitada estructuración genética tanto para el mitotipo F (Figura 20) como para el mitotipo M (Figura 21).

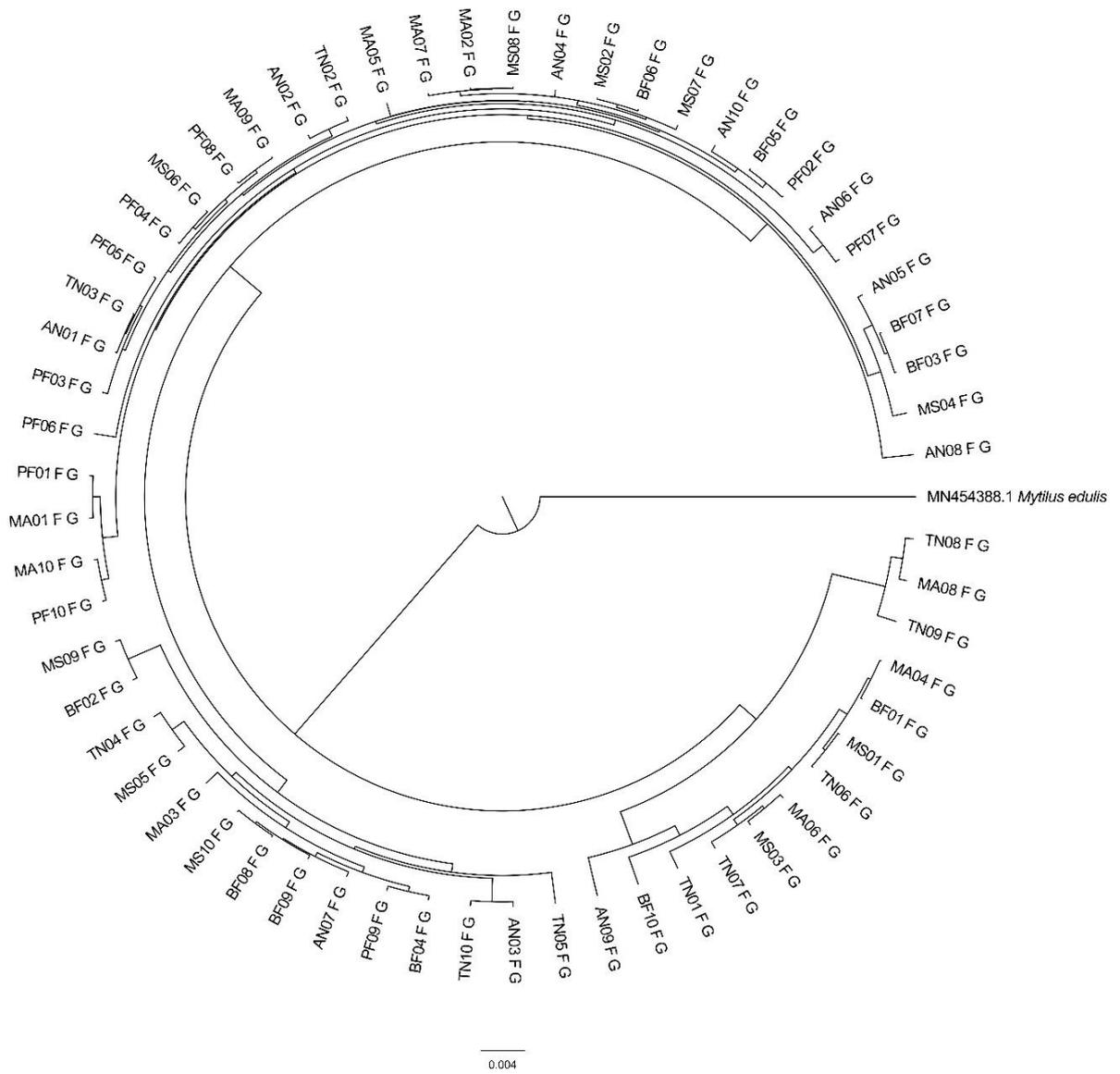


Figura 20. Árbol Neighbor Joining (NJ, modelo JC) basado en el mitotipo F del gen mitocondrial *COI* de 6 poblaciones de *A. atra*.

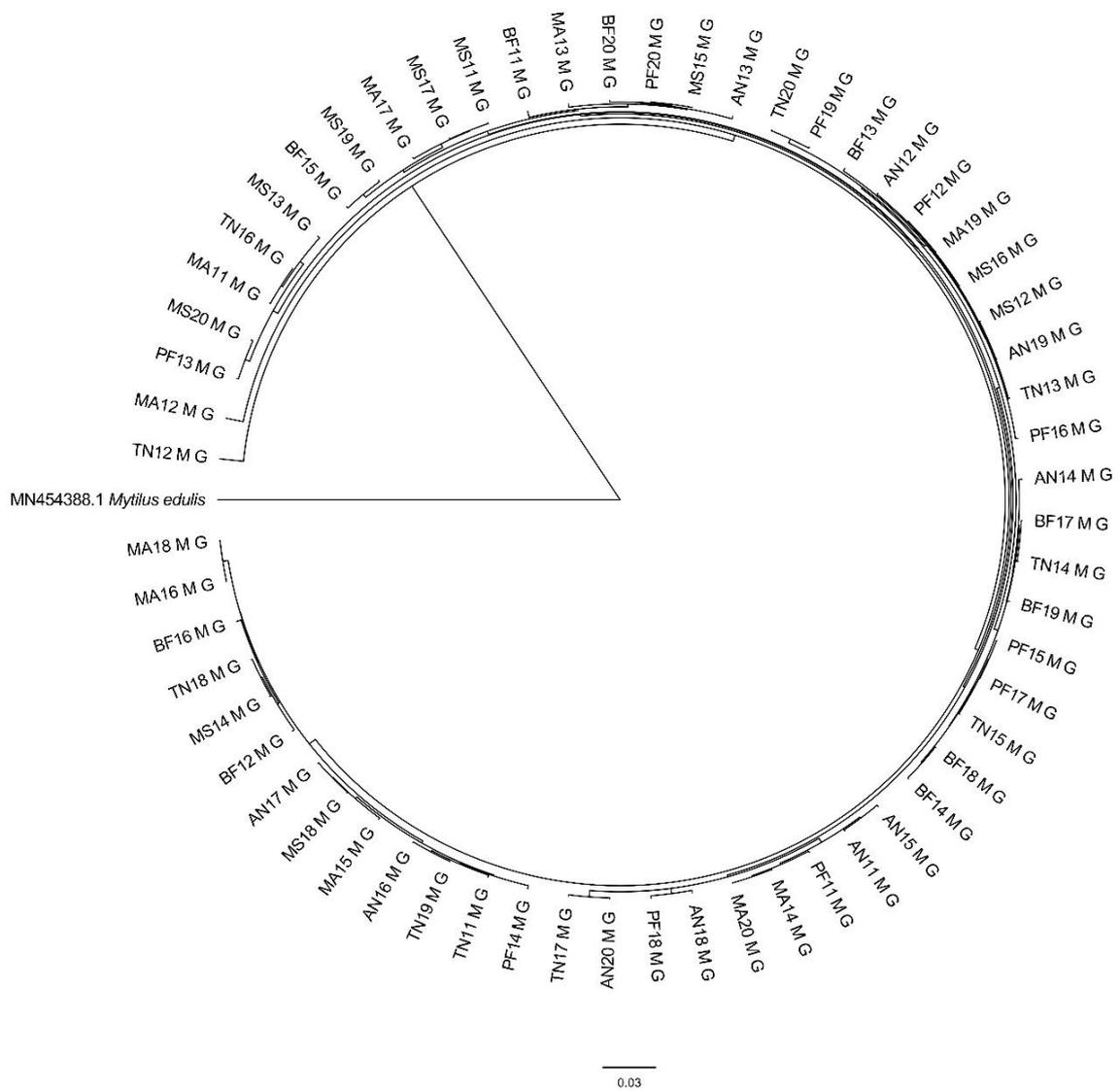


Figura 21. Árbol Neighbor Joining (NJ, modelo JC) basado en el mitotipo M del gen mitocondrial *COI* de 6 poblaciones de *A. atra*.

5.5.5. Historia demográfica de los genes mitocondriales *16S* y *COI*

a) Mitotipos F y M del *16S*

Los resultados medios del test de neutralidad D de Tajima evidenciaron predominantemente valores negativos en el mitotipo F, con la excepción de Punta El Faro, aunque estos no alcanzaron significancia estadística. De manera análoga, el test Fs de Fu mostró valores negativos significativos. En términos generales, ambos tests proporcionaron resultados negativos para la población en su totalidad, indicando un posible proceso de expansión poblacional en el pasado (Tabla 21).

En cuanto al mitotipo M, el test de neutralidad D de Tajima reveló valores negativos en todas las localidades. Asimismo, el test Fs de Fu exhibió valores negativos significativos. Sin embargo, en líneas generales, ambos tests arrojaron resultados negativos para la población completa, sugiriendo un probable proceso de expansión poblacional en el pasado (Tabla 22).

Tabla 21. Test de neutralidad de los haplotipos del mitotipo F del gen *16S* de las poblaciones de *A. atra*.

Gen	Población	Tajima's D	p-valor	Fu's fs	p-valor
<i>16S</i> Mitotipo F	AN	-1.74110	0.01340*	-15.10441	0.00000*
	BF	-0.65748	0.29500	-16.13008	0.00000*
	MA	-1.66706	0.01910*	-16.71536	0.00000*
	MS	-1.13610	0.13270	-13.47291	0.00000*
	PF	1.03527	0.18070	-13.24186	0.00000*
	TN	-1.03527	0.18980	-13.24186	0.00000*
	Media	-1.21205	0.13845	-14.65108	0.00000*

P = p-valor, *Significativo (p-valor <0.05)

Tabla 22. Test de neutralidad de los haplotipos del mitotipo M del gen *16S* de las poblaciones de *A. atra*.

Gen	Población	Tajima's D	p-valor	Fu's fs	p-valor
<i>16S</i> Mitotipo M	AN	-1.49289	0.06570	-13.02028	0.00000*
	BF	-1.57285	0.04460	-12.12438	0.00000*
	MA	-1.27616	0.10530	-12.50366	0.00000*
	MS	-1.87333	0.00790*	-11.94483	0.00000*
	PF	-1.68719	0.03400*	-10.70521	0.00000*
	TN	-1.03446	0.20240	-17.13814	0.00000*
	Media	-1.48948	0.07665	-12.90608	0.00000*

P = p-valor, *Significativo (p-valor <0.05)

b) Mitotipos F y M del gen *COI*

Los resultados promedio del test de neutralidad D de Tajima revelaron predominantemente valores negativos en el mitotipo F, aunque no alcanzaron significancia estadística. De manera similar, todos los valores del test F_s de F_u fueron significativamente negativos (Tabla 23). Respecto al mitotipo M, el test de neutralidad D de Tajima mostró valores negativos en todas las localidades, y el test F_s de F_u exhibió valores negativos significativos (Tabla 24). En términos generales, ambos tests arrojaron resultados negativos para la población completa, sugiriendo un posible proceso de expansión poblacional en el pasado.

Tabla 23. Test de neutralidad de los haplotipos del mitotipo F del gen *COI* de las poblaciones de *A. atra*.

Gen	Población	Tajima's D	p-valor	Fu's fs	p-valor
<i>COI</i> Mitotipo F	AN	-1.57733	0.04700*	-7.90709	0.00010*
	BF	-0.84388	0.21440	-8.04777	0.00010*
	MA	-0.99103	0.17570	-7.80505	0.00000*
	MS	-0.89358	0.19780	-8.62851	0.00000*
	PF	-1.66706	0.01820*	-16.71536	0.00000*
	TN	-0.23384	0.43170	-6.87090	0.00020*
	Media	-1.03445	0.18080	-9.32911	0.00007*

P = p-valor, *Significativo (p-valor <0.05)

Tabla 24. Test de neutralidad de los haplotipos del mitotipo M del gen *COI* de las poblaciones de *A. atra*.

Gen	Población	Tajima's D	p-valor	Fu's fs	p-valor
<i>COI</i> Mitotipo M	AN	-1.63720	0.03950*	-9.36127	0.00000*
	BF	-1.37167	0.09340	-7.57778	0.00010*
	MA	-1.16601	0.12700	-7.27691	0.00000*
	MS	-0.96737	0.19060	-7.77168	0.00000*
	PF	-1.19781	0.12790	-9.72818	0.00000*
	TN	-1.34150	0.08910	-5.66800	0.00210*
	Media	-1.28026	0.11125	-7.89730	0.00037*

P = p-valor, *Significativo (p-valor <0.05)

VI. DISCUSIÓN

La DUI observada destaca un patrón de divergencia mitonuclear característico en algunos moluscos, especialmente en bivalvos marinos. En el caso de esta especie, la presencia de dos linajes mitocondriales (mitotipos F y M) permite que los machos hereden y mantengan ambos mitotipos, mientras que las hembras solo presentan el mitotipo F (Tabla 11 y 12). Este fenómeno ha sido reportado en otros bivalvos como *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*, donde la DUI facilita la existencia de linajes mitocondriales diferenciados entre géneros (Quesada *et al.*, 1996, p. 424; Zouros *et al.*, 1994, p. 7467). La DUI contribuye a una diversidad genética *16S* y *COI* de *A. atra* (Tabla 13 y 14).

En el tejido gonadal de *A. atra*, la DUI se manifiesta de manera específica, con los machos presentando tanto el mitotipo F como el M en una forma heteroplásmica, mientras que las hembras muestran homoplasma con solo el mitotipo F (Figura 11). Este patrón de distribución de mitotipos por género y tejido coincide con lo reportado en estudios previos de bivalvos, donde la DUI asegura la transmisión de ambos linajes en machos (Passamonti y Ghiselli, 2009, p. 81). La homoplasma en hembras puede representar una estrategia evolutiva para reducir la acumulación de mutaciones en el linaje F, ya que la exclusión del mitotipo M en las hembras podría limitar el efecto de mutaciones potencialmente deletéreas en el genoma mitocondrial femenino (Zouros, 2020, p. 2). Asimismo, esta homoplasma en hembras, junto con la presencia exclusiva del mitotipo M en las líneas germinales masculinas, permite una transmisión precisa y selectiva de cada linaje mitocondrial en función del sexo, lo que resulta en una estabilidad genética que contribuye a la viabilidad de las poblaciones (Kenchington *et al.*, 2009, p. 1).

Además, en el tejido somático de machos, la presencia heteroplásmica de ambos mitotipos refuerza la teoría de que la DUI en *A. atra* está asociada a la expresión de funciones diferenciadas entre los linajes F y M (Tabla 9 y 10). Este hallazgo es común en bivalvos que presentan DUI, donde los dos mitotipos coexisten en tejidos no reproductivos de los machos, probablemente para diversificar la capacidad metabólica en función de las necesidades fisiológicas del organismo (Milani *et al.*, 2014, p. 8; Stewart *et al.*, 2020, p. 317; Zouros, 2020, p. 6). En el caso de *A. atra*, esta heteroplasma podría ser crucial en su adaptación a ambientes marinos diversos, optimizando el metabolismo en respuesta a variaciones de temperatura y disponibilidad de nutrientes.

Los análisis de los genes mitocondriales *16S* y *COI* en *A. atra* revelaron la presencia de dos linajes mitocondriales distintivos, denominados Mitotipo F y Mitotipo M, los cuales fueron

asociados al género de los organismos. La existencia de estos dos linajes en bivalvos se ha documentado en otras investigaciones, sugiriendo un patrón de doble herencia uniparental (DUI) característico de varios bivalvos como *Brachidontes exustus*, *Geukensia demissa*, *Mytella charuana*, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Perumytilus purpuratus* (Lee y Foighil, 2004, p. 3539; Hoeh *et al.*, 1996, p. 2280; Alves *et al.*, 2012, p. 176; Vargas *et al.*, 2015, p. 173; Quesada *et al.*, 1996, p. 424; Zouros *et al.*, 1994, p. 7467). La divergencia genética entre los linajes en *A. atra* se evidencia en las distancias genéticas obtenidas para los genes *16S* y *COI*, alcanzando un 11.75% y un rango entre 17.09% y 19.35%, respectivamente. Estos valores son comparables a los reportados para otros moluscos marinos con DUI (Doucet-Beaupré *et al.*, 2010, p. 4), lo cual refuerza la hipótesis de una diferenciación significativa en los linajes de *A. atra*.

Asimismo, la diferencia en la variabilidad entre el ADNmt y el ADNn permite inferir que ambos responden de manera distinta frente a las presiones selectivas y las condiciones ecológicas locales. Por ejemplo, la dispersión larval de *A. atra*, facilitada por las corrientes oceánicas peruanas, podría ser el factor responsable de la homogeneización genética del ADN nuclear, permitiendo un intercambio de genes constante entre poblaciones a lo largo del litoral como ya se ha observado en *Argopecten purpuratus* (Carranza, 2017, p. 42).

A pesar de la homogeneidad observada en el ADN nuclear, el análisis de los mitocondriales *16S* y *COI* mostró una diversidad genética más diversa, caracterizada por la coexistencia de dos mitotipos (F y M) y una heteroplasmia en el tejido somático de los machos (Tabla 5 y 6). Esta divergencia entre el ADN mitocondrial y nuclear en *A. atra* indica que el genoma mitocondrial puede experimentar procesos de evolución distintos a los del ADN nuclear, favoreciendo una alta variabilidad genética mitocondrial que no se refleja en el núcleo. Este patrón puede deberse a que el ADN mitocondrial, al estar sujeto a diferentes presiones selectivas y tasas de mutación, tiende a acumular más variación, particularmente en genes involucrados en funciones metabólicas como el *COI* y el *16S*, esenciales para la adaptación a diversas condiciones ambientales (Fourdrilis *et al.*, 2018, p. 8; Ghiselli *et al.*, 2021, p. 5).

En contraste, los análisis del ADN nuclear evidencian una notable estabilidad genética, incluso entre poblaciones separadas por grandes distancias geográficas. La diversidad genética nuclear de los genes *18S* e *ITS-28S* de *Aulacomya atra* mostraron un patrón de homogeneidad genética entre poblaciones geográficamente distantes, como Tacna e Ica, ubicadas a más de 400 km de distancia (Figura 9 y 10). En el caso del gen *18S*, los resultados mostraron distancias genéticas nulas entre las secuencias analizadas, apoyando la presencia

de un solo grupo genético en las poblaciones estudiadas (Figura 9). Este patrón es consistente con lo observado en *Donax vittatus*, donde de un alineamiento de 1707 bp de 135 individuos, todas las secuencias eran idénticas (Fernández-Pérez *et al.*, 2017, p. 130). Estos hallazgos sugieren una baja diferenciación genética, lo que indica una alta conectividad entre poblaciones de diferentes localidades geográficas.

Para el gen *ITS-28S*, el análisis también evidenció un único grupo genético que incluye tanto poblaciones locales como extranjeras (Nueva Zelanda y Sudáfrica), lo que refuerza la idea de conectividad genética a escala global para *A. atra*. Este patrón es consistente con el estudio de Grobler *et al.* (2023, p. 33), donde se observó que el gen ITS presenta escasa variación entre individuos de *A. atra* a lo largo de la costa sudafricana, sugiriendo que las poblaciones de esta especie muestran una alta conectividad y poca diferenciación genética a pesar de las distancias geográficas.

La ausencia de diversidad genética nuclear en los genes *18S* e *ITS-28S* destaca como un hallazgo relevante que contrasta con la considerable diversidad observada en los genes mitocondriales (Anexo 1). Esta baja tasa de variación probablemente se deba a su función conservadora en el ribosoma y en la síntesis proteica, donde la estabilidad evolutiva es crucial para el mantenimiento de funciones esenciales, como la traducción genética, la cual depende en gran medida de la preservación de las secuencias y estructuras del ARN ribosomal a lo largo del tiempo (Fox, 2010, p. 9).

Este hallazgo es consistente con estudios previos en bivalvos marinos, en los cuales se ha observado que estos genes nucleares tienen una baja tasa de mutación, lo que limita su variabilidad genética y los hace menos útiles para detectar diferenciación poblacional, pero pueden ser utilizados para estudios filogenéticos de especies de la familia Mytilidae (Distel, 2000, p. 26; Goto *et al.*, 2011, p. 569; Westfall y Gardner, 2010, p. 900). En el caso de *A. atra*, la falta de diversidad en estos genes nucleares refuerza la idea de que la especie mantiene una base genética conservadora a nivel nuclear.

Este fenómeno de flujo génico, que es común en especies marinas con fases larvales plantónicas, contribuye a reducir la diferenciación genética y a mantener una estructura poblacional homogénea, como se ha documentado en otros bivalvos de amplia distribución geográfica (Hellberg *et al.*, 2002, p. 278; Dudgeon *et al.*, 2012, p. 1822). Por lo tanto, la ausencia de diferenciación en los genes *18S* e *ITS-28S* respalda la hipótesis de una alta conectividad genética en las poblaciones de *A. atra* en el litoral peruano.

Los resultados obtenidos sugieren que el uso de genes nucleares de evolución lenta, como el *18S* y el *ITS-28S*, pueden no ser suficientes para captar variaciones genéticas en poblaciones conectadas de *A. atra*, donde los eventos evolutivos recientes quedan mejor reflejados en el ADNmt. Esta limitación de los marcadores nucleares en reflejar la diversidad genética reciente se complementa con los patrones observados en el ADN mitocondrial, donde la doble herencia uniparental (DUI) en *A. atra* muestra una divergencia mitonuclear que aporta información valiosa sobre la variabilidad genética entre linajes F y M. Por ello, la incorporación de marcadores moleculares más polimórficos, como microsatélites o SNPs, podría permitir una caracterización más precisa de la variabilidad genética y la estructura poblacional de *A. atra*, especialmente en contextos donde la diferenciación es sutil o reciente (Audzijonyte y Vrijenhoek, 2010, p. 204; Wei *et al.*, 2023, p. 2; Xu *et al.*, 2016, p. 17).

En este contexto, el análisis de la divergencia genética en el ADN mitocondrial proporciona una perspectiva crucial sobre los patrones evolutivos de la especie. La divergencia genética entre los mitotipos F y M en los genes *16S* y *COI* es significativa, con una diferencia del 11.3% y 23.4% respectivamente, lo cual subraya la conservación evolutiva de estos linajes en *A. atra* (Figura 7 y 8). Esta diferenciación podría estar favorecida por la DUI, al permitir que cada linaje evolucione bajo diferentes presiones selectivas. La DUI, al preservar estos mitotipos diferenciados, podría ser una respuesta adaptativa en bivalvos, aumentando la variabilidad genética sin comprometer la estabilidad genética de las poblaciones (Zouros y Rodakis, 2019, p. 16).

Los resultados de diversidad genética entre los linajes F y M en *A. atra* también revelaron diferencias significativas. El análisis de diversidad haplotípica y nucleotídica muestra una mayor diversidad en el mitotipo M (Figura 15 y 17), lo que sugiere una mayor variabilidad genética en los machos de la población. Este patrón también ha sido observado en otros bivalvos, y algunos autores han propuesto que la mayor diversidad en el linaje M podría estar asociada a una mayor acumulación de mutaciones en comparación con el linaje F (Hoeh *et al.*, 2002, p. 2253; Theologidis *et al.*, 2008, p. 967).

En el caso de *A. atra*, el análisis de diversidad en el gen *16S* mostró niveles elevados de diversidad haplotípica en el mitotipo F, con valores que oscilaron entre 0.5333 y 0.8667, y en el mitotipo M, con valores que variaron de 0.6444 a 0.9778. Esta variabilidad genética podría estar influenciada por el sistema de corrientes oceánicas y la dispersión larval, factores que facilitan el flujo génico entre poblaciones locales y contribuyen a la diversidad observada en el genoma mitocondrial de esta especie (Mathiesen *et al.*, 2016, p. 49).

Este patrón de alta diversidad haplotípica en el gen *16S* es comparable con los resultados de otros bivalvos de la región. En *Argopecten purpuratus*, la diversidad haplotípica también alcanzó valores significativos, con un promedio de 0.8069, aunque acompañado de una baja diversidad nucleotídica de 0.0032, lo cual ha sido interpretado como evidencia de un evento de expansión poblacional tras un cuello de botella (Carranza, 2017). Este fenómeno de alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica sugiere que las poblaciones de *A. atra* han experimentado patrones demográficos similares, donde la colonización de nuevas áreas seguida de la dispersión larval permite la retención de mutaciones en nuevas generaciones, contribuyendo a su expansión genética (Grobler *et al.*, 2023, p. 36).

El análisis del gen *COI* en *A. atra* respalda y amplía estos hallazgos, al mostrar aún mayores valores de diversidad haplotípica, alcanzando un máximo de 1.000 en el mitotipo M en algunas localidades y de 0.5333 a 0.9778 en el mitotipo F. La alta variabilidad observada en el gen *COI* ha sido vinculada, en otras especies, con una mayor tasa de mutación y eventos históricos de colonización múltiple, lo que facilita la acumulación de variación genética (Larraín *et al.*, 2012, p. 1079; Wang *et al.*, 2017, p. 6). Esto concuerda con la estructura en forma de estrella en las redes de haplotipos del gen *COI* de *A. atra*, un patrón característico de expansión demográfica reciente que también se ha reportado en especies de la clase Mytilidae (Martínez *et al.*, 2015, p. 11; Ni *et al.*, 2015, p. 12; Wang *et al.*, 2017, p. 6).

Los índices de diversidad nucleotídica también mostraron diferencias leves entre mitotipos. En el gen *16S*, el mitotipo F tuvo una diversidad nucleotídica promedio de 0.00285, mientras que el mitotipo M alcanzó 0.00374. En el caso del gen *COI*, los valores fueron de 0.00609 en el mitotipo F y de 0.00704 en el mitotipo M. Esta tendencia a una mayor diversidad en el mitotipo M sugiere una variabilidad genética que podría estar influenciada por la selección natural y la dispersión de larvas en ambientes marinos diversos (Grobler *et al.*, 2023, p. 33). En otras especies de bivalvos, como *Mytilus edulis*, se observa un patrón similar de diversidad genética entre mitotipos que destaca la influencia de factores ambientales y procesos históricos en la diversificación mitogenómica (Zouros, 2020, p. 5).

Por último, la proporción de haplotipos privados en ambas poblaciones y genes refuerza la idea de una diferenciación genética local significativa en *A. atra*, a pesar de la falta de barreras geográficas claras. En los estudios realizados en *A. atra* de la costa de Sudáfrica, Grobler *et al.* (2023, p. 34) también identificaron altos niveles de diversidad haplotípica con valores de 0.961 a 0.984, lo cual indica que la especie mantiene una variabilidad considerable dentro de sus poblaciones, posiblemente debido a factores de selección local o presiones

ambientales específicas que favorecen la retención de diversidad genética. Esta variabilidad genética, además, podría ser clave para la capacidad adaptativa de la especie frente a fluctuaciones ecológicas.

Sin embargo, esta diversidad no parece traducirse en una estructuración genética marcada entre poblaciones distantes. El hecho de que no se observe una estructuración genética notable entre poblaciones de *A. atra*, pese a la existencia de DUI, sugiere que la dispersión larval y el flujo genético pueden estar mitigando la diferenciación genética esperada en presencia de DUI (Dudgeon *et al.*, 2012, p. 1822). En *A. atra*, esta dinámica parece prevalecer, considerando que las corrientes oceánicas peruanas facilitarían la dispersión de larvas, permitiendo que los linajes mitocondriales F y M se distribuyan ampliamente a lo largo de la costa peruana (Carranza, 2017, p. 47; Tarazona *et al.*, 2003, p. 218).

Al analizar la estructura genética de los mitotipos F y M mediante el método Maximum Likelihood (ML), se evidenció una clara separación entre los linajes F y M (Figura 12 y 13). Las hembras de *A. atra* presentan exclusivamente el Mitotipo F en ambos tipos de tejidos analizados (gonadal y somático), mientras que en los machos se observa la coexistencia de los mitotipos F y M, un patrón de heteroplasmia que ha sido descrito previamente en especies de bivalvos con DUI (Gusman *et al.*, 2016, p. 9). Este hallazgo es consistente con otros estudios que sugieren que el mitotipo M se transmite de forma exclusiva a los machos, mientras que el mitotipo F se hereda tanto en machos como en hembras (Passamonti y Ghiselli, 2009, p. 80).

La baja estructura genética observada en el análisis de AMOVA (Tabla 7 y 8) y los valores de F_{st} (Figura 15, 16, 17 y 18) indican una homogeneización genética considerable en las poblaciones de *A. atra* a lo largo de su distribución geográfica. Este fenómeno puede explicarse por el alto flujo génico entre las poblaciones, lo que ha sido observado también en otros bivalvos. En el caso de *A. purpuratus*, Carranza (2017) también reportó una baja estructuración genética, sugiriendo que las poblaciones de bivalvos en el litoral peruano podrían estar influenciadas por factores ambientales y oceanográficos que favorecen la conectividad genética.

La dispersión larval facilitada por corrientes oceánicas, junto con la diversidad genética observada, puede ofrecer ventajas adaptativas en especies como *A. atra*. La literatura sugiere que la dispersión en ambientes marinos influye considerablemente en la conectividad genética entre poblaciones, ya que las larvas planctónicas tienen mayores posibilidades de

colonizar nuevos hábitats y diversificarse en respuesta a variaciones ambientales (Tarazona *et al.*, 2003, p. 207; Feral, 2001, p. 138). En el caso de *A. atra*, las altas proporciones de haplotipos observadas en el mitotipo F y M del gen *16S* pueden ser el resultado de esta dispersión, un patrón que coincide con lo reportado en otros bivalvos marinos como *Mytilus edulis*, donde la diversidad haplotípica alcanza valores elevados debido a la gran conectividad entre sus poblaciones (Uribe *et al.*, 2019, p. 333).

Finalmente, la coexistencia de linajes mitocondriales diferenciados en los machos y la homoplasmia en las hembras subraya el papel de la DUI en la dinámica genética de *A. atra*. Este mecanismo podría ser ventajoso para la especie en contextos de alta conectividad genética y baja estructura poblacional como en el presente estudio. La selección de linajes específicos en machos y hembras contribuye a una estrategia adaptativa única, en la que la diferenciación mitocondrial por género asegura una diversificación genética a nivel mitonuclear. Esta particularidad genética refuerza la capacidad de la especie para adaptarse a entornos diversos, representando un aspecto clave en su ecología y evolución.

A este panorama se suma la información filogenética obtenida a partir de los marcadores mitocondriales y nucleares. La reconstrucción filogenética basada en los genes mitocondriales mostró agrupaciones claras entre los mitotipos F y M, lo que indica relaciones evolutivas diferenciadas entre linajes, posiblemente moldeadas por la adaptación a condiciones ambientales específicas (Doucet-Beaupré *et al.*, 2010, p. 4). En contraste, los análisis filogenéticos de los genes nucleares no evidenciaron agrupaciones significativas según la distribución geográfica, respaldando una conectividad genética alta en *A. atra* a lo largo de su rango de distribución en el litoral peruano (Grobler *et al.*, 2023, p. 36; Carranza, 2017, p. 42).

Estas diferencias destacan la utilidad complementaria de los marcadores mitocondriales y nucleares para inferir procesos evolutivos en especies marinas. Mientras que los mitocondriales permiten identificar eventos recientes de expansión y divergencia, los nucleares revelan patrones de estabilidad genética a largo plazo. Esta dualidad proporciona una comprensión más integral de la dinámica filogenética de *A. atra*, al combinar perspectivas temporales que abarcan tanto cambios históricos como contemporáneos.

En este contexto, los resultados obtenidos para los genes mitocondriales *16S* y *COI* aportan evidencia significativa sobre los eventos demográficos recientes que han dado forma a las poblaciones de la especie. Los análisis realizados sugieren una historia demográfica marcada

por expansiones poblacionales recientes, lo cual es apoyado por la estructura en forma de estrella de las redes haplotípicas para los mitotipos F y M. Además, los valores elevados de diversidad haplotípica, en combinación con niveles moderados de diversidad nucleotídica, refuerzan esta hipótesis (Grobler *et al.*, 2023, p. 33; Zouros, 2020, p. 6). Estos patrones son característicos de especies marinas que han experimentado procesos de recolonización tras eventos demográficos disruptivos.

Un ejemplo similar puede observarse en *Argopecten purpuratus*, una especie que comparte hábitats marinos con *A. atra*. En este caso, se han reportado altos valores de diversidad haplotípica (0.8069) y bajos de diversidad nucleotídica (0.0032), los cuales han sido atribuidos a expansiones postcuello de botella, posiblemente facilitadas por eventos climáticos como "El Niño" (Carranza, 2017, p. 42). Esto sugiere que los eventos climáticos extremos pueden actuar como catalizadores de cambios demográficos en bivalvos, promoviendo la recolonización de hábitats previamente afectados y, en consecuencia, moldeando la estructura genética de sus poblaciones.

VII. CONCLUSIONES

- Se confirmó la presencia de DUI en *A. atra*, observándose dos linajes mitocondriales diferenciados, el mitotipo F y el mitotipo M, con una clara asociación entre estos mitotipos y el género de los individuos, como se ha documentado en otros bivalvos con DUI.
- Se identificó la presencia de heteroplasma en el tejido somático (músculo aductor) de machos de *A. atra*, con la coexistencia de los mitotipos F y M en los genes *16S* y *COI*.
- Los análisis de diversidad haplotípica y nucleotídica mostraron una alta variabilidad genética en las poblaciones de *A. atra*, particularmente en el mitotipo M, lo cual sugiere que la especie posee una gran capacidad de adaptación.
- A pesar de la presencia de DUI, no se detectó una estructura poblacional significativa en *A. atra* a lo largo del litoral peruano.
- El análisis filogenético y de la estructura genética a partir de los marcadores mitocondriales y nucleares indicó una expansión demográfica reciente, respaldada por la forma de estrella en las redes de haplotipos del gen *COI*.

VIII. RECOMENDACIONES

- Debido a la alta conectividad genética entre las poblaciones y la importancia de la diversidad genética para la adaptación de la especie, es esencial implementar estrategias de monitoreo continuo de las poblaciones de *A. atra*. La conservación de sus hábitats y la gestión sostenible de sus recursos marinos contribuirán a mantener su capacidad adaptativa frente a cambios ambientales.
- Se recomienda realizar estudios adicionales utilizando microsatélites o SNPs para analizar con mayor precisión la diversidad genética y la estructura poblacional de *A. atra*. Estos marcadores permitirían evaluar mejor el flujo génico, la conectividad entre poblaciones y las barreras genéticas, proporcionando información clave sobre cómo los factores ambientales y oceanográficos, como las corrientes marinas, influyen en la dispersión larval y la respuesta de la especie a presiones selectivas locales.
- Se recomienda llevar a cabo estudios adicionales sobre la heteroplasmia en el tejido somático de machos de *A. atra* utilizando técnicas como qPCR para cuantificar la abundancia relativa de los mitotipos F y M en diferentes tejidos somáticos. Además, el análisis del mitogenoma completo podría proporcionar una visión más detallada de la estructura genética de los mitotipos, su interacción y posibles diferencias evolutivas en la dinámica de la DUI, lo que contribuiría a comprender mejor el papel de la heteroplasmia en la adaptación de la especie a su entorno.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrews, K., y Luikart, G. (2014). Recent novel approaches for population genomics data analysis. *Molecular Ecology*, 23, 1661-1667. <https://doi.org/10.1111/mec.12686>
- Avendaño, M., y Cantillánez, M. (2014). Reproductive cycle of *Aulacomya ater* [Bivalvia: Mytilidae (Molina 1782)] in Punta Arenas Cove (Antofagasta Region, Chile). *Aquaculture International*, 22, 1229-1244. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9743-5>
- Ballard, J., y Whitlock, M. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13, 729-744. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x>
- Bespalaya, Y., Bolotov, I., Aksenova, O., Gofarov, M., Kondakov, A., Vikhrev, I., y Vinarski, M. (2017). DNA barcoding reveals invasion of two cryptic *Sinanodonta mussel* species (Bivalvia: Unionidae) into the largest Siberian river. *Limnologica*, 69, 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.11.009>
- Breton, S., Doucet, H., Stewart, D., Hoeh, W., y Blier, P. (2007). The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough? *TRENDS in Genetics*, 23(9), 465-474. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.05.011>
- Breton, S., Stewart, D., Shepardson, S., Trdan, R., Bogan, A., Chapman, E., Ruminas, A., Piontkivska, H., y Hoeh, W. (2011). Novel protein genes in animal mtDNA: A new sex determination system in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida)? *Mol. Biol. Evol.*, 28(5), 1645-1659. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq345>
- Cao, L., Kenchington, E., y Zouros, E. (2004). Differential segregation patterns of sperm mitochondria in embryos of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Genetics*, 166, 883-894. <https://doi.org/10.1534/genetics.166.2.883>
- Caza, F., Cledon, M., y St-Pierre, Y. (2016). Biomonitoring climate change and pollution in marine ecosystems: A review on *Aulacomya ater*. *Journal of Marine Biology*, 2016, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2016/7183813>
- Cheng, H-L., Xia, D-Q., Wu, T-T., Meng, X-P., Ji, H-J., y Dong, Z-G. (2006). Study on sequences of ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers of clams belonging to the Veneridae family (Molusca: Bivalvia). *Acta Genetica Sinica*, 33(8), 702-710. [http://dx.doi.org/10.1016/s0379-4172\(06\)60102-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0379-4172(06)60102-9)
- Combosch, D., y Giribet, G. (2015). Clarifying phylogenetic relationships and the

- evolutionary history of the bivalve order Arcida (Mollusca: Bivalvia: Pteriomorpha). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2015, 1-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.09.016>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., y Posada, D. (2012). JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Dégletagne, C., Abele, D., Glockner, G., Alric, B., Gruber, H., y Held, C. (2021). Presence of male mitochondria in somatic tissues and their functional importance at the whole animal level in the marine bivalve *Arctica islandica*. *Communications Biology*, 4, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02593-1>
- Diaz, A., y Ortlieb, L. (1993). El fenómeno El Niño y los moluscos de la costa peruana. *Bulletin de l'Institut Français d'Études Andines*, 22(1), 159-178. <https://doi.org/10.3406/bifea.1993.1109>
- Dos Santos, F., Beasley, C., Hoeh, W., Da Rocha, R., Lopes, L., y Tagliaro, C. (2012). Detection of mitochondrial DNA heteroplasmy suggests a doubly uniparental inheritance pattern in the mussel *Mytella charruana*. *Brazilian Journal of Biosciences*, 10(2), 176-185.
- Dragomir-Cosmin, D., y Dario, S. (2011). Molecular approaches to bivalve population studies: a review. *The scientific annals of the "Alexandru Ioan Cuza"*, 12, 1-14.
- Elderkin, C., Clewing, C., Ndeo, O., y Albrecht, C. (2016). Molecular phylogeny and DNA barcoding confirm cryptic species in the African freshwater oyster *Etheria elliptica* Lamarck, 1807 (Bivalvia: Etheriidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 118, 369-381. <https://doi.org/10.1111/bij.12734>
- Excoffier, L., Smouse, P., y Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131,479–491. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>
- Excoffier, L., y Lischer, H. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analysis under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.*, 10, 564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Féral, J-P. (2002). How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 268, 121-

145. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00382-3](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00382-3)

- Fernández-Pérez, J., Froufe, E., Nantón, A., Gaspar, M., y Méndez, J. (2017). Genetic diversity and population genetic analysis of *Donax vittatus* (Mollusca: Bivalvia) and phylogeny of the genus with mitochondrial and nuclear markers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 197, 126-135. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.08.032>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., y Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.
- Fu, YX. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-25. <https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.915>
- Gallagher, S. (2017). Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current Protocols in Immunology*, 116, 1-14. <https://doi.org/10.1002/cpim.20>
- Gandra, M., Assis, J., Martins, M., y Abecasis, D. (2020). Reduced global genetic differentiation of exploited marine fish species. *Mol. Biol. Evol.*, 38(4), 1402-1412. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa299>
- García, E. (2015). Determinación de la mortalidad total del choro (*Aulacomya ater*) en la región Lima Callao. Universidad Nacional del Callao.
- Garland, E., y Zimmer, C. (2002). Techniques for the identification of bivalve larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 255, 299-310. <https://doi.org/10.3354/MEPS225299>
- Giribet, G., y Wheele, W. (2002). On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology*, 121(4), 271-324. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2002.tb00132.x>
- Gissi, C., Iannelli, F., y Pesole, G. (2008). Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, 101, 301-320. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.62>
- Gonzales, A., y Espinoza, L. (2020). Efecto de la pesca artesanal de *Aulacomya atra* (Mollusca: Mytilidae) en la sostenibilidad del recurso. *Avances*, 22(1), 64-80.
- Grobler, J., Zhao, Z., Jones, J., y Kotze, K. (2023). Magellan mussels *Aulacomya atra* from

the South African coast show high diversity within populations but a lack of geographic differentiation. *African Journal of Marine Science*, 45(1), 29-37. <https://doi.org/10.2989/1814232X.2023.2185680>

Guzmán, N., Saá, S., y Ortlieb, L. (1998). Catálogo descriptivo de los moluscos litorales (Gastrópoda y Pelecypoda) de la zona de Antofagasta, 23°S (Chile). *Estud. Oceanol*, 17, 17-86.

Harpending, H. C. (1994). Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66(4), 591–600.

Hedgecock, D. (1986). Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? *Bulletin of Marine Science*, 39(2), 550-564.

Hedgecock, D., y Pudovkin, A. (2011). Sweepstakes reproductive success in highly fecund marine fish and shellfish: a review and commentary. *Bulletin of marine science*, 87(4), 971-1002. <http://dx.doi.org/10.5343/bms.2010.1051>

Hellberg, M. (1996). Dependence of gene flow on geographic distance in two solitary corals with different larval dispersal capabilities. *Evolution*, 50(3), 1167-1175. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb02357.x>

Hoeh, W., Stewart, D., Sutherland, B., y Zouros, E. (1996). Multiple origins of gender-associated mitochondrial DNA lineages in bivalves (Mollusca: Bivalvia). *Evolution*, 50(6), 2276-2286. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb03616.x>

Hummel, H., Sokolowski, A., Bogaards, R., y Wolowicz, M. (2000). Ecophysiological and Genetic Traits of the Baltic Clam *Macoma balthica* in the Baltic: Differences between Populations in the Gdansk Bay Due to Acclimatization or Genetic Adaptation? *International Review of Hydrobiology*, 85(5-6), 621–637. [https://doi.org/10.1002/1522-2632\(200011\)85:5/6<621::aid-iroh621>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/1522-2632(200011)85:5/6<621::aid-iroh621>3.0.co;2-f)

IMARPE. (2015). Guía de campo ilustrada para reconocimiento de especies de moluscos bivalvos con valor comercial. Instituto del Mar del Perú. Callao, Perú.

IMARPE. (2018). Estado de la pesquería del recurso choro *Aulacomya atra* (Molina 1872). Instituto del Mar del Perú. Callao, Perú.

Incio, A. (2018). Desarrollo gonadal y escala de madurez de *Aulacomya atra* (Bivalvia: Mytilidae) durante el año 2014, en el litoral de Ilo, Moquegua. Universidad Científica del Sur. Lima, Perú.

- Kallersjo, M., Proschwitz, T., Lundberg, S., Eldenas, P., y Erseus, C. (2005). Evaluation of *ITS* rDNA as a complement to mitochondrial gene sequences for phylogenetic studies in freshwater mussels: an example using Unionidae from north-western Europe. *Zoologica Scripta*, 34(4), 415–424. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-6409.2005.00202.x>
- Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T., Crozier, W., y Prodohl, P. (2013). diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 782-788. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067>
- Kijewski, T., Śmietanka, B., Zbawicka, M., Gosling, E., Hummel, H., y Wenne, R. (2011). Distribution of *Mytilus* taxa in European coastal areas as inferred from molecular markers. *Journal of Sea Research*, 65, 224-234. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2010.10.004>
- Kronholm, I., Loudet, O., y de Meaux, J. (2010). Influence of mutation rate on estimators of genetic differentiation: Lessons from *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genetics*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-33/COMMENTS>
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 33, 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kyle, C., y Boulding, E. (2000). Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina* spp.) with and without pelagic larval dispersal. *Marine Biology*, 137, 835-845. <https://doi.org/10.1007/s002270000412>
- Kyriakou, E., Kravariti, L., Vasilopoulos, T., Zouros, E., y Rodakis, G. (2015). A protein binding site in the M mitochondrial genome of *Mytilus galloprovincialis* may be responsible for its paternal transmission. *Gene*, 40296, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.047>
- Larraín, M., Díaz, N., Lamas, C., Uribe, C., Jilberto, F., y Araneda, C. (2015). Heterologous microsatellite-based genetic diversity in blue mussel (*Mytilus chilensis*) and differentiation among localities in southern Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(5), 998-1010. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue5-fulltext-20>
- Larraín, M., Díaz, N., Lamas, C., Vargas, C., y Araneda, C. (2012). Genetic composition of

- Mytilus species in mussel populations from southern Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(4), 1077-1084. <https://doi.org/10.3856/vol40-issue4-fulltext-23>
- Lee, T., y Foighil, Ó. (2004). Hidden Floridian biodiversity: mitochondrial and nuclear gene trees reveal four cryptic species within the scorched mussel, *Brachidontes exustus*, species complex. *Molecular Ecology*, 13, 3527-3542. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02337.x
- Leigh, J. W., y Bryant, D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Lemer, S., Buge, B., Bemis, A., y Giribet, G. (2014). First molecular phylogeny of the circumtropical bivalve family Pinnidae (Mollusca, Bivalvia): Evidence for high levels of cryptic species diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 75, 11-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.02.008>
- Librado P. y Rozas J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Liu, J., Li, Q., Kong, L., y Zheng, X. (2011). Cryptic diversity in the pen shell *Atrina pectinate* (Bivalvia: Pinnidae): high divergence and hybridization revealed by molecular and morphological data. *Molecular Ecology*, 20, 4332-4345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05275.x>
- Liu, X., Kang, L., Xu, M., Wu, C., y Jiang, L. (2017). Phylogenetic estimation of Mytilidae in the East China Sea inferred from mitochondrial genes and nuclear DNA sequence variation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 71, 219-224. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2017.03.002>
- Lubosny, M., Smietanka, B., Przylucka, A., y Burzynski, A. (2020). Highly divergent mitogenomes of *Geukensia demissa* (Bivalvia, Mytilidae) with extreme AT content. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 00, 1-10. <https://doi.org/10.1111/jzs.12354>
- Luttikhuizen, P., Drent, J., y Baker, A. (2003). Disjunct distribution of highly diverged mitochondrial lineage clade and population subdivision in a marine bivalve with pelagic

larval dispersal. *Molecular Ecology*, 12, 2215-2229. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01872.x>

Mao, Y., Cai, H., Li, C., y Gao, T. (2010). Molecular phylogenetics of genus *Mytilus* based on *COI* and *16S* rRNA sequences. *South China Fish. Sci*, 06, 27e36. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-2227.2010.05.005>

Martínez, L., Freire, R., Arias-Pérez, A., Méndez, J., y Insua, A. (2015). Patterns of genetic variation across the distribution range of the cockle *Cerastoderma edule* inferred from microsatellites and mitochondrial DNA. *Marine Biology*, 162(7), 1393-1406. <https://doi.org/10.1007/s00227-015-2676-y>

Mathiesen, S., Thyrring, J., Hemmer-Hansen, J., Berge, J., Sukhotin, A., Leopold, P., Bekaert, M., Sejr, M., y Nielsen, E. (2016). Genetic diversity and connectivity within *Mytilus spp.* in the subarctic and Arctic. *Evol. Appl.*, 10(1), 39e55. <https://doi.org/10.1111/eva.12415>

Mena, C., Gonzales, C., Clasing, E., y Gallardo, M. (2001). Variabilidad genética en *Aulacomya atra* (Molina, 1782) en el sur de Chile. *Cienc. Tecnol. Mar*, 24, 71-79.

Miller, M., Pfeiffer, W., y Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1, 1-8. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>

MINAM. (2014). La estrategia nacional de diversidad biológica al 2021 y su plan de acción 2014-2018. Ministerio del Ambiente.

Nass, M., y Nass, S. (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *The Journal of Cell Biology*, 19(3), 593-611. <https://doi.org/10.1083/jcb.19.3.593>

Ni, G., Li, Q., Ni, L., Kong, L., y Yu, H. (2015). Population subdivision of the surf clam *Macra chinensis* in the East China Sea: Changjiang River outflow is not the sole driver. *PeerJ*, 2015(9), 1-20. <https://doi.org/10.7717/peerj.1240>

Oyarzún, P., Nuñez, J., Toro, J., y Gardner, J. (2020). Trioecy in the marine mussel *Semimytilus algosus* (Mollusca, Bivalvia): Stable sex ratios across 22 degrees of a latitudinal gradient. *Frontiers in Marine Science*, 7, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00348>

Palumbi, S. (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *Molecular systematics*, 205-247.

- Parakatselaki, M., Saavedra, C., y Ladoukakis, M. (2015). Searching for doubly uniparental inheritance of mtDNA in the apple snail *Pomacea diffusa*. *Mitochondrial DNA*, 27, 1-3. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.989521>
- Paredes, C., Cardoso, F., Santamaría, J., Esplana, J., y Llaja, L. (2016). Lista anotada de los bivalvos marinos del Perú. *Revista peruana de biología*, 23(2), 127-150. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v23i2.12397>
- Passamonti, M., y Ghiselli, F. (2009). Doubly Uniparental Inheritance: Two Mitochondrial Genomes, One Precious Model for Organelle DNA Inheritance and Evolution. *DNA and Cell Biology*, 28(2), 79-89. <https://doi.org/10.1089/dna.2008.0807>
- Perrier, X., y Jacquemoud, J. (2006). DARwin –dissimilarity analysis and representation for windows. <https://darwin.cirad.fr/>
- Petrou, E., Fuentes-Pardo, A., Rogers, L., Orobko, M., Tarpey, C., Jiménez-Hidalgo, I., Moss, M., Yang, D., Pitcher, T., Sandell, T., Lowry, D., Ruzzante, D., y Hauser, L. (2021). Functional genetic diversity in an exploited marine species and its relevance to fisheries management. *Proceedings B.*, 288, 1-9. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2398>
- Plough, L. (2016). Genetic load in marine animals: a review. *Current Zoology*, 62(6), 567-579. <https://doi.org/10.1093/cz/zow096>
- PRODUCE. (2021). Anuario estadístico pesquero y acuícola 2020. Ministerio de la Producción del Perú. Perú.
- PRODUCE. (2022). Anuario estadístico pesquero y acuícola 2021. Ministerio de la Producción del Perú. Perú.
- Pruett, C., y Winker, K. (2008). The effects of sample size on population genetic diversity estimates in song sparrows *Melospiza melodia*. *J. Avian. Biol.*, 39, 252-256. <https://doi.org/10.1111/j.2008.0908-8857.04094.x>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., y Suchard, M. A. (2018). Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Rodríguez, K. (2021), Identificación molecular de especies de bivalvos, cefalópodos y poliplacóforos mediante el código de barras de ADN, para la conservación de la biodiversidad del litoral peruano. Universidad Nacional del Santa.

- Rogers, A., y Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9(3), 552–569. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A040727>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., y Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S., y Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSX248>
- Santaclara, F., Espiñeira, M., Cabado, A., Aldasoro, A., Gonzalez-Lavín, N., y Vieites, J. (2006). Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8461–8470. <https://doi.org/10.1021/jf061400u>
- Soenens, P. (1985). Estudios preliminares sobre el efecto del fenómeno El Niño 1982–1983 en comunidades de *Aulacomya ater*. Instituto del Mar del Perú, Callao, Perú.
- Steiner, G., y Muller, M. (1996). What can *18S* rDNA do for bivalve phylogeny? *Molecular Evolution*, 43, 58–70.
- Stewart, D., Breton, S., Blier, P., y Hoeh, W. (2009). Masculinization events and doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA: a model for understanding the evolutionary dynamics of gender-associated mtDNA in mussels. *Evolutionary Biology*, 2009, 163–173. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00952-5_9
- Stewart, D., Breton, S., Chase, E., Robicheau, B., Bettinazzi, S., Pante, E., Youssef, N., y Garrido-Ramos, M. (2020). An unusual evolutionary strategy: The origins, genetic repertoire, and implications of Doubly Uniparental Inheritance of mitochondrial DNA in bivalves. *Evolutionary Biology*, 1, 301–323. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57246-4_12
- Suchard, M., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D., Drummond, A., y Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 4(1), 1–5. <https://doi.org/10.1093/VE/VEY016>

- Taggart, J., Hynes, R., Prodohl, P., y Fergusson, A. (1992). A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid species. *J. Fish Biol.*, 40, 963-965. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1992.tb02641.x>
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/123.3.585>
- Tarazona, J., Gutiérrez, D., Paredes, C., y Indacochea, A. (2003). Overview and challenges of marine biodiversity research in Peru. *Gayana*, 67(2), 206-231. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-65382003000200009>
- Tejada, A., y Baldarrago, D. (2016). Monitoreo biológico poblacional de *Aulacomya atra* (Molina, 1782) en el litoral de Moquegua y Tacna, 2014. *Inf. Inst. Mar Perú*, 43(1), 46-67.
- Terranova, M., Brutto, S., Arculeo, M., y Mitton, J. (2007). A mitochondrial phylogeography of *Brachidontes variabilis* (Bivalvia: Mytilidae) reveals three cryptic species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45(4), 289-298. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2007.00421.x>
- Theologidis, I., Fodelianakis, S., Gaspar, M., y Zouros, E. (2008). Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problem of its sporadic detection in Bivalvia. *Evolution*, 62, 959-970. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00329.x>
- Thompson, J., Higgins, D., y Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Uribe, R., Perea, Á., García, V., y Huerto, M. (2019). Biodiversidad marina en el Norcentro de la costa de Perú: un enfoque para la evaluación de planes de manejo. *Bol Inst Mar Perú*, 34(2), 332-350.
- Vargas, J., Pérez, M., Toro, J., y Astorga, M. (2015). Presence of two mitochondrial genomes in the mytilid *Perumytilus purpuratus*: Phylogenetic evidence for doubly uniparental inheritance. *Genetics and Molecular Biology*, 38(2), 173-181. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47573822201420140262>

- Vierna, J., Jensen, K., Gonzáles-Tizón, A., y Martínez-Lage, A. (2012). Population genetic analysis of *Ensis directus* unveils high genetic variation in the introduced range and reveals a new species from the NW Atlantic. *Mar. Biol.*, 159, 2209-2227. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2006-6>
- Vierna, J., Martínez-Lage, A., y González-Tizón, A. (2010). Analysis of ITS1 and ITS2 sequences in *Ensis razor* shells: suitability as molecular markers at the population and species levels, and evolution of these ribosomal DNA spacers. *Genome*, 53, 23-34. <https://doi.org/10.1139/G09-080>
- Wang, X., Kong, L., Chen, J., Matsukuma, A., y Li, Q. (2017). Phylogeography of bivalve *Meretrix petechialis* in the Northwestern Pacific indicated by mitochondrial and nuclear DNA data. *PLoS ONE*, 12(8), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183221>
- Weir, B., y Cockerham, C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358–1370. <https://doi.org/10.1111/J.1558-5646.1984.TB05657.X>
- Wittmeier, P., y Hummel, S. (2022). Agarose gel electrophoresis to assess PCR product yield: comparison with spectrophotometry, fluorometry and qPCR. *BioTechniques*, 72, 155-158. <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0094>
- Wood, A., Apte, S., MacAvoy, E., y Gardner, J. (2007). A molecular phylogeny of the marine mussel genus *Perna* (Bivalvia: Mytilidae) based on nuclear (ITS1y2) and mitochondrial (*COI*) DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 685-698. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.12.019>
- WORMS (2023). *Aulacomya* Mörch, 1853. Recuperado de: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=224603>
- Ye, Y., Li, J., y Wu, C. (2015). Genetic diversity and population connectivity of the Asian green mussel *Perna viridis* in South China Sea, inferred from mitochondrial DNA markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61, 470-476. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2015.07.009>
- Zaixso, H. (2004). Bancos de cholga *Aulacomya atra atra* (Molina) (Bivalvia: Mytilidae) del golfo San José (Chubut, Argentina): diversidad y relaciones con facies afines. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 39(2), 61-78.

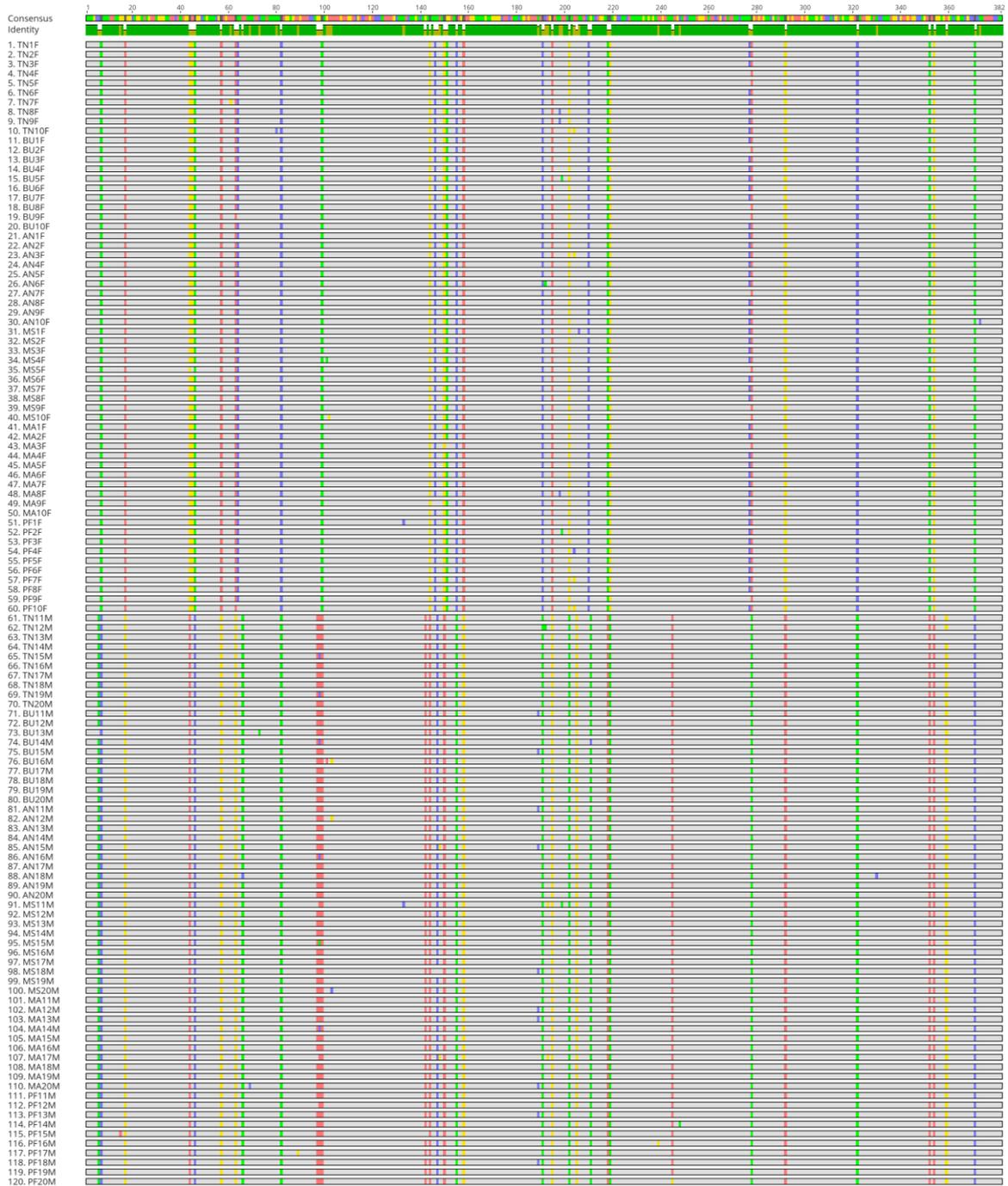
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572004000200003>

- Zhou, C., Wu, C., Guo, B., y Chen, Y. (2015). Genetic diversity in ribosomal 18S rRNA and mitochondrial *COIII* genes in Chinese cultured populations of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 59, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.01.012>
- Zouros, E. (2013). Biparental inheritance through uniparental transmission: the doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA. *Evolutionary Biology*, 40(1), 1-31. <https://doi.org/10.1007/s11692-012-9195-2>
- Zouros, E., Ball, A., Saavedra, C., y Freeman, K. (1994). An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Genetics*, 91, 7463-7467. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7463>
- Zouros, E., Freeman, K., Ball, A., y Pogson, G. (1992). Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature*, 359, 412-414. <https://doi.org/10.1038/359412a0>
- Zúñiga, O. (2002). Guía de biodiversidad N°1 Vol. 1 Macrofauna y algas marinas. MECESUP.

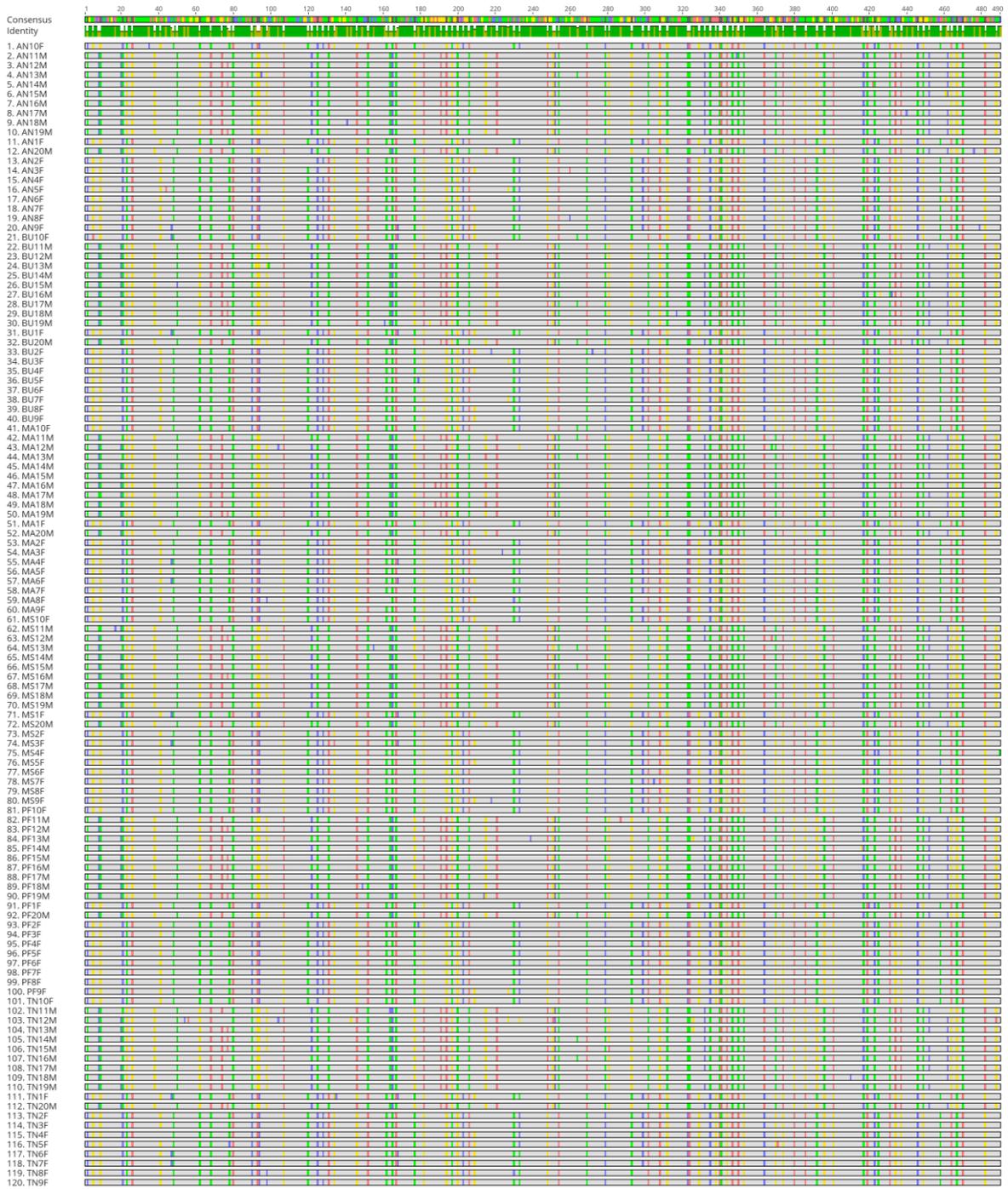
X. ANEXOS

10.1. Anexo 1. Alineamiento de los genes mitocondriales (*COI* y *16S*) y nucleares (*18S* e *ITS-28S*).

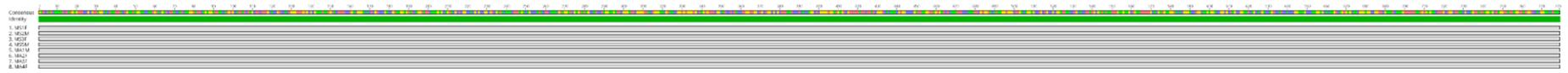
Gen *16S*



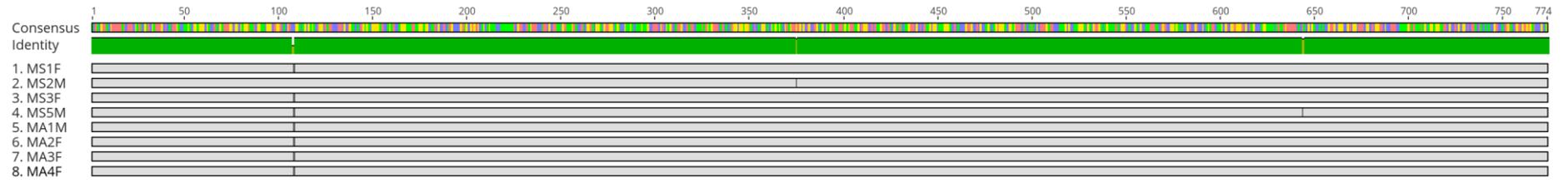
Gen COI



Gen *18S*



Gen *ITS-28S*



10.2. Anexo 2. Haplotipos encontrados, sitios polimórficos y frecuencias de los marcadores mitocondriales 16S y COI de 6 poblaciones de *A. atra*.

Haplotipos	Gen 16S Mitotipo F																Frecuencias						
	Sitios polimórficos																TN (n=10)	BF (n=10)	AN (n=10)	MS (n=10)	MA (n=10)	PF (n=10)	
H1	G	A	C	T	G	A	T	C	T	C	T	A	A	T	C	C	T	0.4	0.6	0.5	0.5	0.7	0.4
H2	T	.	0.2	0.2	0.1	0.1	-	0.1
H3	.	G	0.1	-	-	-	-	-
H4	C	0.2	-	-	-	0.1	-
H5	.	.	.	C	G	0.1	-	-	-	-	-
H6	T	-	0.1	-	-	-	0.1
H7	.	.	T	T	.	-	0.1	-	-	-	-
H8	G	-	-	0.1	-	-	0.1
H9	T	.	.	.	-	-	0.1	-	-	-
H10	T	-	-	0.1	-	-	-
H11	C	.	-	-	0.1	-	-	-
H12	C	-	-	-	0.1	-	-
H13	T	-	-	-	0.1	-	-
H14	A	T	.	-	-	-	0.1	-	-
H15	G	T	.	-	-	-	0.1	-	-
H16	G	T	.	-	-	-	-	0.1	-
H17	T	-	-	-	-	0.1	-
H18	C	-	-	-	-	-	0.1
H19	C	-	-	-	-	-	0.1
H20	.	.	T	G	-	-	-	-	-	0.1

		Gen 16S Mitotipo M																																	
		Sitios polimórficos																												Frecuencias					
Haplótipo	pos	6	15	66	69	73	89	97	98	101	103	133	142	147	148	189	192	193	199	205	211	239	245	248	330	359	TN	BF	AN	MS	MA	PF			
																														(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)
H1		T	G	T	T	C	A	A	A	G	A	T	A	C	A	T	C	A	A	G	T	A	A	C	T	G	0.6	0.5	0.5	0.6	0.5	0.2			
H2		T	0.1	-	-	-	-	-		
H3		A	0.1	-	-	-	-	-			
H4		C	0.2	-	0.1	-	0.1	-			
H5		C	-	0.2	0.1	-	0.2	0.1			
H6		C	.	.	T	-	0.1	-	-	-	-			
H7		C	C	-	0.1	-	-	-	-			
H8		A	G	-	0.1	-	-	-	-			
H9		G	-	-	0.1	-	-	-			
H10		G	C	-	-	0.1	-	-	-			
H11		.	.	C	C	-	-	0.1	-	-	-	-			
H12		G	.	.	.	C	G	T	-	-	-	0.1	-	-				
H13		T	-	-	-	0.1	-	-				
H14		T	.	C	-	-	-	0.1	-	-				
H15		C	-	-	-	0.1	-	-				
H16		G	G	.	.	G	-	-	-	-	0.1	-				
H17		.	.	.	C	C	-	-	-	-	0.1	-				
H18		G	-	-	-	-	-	0.1				
H19		C	.	.	A	-	-	-	-	-	0.1				
H20		T	.	-	-	-	-	-	0.1				
H21		.	A	G	-	-	-	-	-	0.1				
H22		G	.	.	.	-	-	-	-	-	0.1				
H23		G	-	-	-	-	-	0.1				
H24		G	.	.	-	-	-	-	-	0.1				

		Gen COI Mitotipo F																																						Frecuencias						
		Sitios polimórficos																																						Frecuencias						
Haplotipos	5	35	41	44	47	48	78	98	120	128	134	135	162	168	179	203	209	218	224	227	230	233	260	264	272	299	305	329	338	371	420	425	458	461	479	490	TN (n=10)	BF (n=10)	AN (n=10)	MS (n=10)	MA (n=10)	PF (n=10)				
H1	G	T	G	G	C	T	T	T	T	C	G	C	T	C	T	C	G	T	T	A	T	T	T	C	T	C	T	G	G	T	T	T	T	A	T	C	0.1	-	-	-	-	-				
H2	T	C	.	T	.	T	.	.	A	C	.	.	T	C	T	C	0.2	0.1	0.2	0.3	0.4	0.7		
H3	.	.	A	.	T	T	.	T	C	0.1	-	-	-	-	-	
H4	T	.	C	T	.	T	C	A	0.1	-	-	-	-	-
H5	T	0.1	0.1	-	0.1	0.2	-
H6	T	0.1	-	-	-	-	-
H7	T	T	.	T	.	T	C	T	0.1	-	-	-	-	-	
H8	T	.	.	C	.	T	.	T	.	T	T	0.1	-	-	-	-	-	
H9	T	T	.	T	.	T	C	.	.	.	T	0.1	-	-	-	-	-	
H10	T	T	.	T	.	.	.	C	C	.	.	.	C	-	0.1	-	-	-	-	
H11	T	T	.	T	.	.	A	.	.	G	.	.	C	.	.	.	C	-	0.2	-	-	-	-		
H12	T	T	.	T	C	-	0.3	0.1	0.1	-	-		
H13	T	T	.	T	C	.	A	C	-	0.1	-	-	-	0.1			
H14	A	T	T	.	T	-	0.1	-	-	-	-			
H15	T	.	.	.	C	.	.	T	.	T	.	.	A	C	-	-	0.1	-	-	-			
H16	T	T	.	T	.	T	C	A	-	-	0.1	-	-	-			
H17	.	.	.	A	T	T	.	T	.	.	A	.	G	.	.	.	C	-	-	0.1	-	-	-				
H18	T	T	.	T	.	.	A	C	G	.	-	-	0.1	-	-	-			
H19	T	T	.	T	.	.	A	C	C	-	-	0.1	-	-	-			
H20	C	T	A	C	-	-	0.1	-	-	-			
H21	.	C	.	.	T	T	.	T	.	.	A	C	-	-	0.1	-	-	-				
H22	A	T	-	-	-	0.1	-	-			
H23	T	T	.	T	.	.	A	C	C	.	.	T	-	-	-	0.1	-	-			
H24	T	T	.	T	C	C	.	.	-	-	-	0.1	-	-			
H25	T	T	.	T	.	.	A	C	C	-	-	-	0.1	-	-				
H26	T	T	.	T	.	.	.	C	C	-	-	-	0.1	-	-			
H27	T	T	.	T	C	.	.	.	C	A	-	-	-	-	0.1	-			
H28	T	T	.	T	.	T	A	C	-	-	-	-	0.1	-			
H29	T	.	C	T	C	T	C	T	-	-	-	-	0.1	-			
H30	T	T	.	T	.	.	A	C	-	-	-	-	0.1	-			
H31	T	T	.	T	.	.	A	C	.	T	C	.	.	-	-	-	-	-	0.1			
H32	T	T	.	T	G	.	.	.	C	-	-	-	-	-	0.1			

		Gen COI Mitotipo M																																														Frecuencias															
		Sitios polimórficos																																																													
Haplo tipos	8	17	20	38	50	54	56	74	77	92	95	98	99	104	122	128	141	143	149	155	161	164	185	188	191	214	215	221	227	233	239	251	252	264	281	287	317	326	332	349	368	410	416	422	426	432	440	443	452	461	462	476	488	TN (n=10)	BF (n=10)	AN (n=10)	MS (n=10)	MA (n=10)	PF (n=10)				
H1	C	A	T	G	T	A	T	A	G	A	T	G	C	T	C	T	T	A	T	T	T	C	A	G	A	T	G	A	A	A	T	G	C	C	G	G	T	A	C	T	G	T	A	G	A	T	T	T	C	A	T	T	G	0.1	-	-	-	-	-				
H2	.	.	C	.	C	A	G	C	.	.	.	G	.	.	.	T	G	G	.	A	G	C	.	A	0.1	-	-	-	-	-						
H3	.	.	C	A	T	G	C	.	.	0.1	-	-	-	-	-							
H4	.	.	C	A	T	T	.	C	.	.	0.1	-	-	-	-	-						
H5	.	.	C	A	T	C	.	.	0.1	-	-	-	-	-						
H6	T	.	T	T	C	.	.	0.1	-	-	-	0.1	-						
H7	.	.	C	T	C	.	.	0.1	-	-	0.1	0.2	-					
H8	.	.	C	T	T	.	C	.	.	0.1	-	-	-	-	-			
H9	.	.	C	T	0.1	-	0.1	-	-	-						
H10	.	.	C	A	T	C	.	.	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.3					
H11	.	.	C	T	C	.	.	-	0.1	-	-	-	-			
H12	.	.	C	T	T	.	C	.	.	-	0.1	-	-	-	-		
H13	.	.	C	A	G	.	T	T	C	.	.	-	0.1	-	-	-	-			
H14	.	.	C	.	C	T	C	.	.	-	0.1	-	-	-	-			
H15	.	.	C	T	G	G	C	.	T	.	C	.	-	0.1	-	-	-	-
H16	.	.	C	A	T	T	.	C	.	-	0.1	-	-	-	-		
H17	.	.	C	A	T	C	.	.	-	0.1	-	-	-	-			
H18	.	.	C	A	C	T	G	C	.	.	-	0.1	-	-	-	-			
H19	.	.	C	T	T	.	C	.	C	.	-	0.1	-	-	-	-
H20	.	.	C	T	C	.	.	-	-	0.1	-	-	-		
H21	.	.	C	C	T	T	.	C	.	-	-	0.1	-	-	-		
H22	.	.	C	A	.	.	.	A	T	A	.	.	C	.	-	-	0.1	-	-	-	
H23	.	.	C	T	G	C	.	-	-	0.1	-	-	-		
H24	.	.	C	T	C	.	C	.	-	-	0.1	-	-	-
H25	.	.	C	C	.	.	T	C	.	-	-	0.1	-	-	-	

10.3. Anexo 3. Secuencias de referencia de *A. atra* y grupos externos utilizadas en los análisis filogenéticos.

Origen	Especie	Código GenBank	Fuente
Chile	<i>Aulacomya atra</i>	DQ640542.1	Santaclara <i>et al.</i> (2006)
Chile	<i>Aulacomya atra</i>	DQ640543.1	
Sudáfrica	<i>Aulacomya atra</i>	OP204639.1	Grobler <i>et al.</i> (2023)
Sudáfrica	<i>Aulacomya atra</i>	OP204640.1	
Sudáfrica	<i>Aulacomya atra</i>	OP204641.1	
Sudáfrica	<i>Aulacomya atra</i>	OP204642.1	
Sudáfrica	<i>Aulacomya atra</i>	OP204643.1	
Sudáfrica	<i>Aulacomya atra</i>	OP204644.1	
Sudáfrica	<i>Aulacomya atra</i>	OP204645.1	
Sudáfrica	<i>Aulacomya atra</i>	OP204646.1	
Sudáfrica	<i>Aulacomya atra</i>	OP204647.1	
Sudáfrica	<i>Aulacomya atra</i>	OP204648.1	
Sudáfrica	<i>Aulacomya atra</i>	OP204649.1	
Sudáfrica	<i>Aulacomya atra</i>	OP204650.1	
Nueva Zelanda	<i>Aulacomya atra</i>	DQ924557.1	Wood <i>et al.</i> (2007)
Nueva Zelanda	<i>Aulacomya atra</i>	DQ924558.1	
Chile	<i>Perumytilus purpuratus</i>	KJ453818.1	Trovant <i>et al.</i> (2014)
Chile	<i>Brachidontes modiolus</i>	AY621960.1	Lee y Foighil (2004)

10.4. Anexo 4. Tablas que registran la distribución de los mitotipos F y M en muestras de tejido gonadal.

Detección de mitotipos F y M en tejido gonadal de 40 individuos (20 hembras y 20 machos) de *A. atra* mediante el gen *16S*, provenientes de las localidades de Morro Sama y Marcona. (+ Presente, – Ausente)

Muestra	Sexo	Mitotipo F	Mitotipo M	Localidad
MS01_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS02_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS03_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS04_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS05_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS06_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS07_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS08_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS09_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS10_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS11_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS13_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS14_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS15_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS16_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS17_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS18_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS19_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS20_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS21_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MA01_F_MS	F	+	-	Marcona
MA02_F_MS	F	+	-	Marcona
MA03_F_MS	F	+	-	Marcona
MA04_F_MS	F	+	-	Marcona
MA05_F_MS	F	+	-	Marcona
MA06_F_MS	F	+	-	Marcona
MA07_F_MS	F	+	-	Marcona
MA08_F_MS	F	+	-	Marcona
MA09_F_MS	F	+	-	Marcona
MA10_F_MS	F	+	-	Marcona
MA11_M_MS	M	-	+	Marcona
MA12_M_MS	M	-	+	Marcona
MA13_M_MS	M	-	+	Marcona
MA14_M_MS	M	-	+	Marcona
MA15_M_MS	M	-	+	Marcona
MA16_M_MS	M	-	+	Marcona
MA17_M_MS	M	-	+	Marcona
MA18_M_MS	M	-	+	Marcona
MA19_M_MS	M	-	+	Marcona
MA20_M_MS	M	-	+	Marcona

Detección de mitotipos F y M en tejido gonadal de 40 individuos (20 hembras y 20 machos) de *A. atra* mediante el gen *COI*, provenientes de las localidades de Morro Sama y Marcona. (+ Presente, – Ausente)

Muestra	Sexo	Mitotipo F	Mitotipo M	Localidad
MS01_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS02_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS03_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS04_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS05_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS06_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS07_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS08_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS09_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS10_F_MS	F	+	-	Morro Sama
MS11_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS13_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS14_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS15_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS16_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS17_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS18_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS19_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS20_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MS21_M_MS	M	-	+	Morro Sama
MA01_F_MS	F	+	-	Marcona
MA02_F_MS	F	+	-	Marcona
MA03_F_MS	F	+	-	Marcona
MA04_F_MS	F	+	-	Marcona
MA05_F_MS	F	+	-	Marcona
MA06_F_MS	F	+	-	Marcona
MA07_F_MS	F	+	-	Marcona
MA08_F_MS	F	+	-	Marcona
MA09_F_MS	F	+	-	Marcona
MA10_F_MS	F	+	-	Marcona
MA11_M_MS	M	-	+	Marcona
MA12_M_MS	M	-	+	Marcona
MA13_M_MS	M	-	+	Marcona
MA14_M_MS	M	-	+	Marcona
MA15_M_MS	M	-	+	Marcona
MA16_M_MS	M	-	+	Marcona
MA17_M_MS	M	-	+	Marcona
MA18_M_MS	M	-	+	Marcona
MA19_M_MS	M	-	+	Marcona
MA20_M_MS	M	-	+	Marcona