



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LARVAS DE
MOLUSCOS GASTERÓPODOS MEDIANTE EL
GEN 18S ARNr

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biología Marina)

P r e s e n t a

Alejandra Arciniega De Los Santos

La Paz, Baja California Sur, Marzo de 2012.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 6 del mes de marzo del 2012, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LARVAS DE MOLUSCOS GASTERÓPODOS MEDIANTE EL GEN 18S ARNr

Presentada por la alumna:

ALEJANDRA ARCINIEGA DE LOS SANTOS

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biología Marina

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA



Dr. Ricardo Pérez Enríquez
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Pedro Cruz Hernández
CO-TUTOR



Dr. Salvador Emilio Lluch Cota
CO-TUTOR

DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Conformación del comité:

Comité tutorial y comité revisor de tesis:

Dr. Ricardo Pérez Enríquez –Director de tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Pedro Cruz Hernández

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Salvador E. Lluch Cota

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Jurado de exámen:

Dr. Ricardo Pérez Enríquez –Director de tesis

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dr. Salvador E. Lluch Cota

Suplente:

Dr. Noé Díaz Vilorio

RESUMEN

Muchas especies marinas poseen un estadio larvario pelágico que es morfológicamente distinto y mucho más chico que la forma adulta. Entre ellos resaltan los moluscos gasterópodos por su importancia económica como fuente de alimento, ornamentales y de compuestos farmacéuticos. Entender los procesos que afectan tanto a la supervivencia como el transporte de éste estadio y su influencia en la distribución espacial, dinámica poblacional, estrategias de migración y evolución de las especies, representa uno de los retos principales en Ecología Marina. Los estudios de dinámica larvaria son importantes como insumo para el manejo pesquero y diseño de prácticas acuícolas. Sin embargo, estos estudios enfrentan el enorme reto de la identificación precisa de especies, por lo que en el presente trabajo se explora la factibilidad de incorporar herramientas moleculares como alternativa a la identificación morfométrica tradicional.

Se evaluaron cuatro herramientas moleculares basadas en la amplificación por PCR del gen 18S ARNr. El uso potencial de sondas moleculares tipo “*Molecular Beacon*” (1), el análisis de fragmentos de restricción (RFLPs) (2) y el análisis de Disociación de Alta Resolución (HRM) (3) fueron dirigidos a la identificación de especies de gasterópodos de elevada importancia comercial (abulones); en tanto que el análisis total de polimorfismos a partir de secuencias parciales (4) se dirigió a la caracterización de larvas de moluscos gasterópodos de muestras de plancton obtenidas de dos localidades de la costa occidental del Estado de Baja California Sur (La Bocana y Cabo Tosco), comparando sus secuencias con la base de datos de ADN GenBank.

La sonda tipo *Molecular Beacon* presentó señales diferenciales entre muestras de ejemplares adultos de *Haliotis* sp. y *Megastraea* sp., en tanto que el análisis HRM mostró curvas de disociación distintivas entre los géneros *Haliotis*, *Fissurella* y *Megathura*. El análisis de RFLPs en ejemplares adultos de *Haliotis corrugata*, *Fissurella volcano*, *Megathura crenulata*, *Tegula eisenii* y *Megastraea undosa*, basados en la digestión con la enzima *DdeI* mostró también una clara diferencia en los tamaños de fragmentos obtenidos y por ende de dichas especies. Sin embargo, el análisis de larvas requirió además de la

digestión con la endonucleasa *Sau3AI*, para la diferenciación de haliótidios de otros moluscos gasterópodos presentes en las muestras. Se discute el potencial de las tres estrategias como herramientas de identificación de haliótidios y otros géneros de importancia comercial, particularmente en estadio larvario.

De las muestras del plancton se analizaron las secuencias de 318 larvas resultando en 154 genotipos correspondientes a 15 órdenes de moluscos gasterópodos con 36 familias y 40 géneros. Sobresalen caracoles litorinimorfos (*Littorinimorpha*), babosas de mar del orden *Sacoglossa* y caracoles neogasterópodos (*Neogastropoda*). Se discute la factibilidad del uso del gen 18S ARNr en la identificación a nivel de especie.

En La Bocana, en la estación de superficie LB01 se estimaron 55 genotipos, en la estación de superficie LB07 21 genotipos y en la de fondo LB10 52 genotipos; para la estación CT01 (superficie) de la localidad de Cabo Tosco se estimaron 47 genotipos. La mayor diversidad de genotipos se registró en La Bocana en las estaciones de superficie y fondo (LB01 y LB10), las cuales compartieron casi la totalidad de los órdenes identificados. Entre las localidades de La Bocana y Cabo Tosco también se encontró similitud en los órdenes presentes, pero ésta fue menor que la observada entre las estaciones de la localidad de La Bocana (LB01, LB07 y LB10). En una primera aproximación, los resultados obtenidos de la utilización del análisis de secuencias permitieron la obtención de relaciones filogenéticas y su comparación entre las estaciones en estudio. Se discute la importancia del incremento del tamaño de muestra para futuras aplicaciones del análisis de secuencias aplicado a estudios ecológicos en larvas de moluscos gasterópodos.

Palabras clave: Marcadores moleculares, moluscos gasterópodos, Molecular Beacon, RFLP, Disociación de alta definición.

ABSTRACT

Many marine species, such as gastropod mollusks, have larval pelagic stages that are much smaller and morphologically distinct to their adult counterparts. These species are important due to their economical value as protein source, ornamentals, and origin of some pharmaceutical compounds. The understanding of the processes that affect survival and spatial distribution at the larval stage, the population dynamics, migration strategies, and the species evolution represent one of the most important challenges in Marine Ecology. The study of the larval dynamics is of the utmost importance for fisheries management and aquaculture practices design. However, these are limited by the great difficulty of the precise identification of the species at the early stages. On this basis, the objective of the present research is to explore the feasibility of the use of molecular tools as an alternative to the traditional morphometric identification.

Four molecular tools based on the amplification by PCR of the 18S rRNA were evaluated. The use of “Molecular Beacons” as molecular probes (1), the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs) (2), and the High Resolution Melting (HRM) (3) techniques were directed to the identification of commercial gastropods. The analysis of partial gen sequences (4) of gastropod larvae collected from plankton tows from two sites on the west coast of the Baja California State (La Bocana and Cabo Tosco), was done by comparing these sequences with those available in the GenBank database.

The Molecular Beacon probe showed signals for the differentiation of adults of *Haliotis* sp. and *Megastrea* sp., meanwhile the HRM presented dissociation curves that distinguished *Haliotis*, *Fissurella*, and *Megathura* genera. The RFLP analysis in adult specimens based on the digestion with the enzyme *DdeI* also showed a clear differentiation among *Haliotis corrugata*, *Fissurella volcano*, *Megathura crenulata*, *Tegula eisenii*, and *Megastrea undosa*. Nevertheless, because the analysis done in larvae was inconclusive, it required the additional use of the endonuclease *Sau3AI* to be able to separate haliotids from the other gastropod mollusks in the samples. The potential of the three strategies as molecular tools for the identification of haliotids, particularly at the larval stage, is discussed.

From the plankton samples 318 larval sequences were analyzed, resulting in 154 genotypes that corresponded to 15 orders of gastropods mollusks that comprised 36 families and 40 genera. The highest abundance corresponded to Littorinimorpha snails, followed by sea snails from the orders Sacoglossa and Neogastropoda. The feasibility of the use of 18S rRNA for the identification to the species level is discussed.

At La Bocana, 55 genotypes were estimated at the surface station LB01, 21 at surface station LB07, and 52 at bottom station LB10; at Cabo Tosco 47 genotypes were found at the surface station (CT01). The highest diversity of genotypes was observed at surface and bottom stations done at the same geographical position (LB01 and LB10), which shared most of the orders. The comparison between La Bocana and Cabo Tosco, also showed some similarity in the registered orders but it was lower than that found among La Bocana stations (LB01, LB07, and LB10), and Cabo Tosco. As a first approach, the results from the sequences analysis showed the phylogenetic relations among genotypes, and the comparison among locations. The importance of increasing sample size for future applications of the sequence analysis in gastropod larval ecological studies is also discussed.

Keywords: Molecular markers, gastropods mollusks, Molecular Beacon, RFLP, High-Resolution Melting.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis papás, Pepe y Rosy, que han sido ejemplo de dedicación, esfuerzo y lucha ante las adversidades, que me han enseñado a conseguir lo que anhelo con perseverancia y tenacidad, a ellos debo y agradezco me hayan llevado de la mano por un buen camino, que me hayan facilitado todas las herramientas de las que me he valido hasta el día de hoy para cumplir una meta mas en mi vida. Sin ustedes no hubiera sido posible, ¡los amo!

A mis hermanos, Pepe y Chuy, que me han apoyado en todo momento, se han alegrado y han sufrido mis arrebatos, me han aconsejado (bien y mal, jaja) y me han demostrado su amor siempre.

A mi tío Melo y mi abuelita Mary que siempre me han apoyado y han compartido la alegría de cada logro en mi vida, gracias por contemplarme siempre en sus oraciones y estar al pendiente de mí y mi familia.

A mi familia adoptiva, los Chávez-Arroyo, que todos sin excepción me han aceptado y apoyado en los momentos cruciales de ésta etapa, especial y principalmente Roberto, que me ha enseñado con el ejemplo que *“el futuro está en nosotros y hasta donde seamos capaces de luchar por él”*. ¡Te amo!, gracias por todo tu apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Programa de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por la formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

A las sociedades cooperativas Progreso (en La Bocana) y Melitón Albañez (en Cabo Tosco) por su amable colaboración para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Quiero agradecer enormemente a mi director, el Dr. Ricardo Pérez Enríquez, por todo el apoyo y las facilidades que me brindó desde antes del comienzo y hasta la conclusión de éste trabajo, por su valiosa asesoría y apoyo en general, muchas gracias.

A mis asesores, el Dr. Pedro Cruz Hernández y el Dr. Salvador E. Lluch Cota por su inmejorable asesoría, atinadas recomendaciones, pertinentes sugerencias... y en resumen por su optimismo en la conformación de éste comité que siempre hizo más amenas las reuniones de trabajo.

A mi asesor extra-oficial, el Dr. Noé Díaz Vilorio, por todo el apoyo incondicional, la dedicación y el interés mostrado en mi trabajo, y sobre todo, gracias por tu amistad.

A Raul Llera e Ignacio Leyva por su todo su apoyo, asesoría para el desarrollo de éste estudio y principalmente por su amistad incondicional.

A todo el personal técnico que me apoyó en el desarrollo de esta tesis: a la M.C. Susana Ávila Alvarez (Laboratorio de Genética Acuícola, CIBNOR) por atender amablemente a todas mis dudas y cualquier solicitud de apoyo, a Jesús Neftali Gutierrez Rivera (Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR) por su asesoría y apoyo en el uso del equipo de PCR en tiempo real, a María del Carmen Rodríguez Jaramillo (Laboratorio de Histología e Histoquímica, CIBNOR) por su asesoría en el uso del microscopio y programa de digitalización de imágenes, a Roxana Bertha Inohuye Rivera (Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico, CIBNOR) por su asesoría en el uso del estereoscopio y la fotodocumentación de larvas, a Juan José Ramírez Rosas (Buceo y embarcaciones, CIBNOR) por su apoyo en los muestreos; a la Dra. Laura Sánchez Velasco y al M.C. Javier

Cruz Hernández (Laboratorio de Plancton y Ecología Marina, CICIMAR-IPN) por su apoyo en los muestreos de plancton y asesoría en el procesamiento e identificación de muestras.

A Horacio Sandoval y Manuel Melero, encargados del centro de cómputo de posgrado, por su versátil apoyo en tan diversos aspectos.

A todo el personal del Departamento de Posgrado y Control Escolar.

A mi familia en La Paz: Nora Vargas, Elba Moreno, Laurita, Mabi, a todos los amargueiros: Laura (Suri β), Nacho, Yorsh, Vanessa, Jorge, Miguel, Scarry.

A los integrantes del Laboratorio de Genética Acuícola, por su ayuda, compañerismo y amistad, ¡gracias a todos!

A todos mis amigos (CIBnorianos y externos) que hicieron de ésta una etapa memorable en mi vida, sé que si intento escribir todos sus nombres, irremediamente olvidaré mencionar a algunos, pero ustedes saben perfectamente quiénes son y que me los llevo en el corazón.

CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Identificación molecular	2
1.2 Marcadores moleculares	2
2 ANTECEDENTES.....	4
3 JUSTIFICACIÓN.....	7
4 HIPÓTESIS.....	8
5 OBJETIVOS.....	8
5.1 Objetivo general.....	8
5.2 Objetivos específicos	8
6 MATERIALES Y MÉTODOS	9
6.1 Obtención de muestras.....	9
6.2 Separación de larvas en fase véliger	13
6.3 Extracción de ADN.....	15
6.4 Amplificación por PCR del gen 18S ARNr.....	15
6.4.1 Evaluación de herramientas de identificación molecular.....	16
6.4.1.1 Diseño de sondas tipo Molecular Beacon.....	16
6.4.1.2 Restricción enzimática (RFLP).....	18
6.4.1.3 Disociación de Alta Resolución (HRM).....	20
6.4.1.4 Análisis de secuencias del gen 18S ARNr.....	22
7 RESULTADOS	23
7.1 Obtención de muestras.....	23
7.1.1 Separación de larvas.....	23
7.2 Herramientas de identificación molecular	24
7.2.1 Diseño de sondas tipo Molecular Beacon	24
7.2.2 Restricción enzimática (RFLP)	28

7.2.3 Disociación de Alta Resolución (HRM)	35
7.2.4 Análisis de secuencias del gen 18S ARNr	36
7.4 Análisis filogenético	39
8 DISCUSIÓN	44
8.1 Diseño de sondas tipo Molecular Beacon	44
8.2 Restricción enzimática (RFLP).....	45
8.3 Disociación de Alta Resolución (HRM)	47
8.4 Análisis de secuencias del gen 18S ARNr.....	48
8.3 Análisis filogenético	50
9 CONCLUSIONES.....	52
10 LITERATURA CITADA	54
11 ANEXO.....	67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localidades de muestreo en el Estado de Baja California Sur. Mapa de la Península tomado de León-Carballo y Muciño-Díaz (1996). 9
- Figura 2.** Ubicación de las estaciones de muestreo en La Bocana en donde se realizaron arrastres de plancton. Imagen tomada de Google Earth v. 6.2. 10
- Figura 3.** Ubicación de las estaciones de muestreo en Cabo Tosco, en donde se realizaron arrastres de plancton. Imagen tomada de Google Earth v. 6.2. 11
- Figura 4.** Larva de un ejemplar de *Haliotis corrugata* en fase véliger observada al microscopio con un aumento de 10x. 13
- Figura 5.** Fraccionador de muestras Folsom. 14
- Figura 6.** Identificación molecular de moluscos gasterópodos. a) Obtención de amplicones correspondientes a la secuencia del gen 18S del organismo de interés. b) La sonda molecular tiene un fragmento de ADN en forma de horquilla compuesto de una secuencia de nucleótidos complementarios a la secuencia del organismo de interés (asa), además seis pares de nucleótidos autocomplementarios (brazo), una molécula reportera (R) y una molécula encargada de absorber la fluorescencia de la molécula reportera mientras se encuentren próximas (Q). c) En presencia de una hebra de ADN con la secuencia del organismo de interés, la sonda molecular formará un híbrido con ésta, abriéndose y permitiendo que la molécula reportera emita fluorescencia, la cual prevalecerá aún siendo escindida de la sonda al paso de la ADN polimerasa. d) En el equipo de qPCR se obtiene una gráfica mostrando la señal emitida a lo largo de la reacción. 17
- Figura 7.** Alineamiento de secuencias del gen 18S de diferentes moluscos gasterópodos, incluidas tres especies de haliótidos. 17

Figura 8. Alineamiento de secuencias de moluscos gasterópodos (a); sitio de corte de la enzima <i>DdeI</i> (b).	19
Figura 9. Sitio de corte de la enzima <i>Sau3AI</i>	19
Figura 10. Patrón de corte enzimático generado por el programa NEBcutterver. 2.0 (New England, Bio Labs Inc.).	20
Figura 11. Gráfica de curvas de fluorescencia estandarizada de la disociación de un fragmento de ADN de dos organismos con una diferencia de un nucleótido en su secuencia.	21
Figura 12. Larvas de moluscos gasterópodos obtenidas de los arrastres de plancton.	24
Figura 13. Gráficas de fluorescencia vs. ciclos de PCR. A. Resultado de una corrida en el termociclador Rotor-Gene 6000, las señales no muestran incremento de la fluorescencia conforme avanzan los ciclos de la PCR. B. Resultado de una corrida en el termociclador ABI Prism 7000, se observa el mismo fenómeno donde no hay incremento de la fluorescencia.	25
Figura 14. Visualización de un gel de agarosa al 1.5% en escáner de imágenes fluorescentes de amplicones del fragmento 18S (FMBIO®). Carriles: M.- Marcador de peso molecular; 1.- <i>Haliotis</i> + Sonda marcada con TET; 2.- <i>Megastreaa</i> + Sonda marcada con TET; 3.- <i>Haliotis</i> + Sonda marcada con FAM; 4.- <i>Megastreaa</i> + Sonda marcada con FAM; 5.- <i>Haliotis</i> + Sybr; 6.- <i>Megastreaa</i> + Sybr; 7.- Control negativo de coctail de reacción sin ADN con sonda marcada con TET; 8.- Control negativo de coctail de reacción sin ADN con sonda marcada con FAM; A y B.- <i>Haliotis</i> + Sonda marcada con FAM + Sonda marcada con TET; C y D.- <i>Megastreaa</i> + Sonda marcada con FAM + Sonda marcada con TET; E y F.- Control negativo de coctail de reacción sin ADN con sonda marcada con FAM + sonda marcada con TET.	26

- Figura 15.** Amplificación en PCR convencional del fragmento 18S en *Haliotis corrugata* con la presencia de la sonda molecular específica para éste género, implementando un gradiente de temperaturas: 1.- 80°C, 2.- 78.6°C, 3.- 76.3°C, 4.- 72.6°C, (A) Control negativo con temperatura de amplificación de 76.3°C, 5.- 67.6°C, 6.- 64°C, 7.- 61.6°C, 8.- 60°C, (B) Control negativo con temperatura de amplificación de 64°C. 27
- Figura 16.** Gráfica de fluorescencia vs. ciclos de PCR. Las señales no muestran incremento de la fluorescencia conforme avanzan los ciclos de la PCR; las líneas superiores representan muestras con sonda marcada con TET y FAM en el mismo tubo de reacción y las inferiores son muestras con una sonda molecular marcada con TET. 27
- Figura 17.** Visualización de un gel de agarosa al 1.5% en escáner de imágenes fluorescentes de amplicones del fragmento 18S (FMBIO®). Carriles: M.- Marcador de peso molecular; 1 y 2.- *Haliotis* + Sonda marcada con TET; 3 y 4.- *Megastraea* + Sonda marcada con TET; 5 y 6.- *Haliotis* + Sonda marcada con FAM; 7 y 8.- *Megastraea* + Sonda marcada con FAM; 9 y 10.- *Haliotis* + ADN de *Haliotis* + Sonda marcada con FAM + Sonda marcada con TET; 11 y 12.- *Megastraea* + Sonda marcada con FAM + Sonda marcada con TET; (-)T.- Control negativo de coctail de reacción sin ADN con sonda marcada con TET; (-)F.- Control negativo de coctail de reacción sin ADN con sonda marcada con FAM. 28
- Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, digestión con *DdeI*. Muestras: M.- Marcador de peso molecular, 1.- *Haliotis corrugata*, 2.- *Fissurella volcano*, 3.- *Megathura crenulata*, 4.- *Tegula eisenii*, 5.- *Megastraea undosa*, 6.- Control negativo (sin ADN). 29
- Figura 19.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, digestión enzimática con *DdeI*. Muestras de la estación LB07, se encuentran señaladas con flechas las muestras donde se obtuvo un resultado de corte efectivo. 29

Figura 20. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con <i>DdeI</i>	30
Figura 21. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con <i>DdeI</i>	30
Figura 22. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con <i>DdeI</i> . Muestras de la estación LB07 (La Bocana).....	31
Figura 23. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con <i>DdeI</i>	31
Figura 24. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con <i>DdeI</i>	32
Figura 25. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con <i>DdeI</i>	33
Figura 26. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con <i>DdeI</i>	33
Figura 27. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con <i>DdeI</i>	34
Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, digestión con <i>Sau3AI</i> . Muestras de las estaciones que presentaron previamente en uno o más organismos un patrón de corte positivo con la enzima <i>DdeI</i> . Los controles negativos (-) son coctel de reacción enzimática sin ADN y el control positivo (+) es una muestra de <i>H. corrugata</i> sometida al mismo tratamiento de reacción enzimática.	34
Figura 29. Gráficas generadas por el software HRM v3.0. Curva de disociación (Melt) estándar (a); Curva de disociación (Melt) derivativa, después de que el software generó la 1° derivada negativa del punto de inflexión (b).	35

Figura 30. Gráficas generadas por el software Rotor-Gene™ 6000 v.1.7. Gráfica de amplificación (a); Gráfica de fusión del fragmento (b).	36
Figura 31. Árbol filogenético de la estación LB01 de la localidad de La Bocana.	39
Figura 32. Árbol filogenético de la estación LB07 de la localidad de La Bocana.	40
Figura 33. Árbol filogenético de la estación LB10 de la localidad de La Bocana.	41
Figura 34. Árbol filogenético de la estación CT01 de la localidad de Cabo Tosco.	42

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Puntos de muestreo en donde se realizaron arrastres superficiales de plancton.	11
Tabla II. Biomasa determinada por el método de desplazamiento de volumen en probeta para las muestras de La Bocana (LB) y Cabo Tosco (CT).....	23
Tabla III. Listado de órdenes representados en los diferentes genotipos y porcentaje (%) de identidad.....	38

1 INTRODUCCIÓN

Muchas especies marinas poseen un estadio larvario pelágico que es morfológicamente distinto al del adulto y más chico en muchos órdenes de magnitud (Kendall *et al.*, 1984). Entender los procesos que afectan tanto a la supervivencia como el transporte de éste estadio es uno de los retos principales en Ecología Marina, ya que estos procesos influenciarán la distribución espacial, dinámica poblacional, estrategias de migración y evolución de las especies (Bakun, 1996; Cowen *et al.*, 2006).

Los estudios de dinámica larvaria en especies marinas de importancia pesquera son importantes para poder elaborar planes de manejo apropiados (Miller *et al.*, 2009). Aunque desde hace años se han explorado métodos indirectos para evaluar la ecología y transporte larvario, es aún indispensable contar con la capacidad de muestrear e identificar individuos del medio silvestre, lo que generalmente implica enormes esfuerzos de identificación taxonómica por métodos morfométricos. Estas limitaciones son especialmente severas para algunos grupos taxonómicos y durante los primeros estadios del desarrollo larvario (Kendall *et al.*, 1984).

Los moluscos gasterópodos (Reino: Animal; Fila: Mollusca; Clase: Gastropoda) tienen su origen en el Cámbrico (Erwin y Signor, 1991; Tracey *et al.*, 1993), y han alcanzado una alta diversidad, solo superada por los insectos; actualmente habitan muchas regiones del océano, y constituyen uno de los recursos de mayor interés para la extracción comercial (McArthur y Harasewych, 2003). En virtud de su importancia como componentes de la fauna reciente, los gasterópodos han sido objeto de numerosos estudios en diversas disciplinas biológicas, como la ecología, la fisiología, la biología del desarrollo, la biomecánica, biogeografía y la evolución molecular.

La identificación de estadios tempranos de moluscos gasterópodos está mayormente limitada al examen morfológico con microscopio de luz, basado en la forma de la silueta (Brink, 2001) y caracteres adicionales. El uso de microscopio electrónico para identificar larvas es más sofisticado pero se encuentra fuera del alcance de muchos estudios por su alto costo y grado de especialización necesario. Recientemente se han explorado herramientas

moleculares de alto rendimiento basadas en el análisis del ADN con potencial para ser un método alternativo de identificación de especies.

1.1 Identificación molecular

Durante las décadas recientes se han registrado tres grandes avances en la sistemática como disciplina, el desarrollo de la teoría sistemática, el refinamiento técnico de análisis de datos derivado del desarrollo de las computadoras y la incorporación del análisis molecular. A pesar de que la biología molecular tiene limitantes, permite acercarse a muchos problemas que se consideraban intratables por los morfólogos (Hillis, 1987; Patterson, 1987). Por ejemplo, hay muy pocos caracteres morfológicos que pueden ser comparados entre todos los organismos vivos. En contraste, hay un gran número de genes con funciones bioquímicas fundamentales que se encuentran en todas las especies y pueden ser secuenciados, alineados y analizados para estudiar las relaciones filogenéticas en la parte más profunda del árbol de la vida. Otros genes se pueden utilizar para estudiar las relaciones entre especies morfológicamente indistinguibles (Hillis *et al.*, 1991).

El ADN de un organismo es invariable con la edad, la etapa de desarrollo, o estado fisiológico, sin embargo, varía entre los diferentes grupos taxonómicos. Por ésta razón, ha sido utilizado para desarrollar sondas especie-específicas para numerosas plantas y animales, incluyendo larvas de invertebrados (Garland y Zimmer, 2002).

La identificación basada en ADN, en conjunto con el análisis de fotografía digital, se ha propuesto como una aproximación para estudios ecológicos de larvas que no puedan ser discriminadas por los métodos de identificación morfológica convencional (Kawakami *et al.*, 2010).

1.2 Marcadores moleculares

Los primeros marcadores usados para análisis genéticos fueron los caracteres morfológicos transmitidos por herencia mendeliana. En otras palabras, cualquier carácter genéticamente

determinado es considerado un marcador genético. Los marcadores moleculares genéticos (MGMs por sus siglas en inglés) reflejan directamente la variación al nivel de ADN. Los rápidos avances técnicos así como teóricos amplían enormemente el rango de herramientas disponibles para el estudio de la biodiversidad (Waser y Strobeck, 1998; Luikart y England, 1999; Sunnucks, 2000).

Una amplia gama de aplicaciones, desde el origen de la vida hasta eventos evolutivos relativamente recientes, se han abordado estudiando los genes del ARN ribosomal (ARNr) y sus regiones espaciadoras asociadas, colectivamente llamados ADN ribosomal (ARNr) (Appels y Honeycutt, 1986; Mindell y Honeycutt, 1990).

El ARNr más estudiado es la subunidad pequeña del gen nuclear, ARNr 18S. Este gen ha sido estudiado más extensivamente debido a que es una de las secuencias de evolución más lenta encontradas en todos los organismos vivos, por lo que ha sido muy útil para examinar acontecimientos evolutivos antiguos. Además, la baja tasa de cambio permite la construcción de muchos cebadores casi universales, lo que facilita los esfuerzos de secuenciación de los grupos que no han sido estudiados con anterioridad (Hillis y Dixon, 1991).

En el presente estudio se trabajó con la aplicación práctica del marcador molecular 18S, tomándolo como referencia para diseñar herramientas y como blanco con la utilización de diferentes técnicas para elucidar la identidad de organismos encontrados en muestras de campo.

2 ANTECEDENTES

Los métodos clásicos de identificación de larvas de moluscos se realizan mediante observación microscópica (Bernard, 1895; Stafford, 1906; Chanley y Andrews, 1971; Hendriks *et al.*, 2005). Las primeras identificaciones se basaban en la observación de la adquisición de caracteres morfológicos presentes en adultos, lo que provocaba frecuentes errores (Loosanoff *et al.*, 1966; Lutz, 1985), hasta que se consiguieron cultivos larvarios uniespecíficos, pudiendo así definir características propias de cada grupo taxonómico en los estadios larvarios (Loosanoff *et al.*, 1966; Schweinitz y Lutz, 1976).

La observación de las larvas bajo microscopio electrónico de barrido permite distinguir características ultraestructurales con alta precisión, pero requiere una preparación y manipulación previa de la muestra (Lutz y Hidu, 1979; Domínguez y Alcaraz, 1983). La necesidad de procesar en un tiempo mínimo el elevado número de muestras complejas de plancton requeridas para los estudios de campo, hace imprescindible el desarrollo de técnicas alternativas que sean rápidas, específicas y cómodas (Garland y Zimmer, 2002).

El gran auge de la Biología Molecular, la Proteómica y la Inmunología en los últimos años, está siendo aprovechado por campos de estudios ajenos a la Biomedicina (Burton, 1996; Vrieling y Anderson, 1996), y grupos de investigación de todo el mundo están promoviendo nuevos métodos de identificación, basados en marcadores moleculares e inmunológicos (e.g., marcadores inmunológicos: Orłowski *et al.*, 1971; Onishi *et al.*, 2003, alozimas: Mork *et al.*, 1983; Graves *et al.*, 1990; Manaresi *et al.*, 2001, análisis de RFLPs: Daniel y Graves, 1994, PCR multiplex especie-específica: Hyde *et al.*, 2005, SSCP: García-Vázquez *et al.*, 2006, y PCR en tiempo real: Bayha *et al.*, 2008). Tanto el estudio de marcadores proteicos, como el desarrollo de sondas específicas han mostrado ser herramientas útiles para el estudio filogenético de moluscos (Miller y Roughgarden, 1991; Olson *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1992; Coffroth y Mulawka III, 1995; Medeiros-Bergen *et al.*, 1995; Toro, 1998; André *et al.*, 1999) pero siguen requiriendo el análisis individual o en

pequeños grupos, lo que resulta laborioso y poco útil cuando se quiere aplicar el método a tareas rutinarias de monitoreo (Hare *et al.*, 2000).

Watanabe *et al.* (2004) utilizaron PCR cuantitativa (qPCR) para detectar la presencia de larvas de peces dadas las ventajas sobre la PCR convencional, como el monitoreo de la amplificación en tiempo real y sin la necesidad de llevar a cabo una electroforesis posterior; la especificidad garantizada tanto por el uso de cebadores como de sondas específicas para el amplicón y la capacidad de procesar muchas muestras simultáneamente y en poco tiempo. Sin embargo, la qPCR está siendo utilizada para cuantificación de cantidades de templados de PCR a escalas finas en muchas investigaciones como detección y cuantificación de carga viral y patógenos bacterianos en muestras clínicas (Yang *et al.*, 2002), además de dinoflagelados tóxicos en muestras de campo (Hosoi-Tanabe y Sako, 2005).

Las secuencias de ADN han sido utilizadas ampliamente para filogenética y genética de poblaciones así como para determinar la identidad de especies (Karaïskou *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2005; Akimoto *et al.*, 2006; Paine *et al.*, 2008). Subsecuentemente, el número de genes y secuencias publicados en bases de datos (DDBJ/EMBL/Gen- Bank) está creciendo rápidamente. Estos tipos de análisis han ido en incremento en años recientes y en asociación con los esfuerzos en código de barras de ADN empleando principalmente citocromo C oxidasa subunidad 1 (COI) (Ratnasingham y Hebert, 2008). El gen mitocondrial 16S de ARN ribosomal (16S ARNr) es una de las regiones más frecuentemente analizadas en estudios filogenéticos e identificación de peces (Tringali *et al.*, 1999; Aoyama *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2001; Karaïskou *et al.*, 2003), debido a su suficiente tasa de sustitución de nucleótidos para analizar diversidad genética a nivel de especies o género (Meyer, 1993). La molécula del 18S ARNr es un marcador filogenético popular para la búsqueda de relaciones entre taxones distantemente relacionados (e.g., Woese y Fox 1977; Cedergren *et al.*, 1988; Gouy y Li 1989; Hasegawa *et al.*, 1993) y algunos trabajos sugieren que estas secuencias pueden resolver correctamente las divergencias entre especies congénere (Winnepenninckx *et al.*, 1998; Aranceta-Garza *et al.*, 2011). La aplicación de técnicas inmunológicas permite la rápida identificación de

muchos huevos de peces simultáneamente (Chiou *et al.*, 2004; Hiroishi *et al.*, 2004), pero el uso de anticuerpos específicos no funciona para la identificación multiespecie. De manera similar, la PCR especie-específica funciona para un rango muy estrecho de blancos (Sezaki *et al.*, 2001; Saitoh *et al.*, 2003). Los métodos basados en hibridación sólo funcionan con sondas de secuencias conocidas (Kochzius *et al.* 2008) o con un número limitado de sondas específicas (Rosel y Kocher, 2002). Por otro lado, las sondas moleculares en combinación con enzimas de restricción han sido utilizadas para distinguir larvas de la almeja comercial *Spisula solidissima* de entre otras especies de bivalvos con el gen 18S ARNr en un estudio de asentamiento y reclutamiento en la plataforma continental de New Jersey, E.U.A. (Bell y Grassle, 1998).

3 JUSTIFICACIÓN

La conectividad, entendida como el intercambio de individuos entre poblaciones marinas, es un tema central en Ecología Marina. Para muchas especies bentónicas con un ciclo de vida complejo, este intercambio ocurre principalmente durante el estadio larvario pelágico y su éxito determina diversos aspectos de la dinámica poblacional. Sin embargo, este tipo de estudios enfrenta enormes retos técnicos derivados del diminuto tamaño de las larvas y de la gran similitud entre larvas de diferentes moluscos gasterópodos. En este sentido, es necesario desarrollar métodos indirectos o alternativos de identificación fiable.

4 HIPÓTESIS

Si el gen 18S ARNr posee suficiente polimorfismo en su secuencia, entonces permitirá el desarrollo de diferentes estrategias moleculares para la identificación de larvas de moluscos gasterópodos a diferentes niveles taxonómicos (orden, familia, género y/o especie).

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la factibilidad de identificación molecular de larvas de moluscos gasterópodos en muestras de plancton utilizando el gen 18S ARNr.

5.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar herramientas de identificación molecular de moluscos gasterópodos sobre la base del análisis de polimorfismos específicos del gen 18S (RFLP y sondas moleculares), utilizando al abulón (*Haliotis* spp.) como estudio de caso.
2. Identificar molecularmente las larvas utilizando como referencia la base de datos de secuencias de ADN "GenBank".
3. Utilizar la identificación molecular para comparar la diversidad de genotipos larvarios de dos localidades del Estado de Baja California Sur y configurar sus relaciones filogenéticas.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de muestras

Se realizaron dos muestreos de plancton en la costa occidental del Estado de Baja California Sur (Fig.1), uno en la localidad de La Bocana y otro en la localidad de Cabo Tosco (Isla Margarita), los días 1 y 3 de diciembre de 2009, respectivamente.

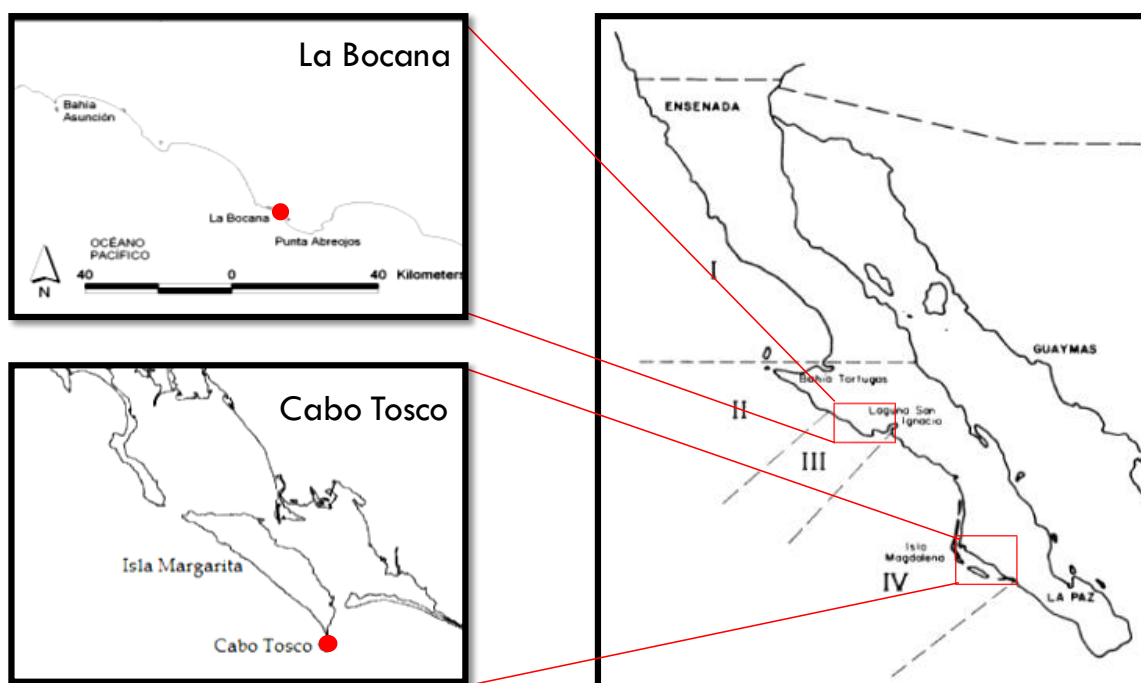


Figura 1. Localidades de muestreo en el Estado de Baja California Sur. Mapa de la Península tomado de León-Carballo y Muciño-Díaz (1996).

La Bocana. Se seleccionó un área de estudio en función de la abundancia de abulón (0.1 individuos adultos m^{-2}), el cual es un molusco gasterópodo representativo y el principal recurso pesquero en la región. Dentro del área seleccionada se tomó el centro como punto

de inicio para realizar los arrastres de plancton. Además se realizaron arrastres de plancton en estaciones contiguas ubicadas a 500–1100 m alrededor de la primera estación (Fig. 2).

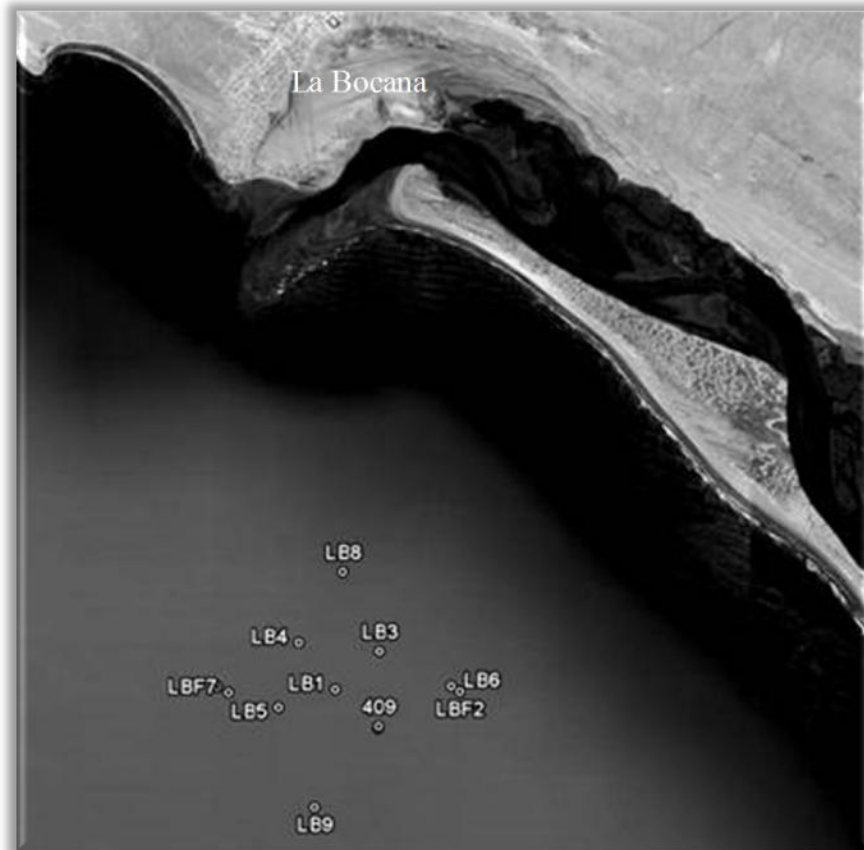


Figura 2. Ubicación de las estaciones de muestreo en La Bocana en donde se realizaron arrastres de plancton. Imagen tomada de Google Earth v. 6.2.

Cabo Tosco. En esta localidad se realizó otro esquema de muestreo, en ambos lados de la Isla se seleccionó una estación cercana a la orilla y dos estaciones contiguas a la primera, separadas entre sí por distancias de 150 a 320 m. También se seleccionaron tres estaciones separadas de la orilla por distancias de 130 a 150 m (Fig. 3).

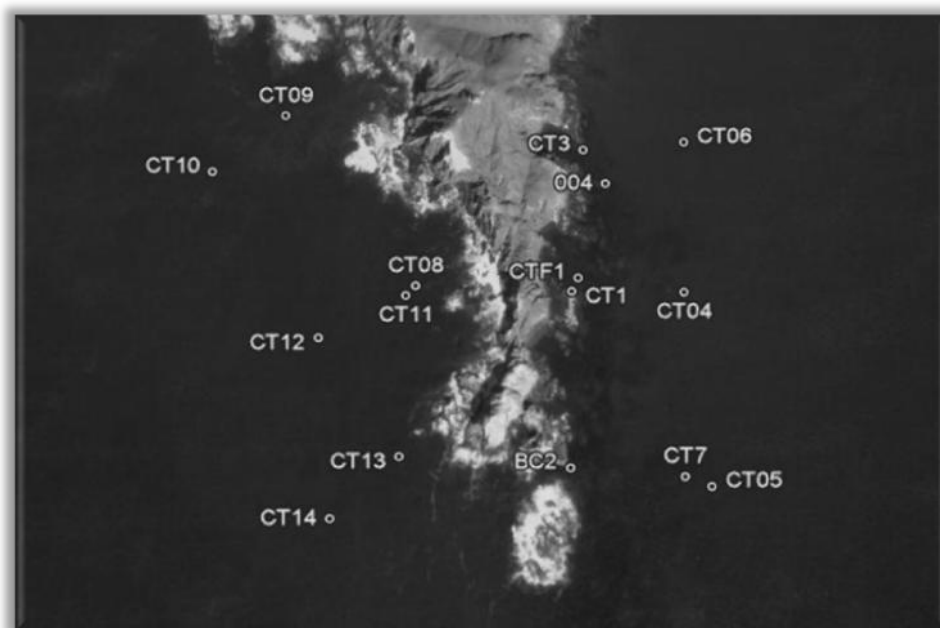


Figura 3. Ubicación de las estaciones de muestreo en Cabo Tosco, en donde se realizaron arrastres de plancton. Imagen tomada de Google Earth v. 6.2.

En ambas localidades, los puntos de colecta (estaciones de muestreo) se registraron con un GPS (Tabla I).

Tabla I. Puntos de muestreo en donde se realizaron arrastres superficiales de plancton.

Estación	Latitud	Longitud	Distancias
La Bocana			
LB1	26° 45' 1.9" N	113° 42' 20.9" W	
LBF2	26° 45' 2" N	113° 41' 42.2" W	
409	26° 44' 51" N	113° 42' 7.3" W	a 500m de LB1
LB3	26° 45' 12.8" N	113° 42' 6.8" W	a 510m de LB1
LB4	26° 45' 15.3" N	113° 42' 32.6" W	a 510m de LB1
LB5	26° 44' 57" N	113° 42' 39.1" W	a 500m de LB1
LB6	26° 45' 3" N	113° 41' 43.9" W	a 1000m de LB1
LB7	26° 45' 2.7" N	113° 42' 58.7" W	a 1100m de LB1
LB8	26° 45' 35.2" N	113° 42' 18.6" W	a 1000m de LB1
LB9	26° 44' 28.8" N	113° 42' 27.6" W	a 1100m de LB1
LB10*	26° 45' 1.9" N	113° 42' 20.9" W	

Puntos de muestreo en donde se realizaron arrastres superficiales de plancton (continuación).

Estación	Latitud	Longitud	Distancias
Cabo Tosco			
Zona protegida a oleaje			
CT1	24° 18' 26.2" N	111° 42' 36.6" W	
CTF1	24° 18' 27.2" N	111° 42' 37" W	
BC2	24° 18' 17.1" N	111° 42' 36.9" W	a 320m de CT1
CT3	24° 18' 33.8" N	111° 42' 35.8" W	a 210m de CT1
CT04	24° 18' 25" N	111° 42' 30" W	a 150m de CT1
CT05**			
CTF2	24° 18' 16.9" N	111° 42' 28.6" W	
CT06	24° 18' 34.1" N	111° 42' 30.1" W	a 150m de CT3
CT7	24° 18' 15.9" N	111° 42' 31.3" W	a 150m de BC2
Zona expuesta a oleaje			
CT08	24° 18' 26.6" N	111° 42' 45.3" W	
CTF3	24° 18' 26.6" N	111° 42' 45.3" W	
CT09	24° 18' 36.1" N	111° 42' 52.5" W	a 320m de CT08
CT10	24° 18' 33.8" N	111° 42' 57.3" W	a 150m de CT09
CT11**	24° 18' 26.3" N	111° 42' 45.9" W	
CT12	24° 18' 24.1" N	111° 42' 50.7" W	a 150m de CT08
CTF4	24° 18' 24.1" N	111° 42' 50.7" W	a 150m de CT08
CT13	24° 18' 18.2" N	111° 42' 44.9" W	a 270m de CT08
CT14	24° 18' 14.6" N	111° 42' 50.1" W	a 130m de CT13

* Arrastre a 5m de profundidad.

** Arrastre a 4m de profundidad.

Los arrastres superficiales de plancton se realizaron a una velocidad de 2.5 nudos, con una duración de 5 minutos y siguiendo una trayectoria circular. Se utilizó una red de plancton cónica de 180 µm de luz de malla y 0.45 m de diámetro de boca, la red estuvo provista de un flujómetro calibrado y un copo colector con la misma luz de malla que la red de plancton. Las muestras se fijaron en etanol al 80% y se colocaron en un frasco de plástico de 500 mL por cada estación.

6.2 Separación de larvas en fase véliger

Una vez en el laboratorio, se seleccionaron cuatro estaciones de cada localidad para facilitar la búsqueda de moluscos gasterópodos en estadio larvario en fase véliger sobre la base de la descripción de Courtois de Vicoise *et al.* (2007) para larvas del abulón *Haliotis tuberculata coccinea*, y utilizando larvas de *Haliotis corrugata* obtenidas en desoves en laboratorio (Perez-Enriquez, com pers) (Fig. 4).



Figura 4. Larva de un ejemplar de *Haliotis corrugata* en fase véliger observada al microscopio con un aumento de 10x.

La biomasa de los arrastres de plancton se estimó mediante el método de volumen desplazado (Beers, 1976) y estandarizada a mL de biovolumen por cada 1000 m³ de agua filtrada (Smith y Richardson, 1979). Debido a las elevadas biomásas registradas, se tomó la cuarta parte de las muestras contenidas en cada frasco de 500 mL, dividiéndolas con ayuda de un fraccionador de muestras Folsom (Fig. 5).

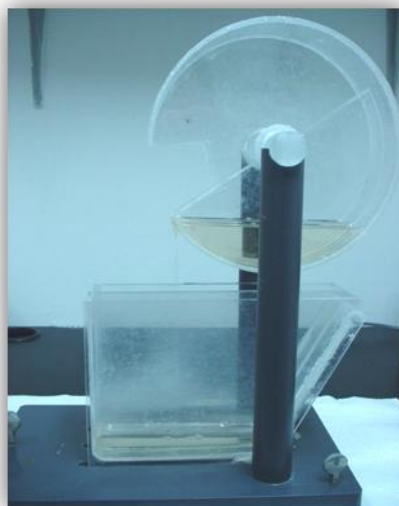


Figura 5. Fraccionador de muestras Folsom.

Posteriormente, se estimó un tamaño de muestra (n) con la ecuación 1, que determina el número de organismos que se analizarían por estación. Para lograr esto, primero se contó la totalidad de las posibles larvas de moluscos gasterópodos que se encontraron en una muestra fraccionada a un cuarto de una sola estación.

$$n = \frac{0.25N}{\left(\frac{\alpha}{z}\right)^2 (N-1) + 0.25} \quad (1)$$

Donde:

N es el tamaño de la población (número total de larvas encontradas en un arrastre)

α es el valor del error tipo 1

z es el valor del número de unidades de desviación estándar para una prueba de dos colas con una zona de rechazo igual a α .

0.25 es el valor de p^2 que produce el máximo valor de error estándar, esto es $p = 0.5$

Las larvas de moluscos gasterópodos en estadio larvario en fase véliger se separaron una a una con ayuda de un estereoscopio a 35X, se fotodocumentaron (Leica Application Suite

EZ, ver. 1.5.0) y se colocaron cada una en un pozo de una placa de PCR (de 96 pozos) con 2 μL de etanol al 70% para la posterior extracción de ADN y los análisis genéticos de identificación de especies.

6.3 Extracción de ADN

Se llevó a cabo la extracción de ADN de moluscos gasterópodos en estadio larvario siguiendo el protocolo de Selvamani *et al.* (2001) con algunas modificaciones. El método se describe a continuación: los especímenes separados se colocaron en placas de PCR con 2 μL de etanol al 70%, se trituraron las conchas que estaban enteras y se desecaron a temperatura ambiente hasta la evaporación de los restos de etanol, posteriormente se incubaron en 18 μL buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, Tween-20 0.05%) y 2 μL de Proteinasa-K (Sigma[®], 2.5 mg/ml) a 55°C por 24 h. Después de transcurrido éste periodo de incubación, la mezcla homogénea se incubó a 95°C por 10 min para detener la acción de la Proteinasa-K y se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización.

6.4 Amplificación por PCR del gen 18S ARNr

Para el análisis molecular de las muestras se llevo a cabo una reacción de amplificación de un fragmento del gen 18S de alrededor de 266-277 pb, con los iniciadores 18SHal2F (5'-TTGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGC-3') y 18SHal2R (5'-CCGGAATCGAACCCTGAT-3'), (Aranceta-Garza *et al.*, 2011); el volumen final de reacción fue de 30 μL conteniendo 0.2 mM de dNTPs (Invitrogen[™]), 0.5 μM de cada uno de los iniciadores, buffer PCR 1X (Invitrogene), 1.5 mM de MgCl_2 , 0.05 U de Platinum[®] *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen[™]) y 2 μL de ADN. Los ciclos de reacción fueron: 1 ciclo de 94°C por 4 min., 30 ciclos de 94°C por 45 s, 57°C por 45 s, 72°C por 45 s, seguidos de un ciclo de extensión final de 72°C por 10 min.

Los productos de PCR fueron analizados usando geles de agarosa (1.5%) en una cámara submarina horizontal (BIO-RAD) y visualizados con SYBR gold (Promega Corp.) usando un transiluminador UV (UVP BioDoc-it Imagin System).

6.4.1 Evaluación de herramientas de identificación molecular

Las herramientas consideradas y evaluadas en éste trabajo fueron primeramente dirigidas a la identificación molecular de organismos del género *Haliotis* sp. como caso de estudio, debido al gran valor comercial que representan éstas especies en la costa occidental de la península de Baja California. Dichas técnicas moleculares, consideran la detección de determinados polimorfismos en la secuencia del ADN, o el análisis de secuencias parciales, específicamente en este trabajo entre los amplicones del gen 18S en adultos y larvas evaluadas.

6.4.1.1 Diseño de sondas tipo Molecular Beacon

Las sondas Molecular Beacon son secuencias de oligonucleótidos capaces de reportar la presencia de secuencias específicas de ácidos nucleicos en una solución homogénea por medio de la fluorescencia de una molécula reportera unida a un extremo de la sonda. Se componen generalmente de alrededor de 30 nucleótidos de longitud, los cuales incluyen la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia específica de interés con la cuál formarán un híbrido y la fluorescencia será detectada en un equipo especializado (Tyagi y Kramer, 1996) (Fig. 6).

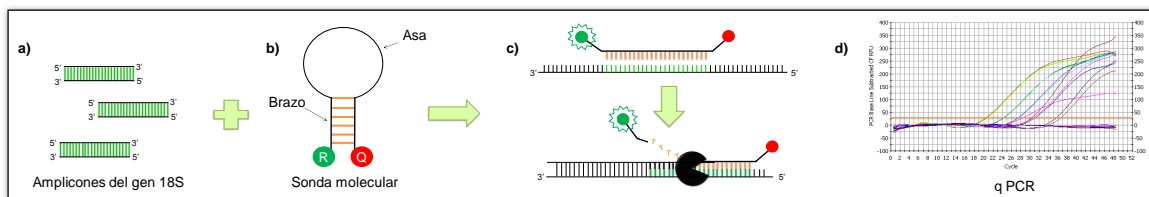


Figura 6. Identificación molecular de moluscos gasterópodos. a) Obtención de amplicones correspondientes a la secuencia del gen 18S del organismo de interés. b) La sonda molecular tiene un fragmento de ADN en forma de horquilla compuesto de una secuencia de nucleótidos complementarios a la secuencia del organismo de interés (asa), además seis pares de nucleótidos autocomplementarios (brazo), una molécula reportera (R) y una molécula encargada de absorber la fluorescencia de la molécula reportera mientras se encuentren próximas (Q). c) En presencia de una hebra de ADN con la secuencia del organismo de interés, la sonda molecular formará un híbrido con ésta, abriéndose y permitiendo que la molécula reportera emita fluorescencia, la cual prevalecerá aún siendo escindida de la sonda al paso de la ADN polimerasa. d) En el equipo de qPCR se obtiene una gráfica mostrando la señal emitida a lo largo de la reacción.

El diseño de estas sondas consistió en obtener secuencias de 18S ARNr de organismos gasterópodos previamente reportadas en GenBank por Aranceta-Garza *et al.* (2011) (*Megastrea undosa*, *Tegula eisenii*, *Megathura crenulata*, *Fissurella volcano*, *Concholepas concholepas*, *Haliotis fulgens*, *H. rufescens* y *H. corrugata*). Estas secuencias se editaron y alinearon, seleccionando así una secuencia consenso específica del género *Haliotis* spp. con la ayuda del programa BioEdit ver. 7.0.5.3 (Hall, 1999) (Fig. 7); esta secuencia consenso se incluyó en el asa de oligonucleótidos que forma la estructura secundaria característica de las sondas del tipo Molecular Beacon (Fig.6b).



Figura 7. Alineamiento de secuencias del gen 18S de diferentes moluscos gasterópodos, incluidas tres especies de haliótidos.

Se diseñó también una sonda para reconocer a todos los organismos considerados como pertenecientes al grupo de los moluscos gasterópodos, incluyendo las especies del género *Haliotis* spp.

El diseño de estas sondas se llevó a cabo con la ayuda del programa Beacon Designer ver. 7.9 (Primer Biosoft) y con el programa de DINAMelt (<http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu/twostate.php>) para predecir las posibles estructuras secundarias y sus T_m 's (Chakravorty *et al.*, 2010). Las secuencias completas de las sondas diseñadas fueron: 5'-CCGAGCTAATACATGCACTAAAGCTCCGCTCGG-3', para la sonda *Haliotis*-específica, que fue ligada al fluoróforo TET (tetraclorofluorescina) en el extremo 5'; y 5'-CCGCCCTATCAGACTGTCGATGGTGGGCGG-3' para la sonda control que fue ligada al fluoróforo FAM (6-carboxyfluoresceína) en el extremo 5'. En ambos casos se ligó la molécula DABCYL (ácido 4-(4-dimetilaminofenil) diazenil benzóico) al extremo 3' de la secuencia, como molécula inhibidora de la fluorescencia (Quencher por el término en inglés). Las sondas fueron fabricadas por la compañía Sigma-Aldrich. Se obtuvieron amplicones para el gen 18S (sección 6.4), manejando un volumen de reacción de 25 μ L, agregando además 0.3 μ M de cada sonda. Los ciclos de reacción fueron: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C por 8 min, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, acoplamiento de la sonda por 15 s, y acoplamiento-extensión de iniciadores por 30 s, seguidos de un ciclo final de desnaturalización a 95°C por 5 min y extensión a 65°C por 15 min (Kong *et al.*, 2002). Con el fin de determinar las temperaturas más adecuadas de acoplamiento de sonda e iniciadores se probaron, respectivamente, un rango de 70-75°C y de 60-65°C. Adicionalmente, se realizaron modificaciones de los tiempos de acoplamiento de la sonda y del acoplamiento-extensión de iniciadores a 45 s y 1 min, en ambos casos.

6.4.1.2 Restricción enzimática (RFLP)

A partir del análisis de las secuencias del gen 18S, consideradas previamente para el diseño de las sondas moleculares, se seleccionó una enzima endonucleasa (Promega Corp.) que

tuviera un corte específico en las tres especies del género *Haliotis* spp., tomando como referencia la alineación de secuencias de estas especies de haliótidos junto a las de *Megastrea undosa*, *Tegula eisenii*, *Fissurella volcano* y *Megathura crenulata* (Fig. 8).

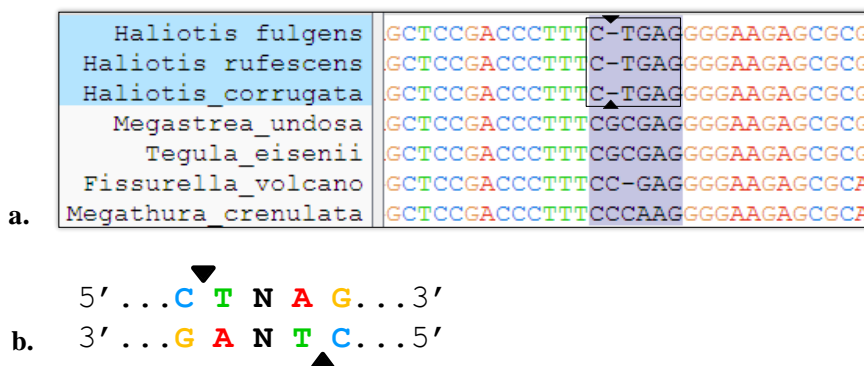


Figura 8. Alineamiento de secuencias de moluscos gasterópodos (a); sitio de corte de la enzima *DdeI* (b).

Se utilizó como enzima de validación a *Sau3AI* (New England, BioLabs, Inc.), la cual tiene una región de corte como se muestra en la figura 9, por lo que ayudaría a corroborar la presencia de organismos del género *Haliotis* spp. en caso de que se obtuvieran patrones característicos de dicho género en las restricciones enzimáticas con *DdeI*.



Figura 9. Sitio de corte de la enzima *Sau3AI*.

La selección de las enzimas se hizo con la ayuda del programa en línea NEBcutter V2.0 (New England, Bio Labs Inc.) ingresando la secuencia de los haliótidos y verificando que no se traslaparan los fragmentos generados por el corte con los de otros moluscos gasterópodos (Fig. 10).

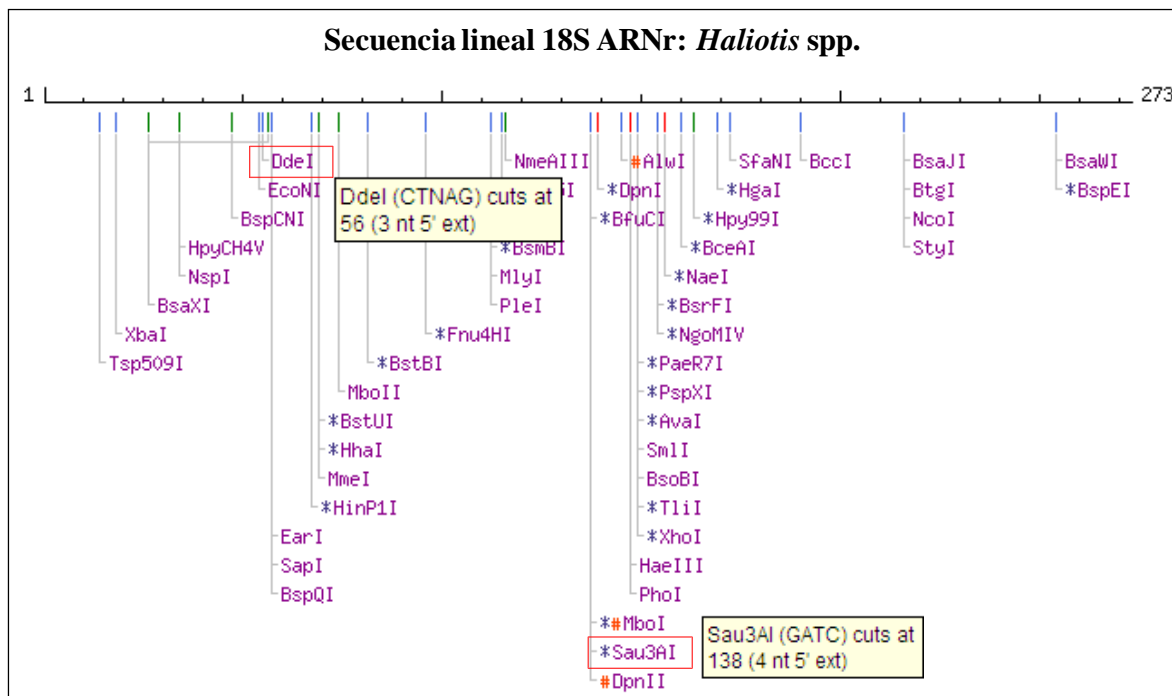


Figura 10. Patrón de corte enzimático generado por el programa NEBcutterver. 2.0 (New England, Bio Labs Inc.).

Para llevar a cabo la reacción enzimática se siguió el protocolo recomendado por el fabricante, utilizando 0.25 U de enzima, 1X del buffer incluido en el kit de la enzima, BSA y 1µg de ADN, se incubó toda la noche a 37°C y se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su posterior análisis de visualización en gel de agarosa.

6.4.1.3 Disociación de Alta Resolución (HRM)

La técnica de Disociación de Alta Resolución (“*High Resolution Melting*” o HRM por sus siglas en inglés) sirve como un método de análisis post PCR a través del cual se pueden detectar variantes genéticas dentro de una secuencia de interés, como es el caso del gen 18S. El método se basa en la comparación del patrón de disociación (curvas de disociación

o curvas “melting”) de ADN provenientes de muestras de interés; ésta comparación se hace con respecto a una muestra previamente caracterizada y/o conocida.

El producto de PCR obtenido se detecta por fluorescencia, en donde para observar el patrón de la curva de cada muestra analizada, se calienta éste producto paulatinamente ($\sim 0.2^\circ\text{C}/\text{seg}$) y durante éste proceso se hace una captura óptica de la pérdida de la fluorescencia en un equipo especializado de qPCR. El punto de inflexión en donde hay una pérdida drástica de la fluorescencia corresponde a la temperatura de disociación del producto (T_m), el punto y la forma de disociación de una molécula de ADN es una característica intrínseca a la misma, por lo que podríamos diferenciar géneros de organismos utilizando la secuencia genética apropiada (Fig. 11).

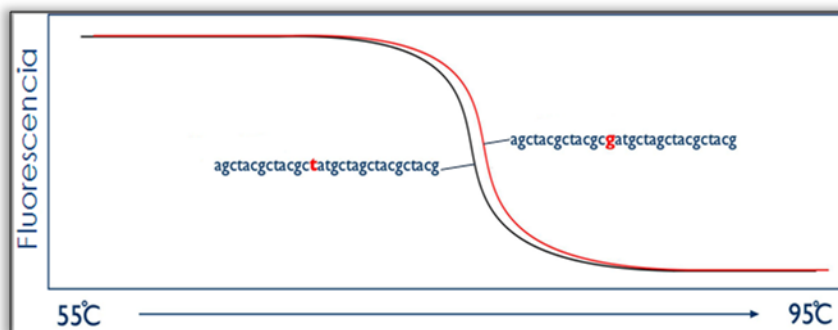


Figura 11. Gráfica de curvas de fluorescencia estandarizada de la disociación de un fragmento de ADN de dos organismos con una diferencia de un nucleótido en su secuencia.

Para llevar a cabo este ensayo, los ciclos de reacción empleados fueron: 1 ciclo de 95°C por 4 min., 30 ciclos de 95°C por 45 s, 60°C por 45 s, 72°C por 45 s, seguidos de un ciclo de extensión final de 72°C por 1 min. Posteriormente, el rango de temperatura empleado para la fusión de los fragmentos de ADN fue de 72°C a 95°C a una tasa de 0.1°C en cada paso. Los equipos utilizados fueron StepOnePlus™ (Applied Biosystems) y Rotor-Gene™ 6000 (Qiagen).

6.4.1.4 Análisis de secuencias del gen 18S ARNr

El producto de PCR de la amplificación de las estaciones LB07, LB01 (superficie) y LB10 (muestra de fondo del mismo punto geográfico que LB01) de la localidad de La Bocana y CT01 de la localidad de Cabo Tosco fue enviado a secuenciar (Macrogen, Korea), analizado y editado usando el software ChromasPro v. 1.15 (Technelysium Pty Ltd). Este programa se utilizó para corroborar que los nucleótidos correspondieran a la señal generada en el electroferograma adjunto y así determinar si dichas secuencias eran confiables o se generaron secuencias de baja calidad, las cuales no fueron utilizadas para los análisis posteriores. En las secuencias de buena calidad se eliminó la porción correspondiente al cebador (26 pb) que se utilizó para iniciar la secuencia del fragmento, debido a que es una zona conservada. Del análisis de secuencias, se generó un archivo de texto que incluyó todas las secuencias de buena calidad que se analizaron previamente, el cual se utilizó para determinar la diversidad de organismos según la cantidad de secuencias idénticas en el programa DnaSP v. 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009). Posteriormente, se llevó a cabo un alineamiento local en el programa en línea BLAST (NCBI) para determinar el porcentaje de identidad con secuencias de organismos previamente reportados y así determinar el grupo taxonómico al que pertenecen los organismos muestreados. Finalmente, se llevó a cabo un análisis filogenético con el programa PAUP ver. 4.0 (Sinauer Associates, Inc. Publishers) y MEGA v. 4.0 (Tamura, *et al.*, 2007) para determinar relaciones filogenéticas entre los organismos analizados.

7 RESULTADOS

7.1 Obtención de muestras

7.1.1 Separación de larvas

Se determinó una biomasa promedio de 668 mL 1000 m⁻³ para las estaciones de la localidad de La Bocana y 700 mL/1000 m³ para las estaciones de Cabo Tosco (Tabla II).

Tabla II Biomasa determinada por el método de desplazamiento de volumen en probeta para las muestras de La Bocana (LB) y Cabo Tosco (CT).

ESTACIÓN	BIOMASA (mL/1000m ³)	ESTACIÓN	BIOMASA (mL/1000m ³)
LB01	491	CT01	883
LB05	401	CT02	456
LB07	557	CT08	967
LB10	1,222	CT13	496

Posteriormente, se separaron alrededor de 330 larvas de cada una de las muestras fraccionadas de las 8 estaciones, cantidad que fue determinada con la fórmula mencionada en la sección de metodología (ecuación 1) para el tamaño de muestra.

Finalmente se procedió a la fotodocumentación para generar un registro de cada larva con su secuencia correspondiente (banco de imágenes en línea <http://www.leoa.org.mx/RAF/gala/Clasificaciondelarvas.mht>). Este análisis correspondió a 96 larvas por estación de las 4 estaciones seleccionadas de cada localidad.

Se encontraron larvas que oscilaron entre los 200 y 500 µm de ancho (Fig. 12), algunas de las cuales presentaron una coloración blanca de la concha, lo que no permitía determinar con certeza si contenía dentro de ella al organismo fijado. Sin embargo, la gran mayoría

presentaba conchas transparentes que incluso en algunas permitía observar un punto negro, posiblemente una mancha ocular.

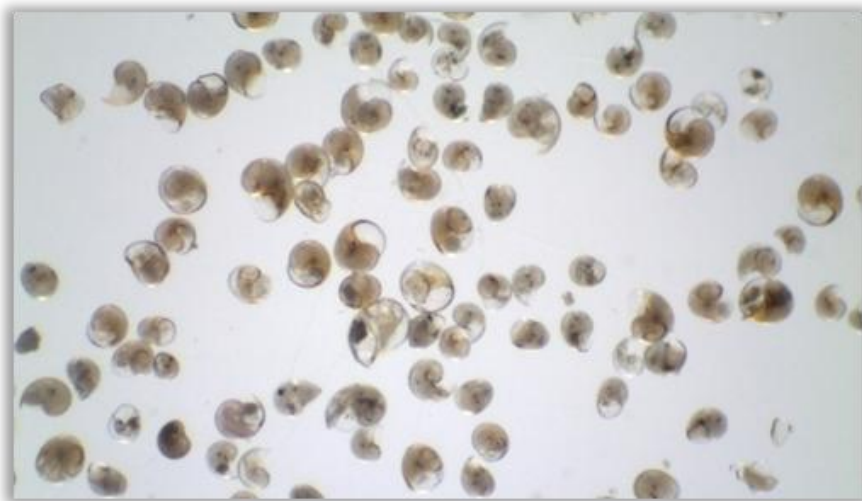


Figura 12. Larvas de moluscos gasterópodos obtenidas de los arrastres de plancton.

7.2 Herramientas de identificación molecular

7.2.1 Diseño de sondas tipo Molecular Beacon

Para probar las sondas se utilizaron muestras de ADN de un organismo adulto de *Haliotis* sp. y como control se utilizó una muestra correspondiente al ADN de un organismo adulto de *Megastreaea* sp. Se hicieron pruebas de las sondas en 2 termocicladores de tiempo real diferentes (Rotor-Gene 6000, Corbett Research y ABI Prism 7000, Applied Biosystems), donde se probaron distintas condiciones tanto de reacción como de temperaturas de amplificación, obteniendo resultados desfavorables (Fig. 13), donde para el caso de las corridas en el termociclador Rotor-Gene 6000, se observaron resultados de señales basales con una detección de fluorescencia muy baja; las corridas en el termociclador ABI Prism 7000 mostraron una señal basal elevada para la sonda marcada con el fluoróforo FAM (Fig. 13B, línea roja).

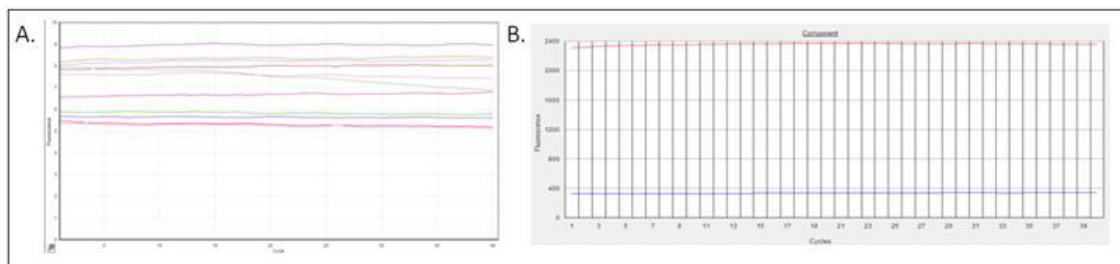


Figura 13. Gráficas de fluorescencia vs. ciclos de PCR. **A.** Resultado de una corrida en el termociclador Rotor-Gene 6000, las señales no muestran incremento de la fluorescencia conforme avanzan los ciclos de la PCR. **B.** Resultado de una corrida en el termociclador ABI Prism 7000, se observa el mismo fenómeno donde no hay incremento de la fluorescencia.

Los productos de éstas corridas se visualizaron en gel de agarosa para verificar la amplificación del fragmento 18S, obteniendo un resultado positivo (Fig. 14), lo que indica que las sondas no se están pegando a los fragmentos al momento de la amplificación y/o que las condiciones probadas no son las más adecuadas, ya que en las pruebas de PCR en tiempo real no se reporta la señal esperada.

En la figura 14 el gel fue teñido con SYBR gold (Invitrogen™), el cual se intercala en los fragmentos de ADN de doble cadena, permitiendo su visualización en un verde intenso; las bandas que se observan cercanas a la altura de 200 pb son el producto esperado de la amplificación del fragmento 18S. Los carriles numerados del 1 al 8 corresponden a muestras que fueron amplificadas añadiendo solo un tipo de sonda (marcada con TET o con FAM) por muestra y los carriles identificados de la A a la F, se amplificaron añadiendo las dos sondas a cada muestra; las señales en amarillo son los remanentes de la sonda marcada con TET; la visualización de la sonda marcada con FAM no se pudo llevar a cabo de manera tan clara como se observó la de TET, debido a la intensa señal de ésta y además de que la señal generada por la solución de tinción con SYBR pudo haber ocasionado ruido. En los carriles 7, 8 y F se observa una banda a la misma altura que la del fragmento 18S y que no se esperaban puesto que son carriles con muestras de control negativo a las

cuales no se les agregó muestra de ADN de ningún organismo, lo que indica que hay contaminación en alguno de los reactivos utilizados en la reacción de PCR.

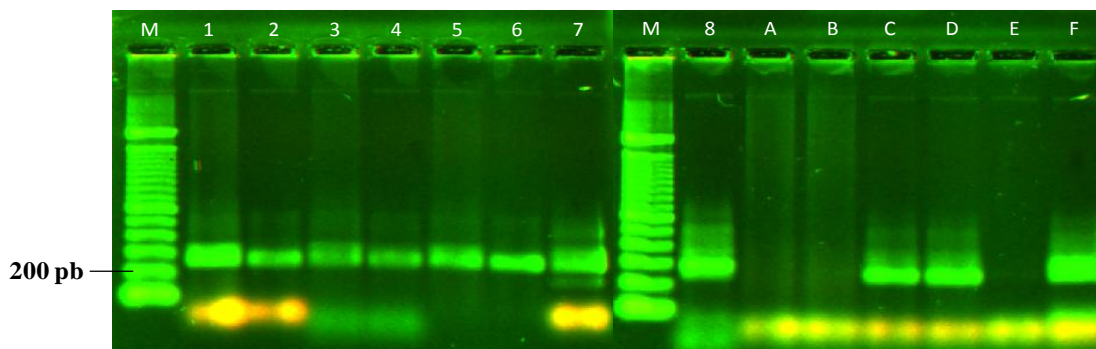


Figura 14. Visualización de un gel de agarosa al 1.5% en escáner de imágenes fluorescentes de amplicones del fragmento 18S (FMBIO®). Carriles: M.- Marcador de peso molecular; 1.- *Haliotis* + Sonda marcada con TET; 2.- *Megastraea* + Sonda marcada con TET; 3.- *Haliotis* + Sonda marcada con FAM; 4.- *Megastraea* + Sonda marcada con FAM; 5.- *Haliotis* + Sybr; 6.- *Megastraea* + Sybr; 7.- Control negativo de coctail de reacción sin ADN con sonda marcada con TET; 8.- Control negativo de coctail de reacción sin ADN con sonda marcada con FAM; A y B.- *Haliotis* + Sonda marcada con FAM + Sonda marcada con TET; C y D.- *Megastraea* + Sonda marcada con FAM + Sonda marcada con TET; E y F.- Control negativo de coctail de reacción sin ADN con sonda marcada con FAM + sonda marcada con TET.

Posteriormente se llevó a cabo una amplificación del fragmento 18S utilizando un gradiente de temperatura para identificar las temperaturas óptimas de amplificación y en base a eso poder ajustar la temperatura de unión de la sonda con el amplicón del 18S (Fig. 15), se aumentaron 5°C las temperaturas de alineamiento y extensión en las condiciones de qPCR, pero el resultado no varió significativamente en posteriores ensayos (Fig. 16).

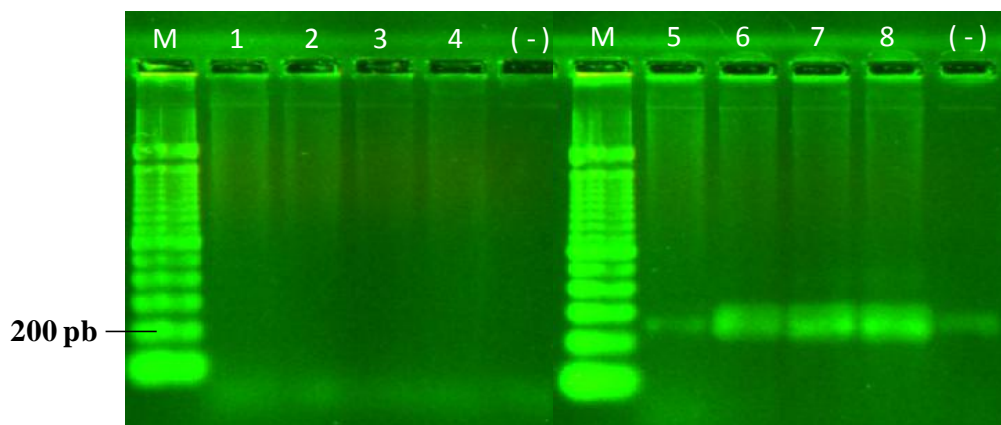


Figura 15. Amplificación en PCR convencional del fragmento 18S en *Haliotis corrugata* con la presencia de la sonda molecular específica para éste género, implementando un gradiente de temperaturas: 1.- 80°C, 2.- 78.6°C, 3.- 76.3°C, 4.- 72.6°C, (A) Control negativo con temperatura de amplificación de 76.3°C, 5.- 67.6°C, 6.- 64°C, 7.- 61.6°C, 8.- 60°C, (B) Control negativo con temperatura de amplificación de 64°C.

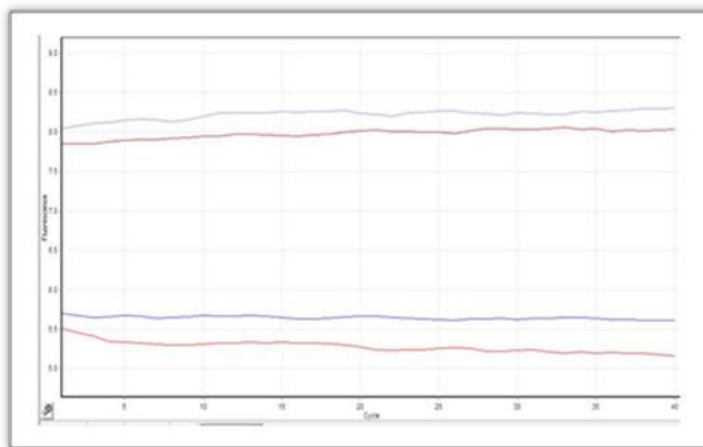


Figura 16. Gráfica de fluorescencia vs. ciclos de PCR. Las señales no muestran incremento de la fluorescencia conforme avanzan los ciclos de la PCR; las líneas superiores representan muestras con sonda marcada con TET y FAM en el mismo tubo de reacción y las inferiores son muestras con una sonda molecular marcada con TET.

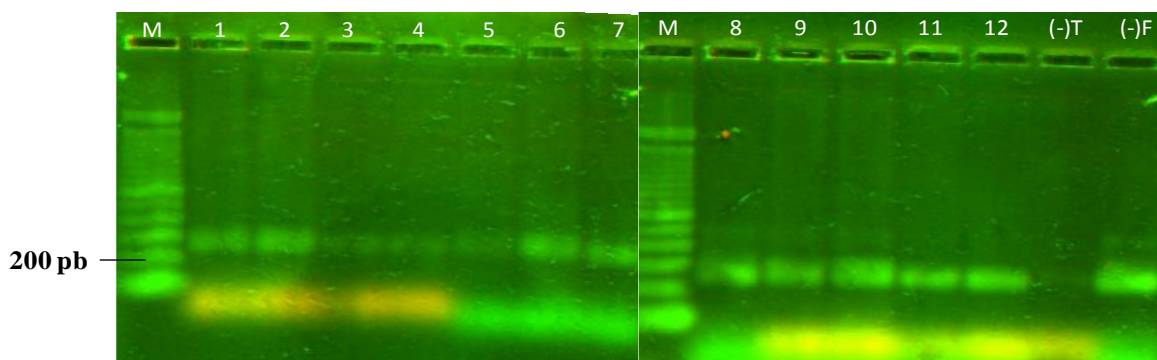


Figura 17. Visualización de un gel de agarosa al 1.5% en escáner de imágenes fluorescentes de amplicones del fragmento 18S (FMBIO®). Carriles: M.- Marcador de peso molecular; 1 y 2.- *Haliotis* + Sonda marcada con TET; 3 y 4.- *Megastraea* + Sonda marcada con TET; 5 y 6.- *Haliotis* + Sonda marcada con FAM; 7 y 8.- *Megastraea* + Sonda marcada con FAM; 9 y 10.- *Haliotis* + ADN de *Haliotis* + Sonda marcada con FAM + Sonda marcada con TET; 11 y 12.- *Megastraea* + Sonda marcada con FAM + Sonda marcada con TET; (-)T.- Control negativo de coctail de reacción sin ADN con sonda marcada con TET; (-)F.- Control negativo de coctail de reacción sin ADN con sonda marcada con FAM.

En la figura 17, en el carril del control negativo con sonda marcada con FAM [(-)F] se vuelve a observar una banda con el mismo tamaño que el fragmento 18S, lo que indica contaminación de ADN.

7.2.2 Restricción enzimática (RFLP)

Se determinó el patrón de restricción, producto de la digestión con la enzima *DdeI* sometiendo muestras de ADN de organismos adultos de *Haliotis corrugata*, *Fissurella volcano*, *Megathura crenulata*, *Tegula eisenii* y *Megastraea undosa*, observando una clara diferencia en los tamaños de fragmentos obtenidos (Fig. 18).

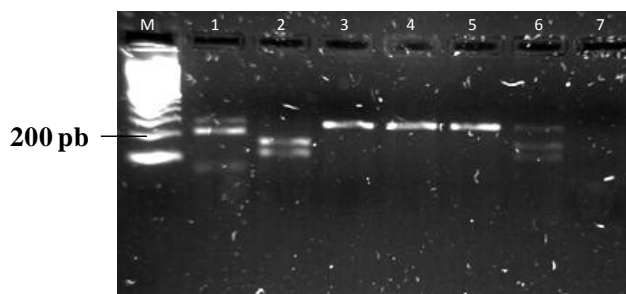


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, digestión con *DdeI*. Muestras: **M.**- Marcador de peso molecular, **1.**- *Haliotis corrugata*, **2.**- *Fissurella volcano*, **3.**- *Megathura crenulata*, **4.**- *Tegula eisenii*, **5.**- *Megastrea undosa*, **6.**- Control negativo (sin ADN).

Conociendo el patrón de corrimiento en agarosa, se llevó a cabo la reacción de restricción en las muestras de la estación LB07 de la localidad de La Bocana, observando 5 resultados presuntamente positivos (Fig. 19), de los cuales sólo se obtuvieron 3 secuencias limpias en la secuenciación y de éstas, las 3 presentaron un patrón de restricción en el análisis virtual con el programa Chromas Pro ver. 1.15 (Technelysium Pty Ltd), pero ninguno el esperado para organismos haliótidos.

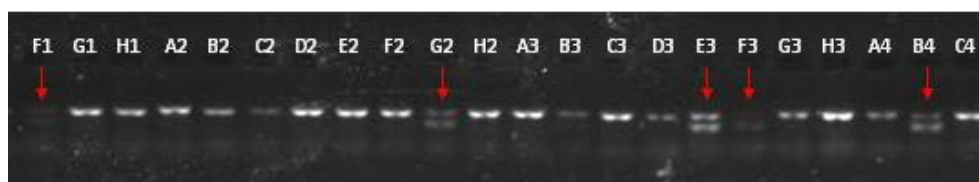


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, digestión enzimática con *DdeI*. Muestras de la estación LB07, se encuentran señaladas con flechas las muestras donde se obtuvo un resultado de corte efectivo.

Subsecuentemente se llevaron a cabo ensayos de restricción para las estaciones LB01, LB05, LB07 y LB10 (Figs. 20-23), siendo la estación LB07 la única que mostró especímenes con un patrón de restricción aparentemente similar al de haliótidos, sin embargo, en el análisis de secuencias ninguno de éstos presentó similitud con secuencias de organismos haliótidos, en cambio se obtuvieron 2 correspondencias de los especímenes

LB01-A12 y LB07-A1 con alto porcentaje de identidad a las secuencias de organismos del género *Haliotis* spp.

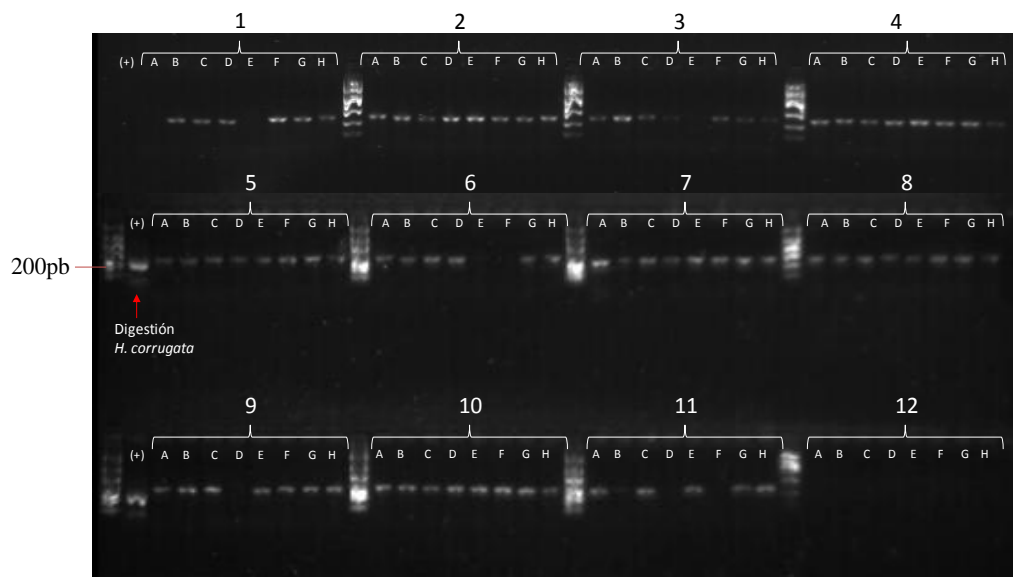


Figura 20. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con *DdeI*. Muestras de la estación LB01 (La Bocana). Las letras y números representan la posición en la placa de PCR en la que se colocaron las muestras.

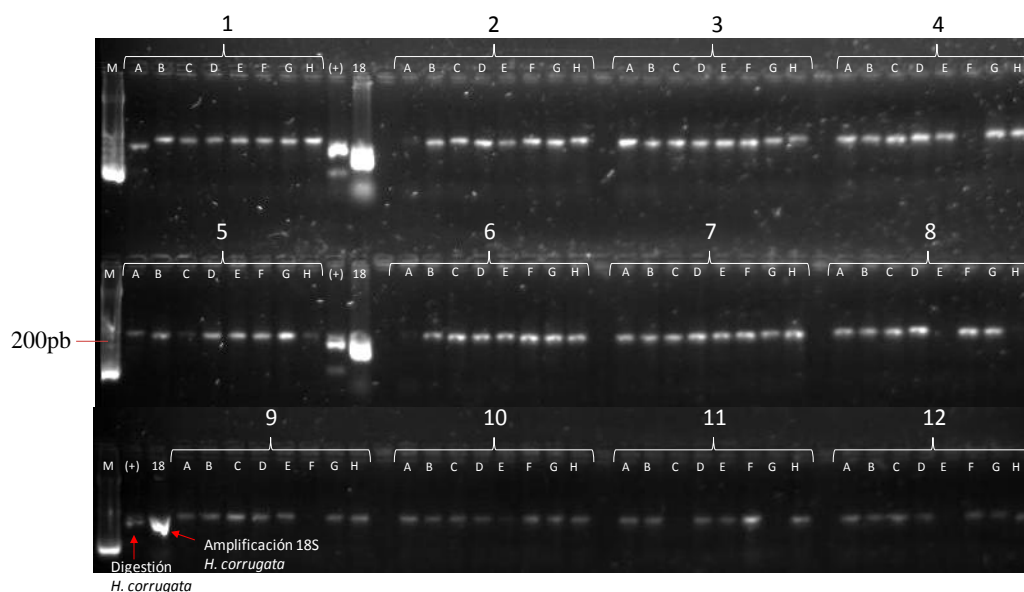


Figura 21. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con *DdeI*. Muestras de la estación LB05 (La Bocana).

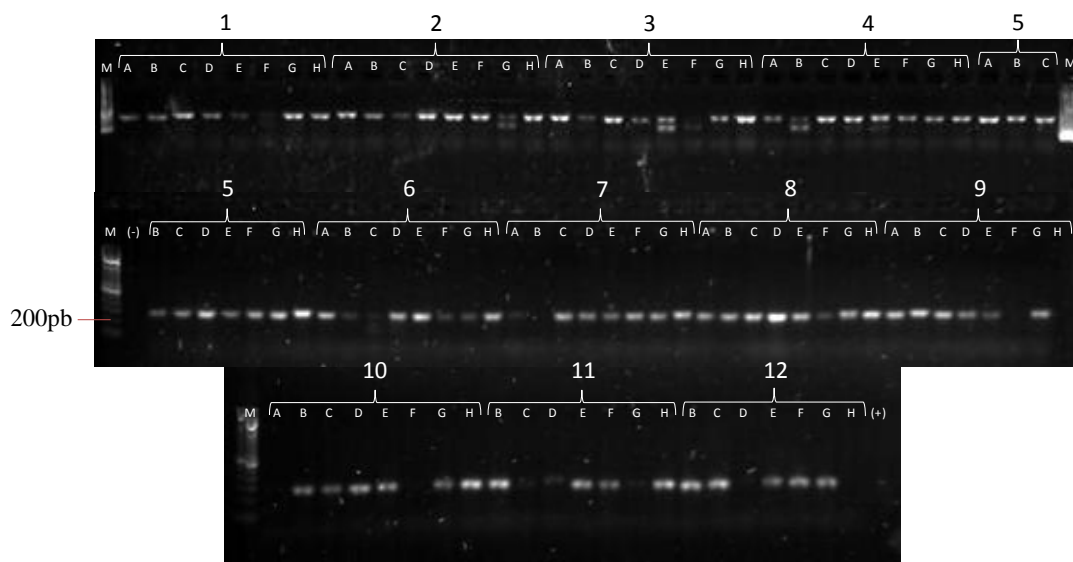


Figura 22. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con *DdeI*. Muestras de la estación LB07 (La Bocana).

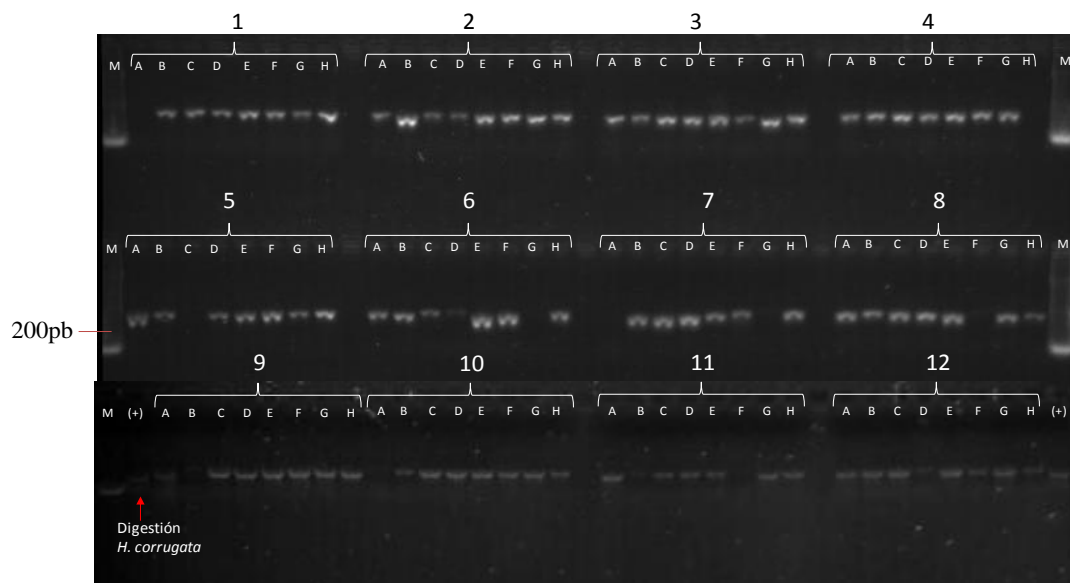


Figura 23. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con *DdeI*. Muestras de la estación LB10 (La Bocana).

Se llevó a cabo el mismo ensayo de restricción para las estaciones de la localidad de Cabo Tosco, CT01, CT02, CT08 y CT13, observando solamente un par de patrones presuntamente positivos en la estación CT02, tres en la estación CT08 y uno más en la estación CT13 (Figs. 24-27), de los cuales se corroboró mediante el análisis de restricción virtual, que dos especímenes de la estación CT08 y el espécimen de la estación CT13 presentaron un sitio de corte, pero no fue el esperado para organismos haliótidos; posteriormente, en el análisis comparativo de secuencias en BLAST se comprobó que ninguno de éstos pertenecía a organismos haliótidos.

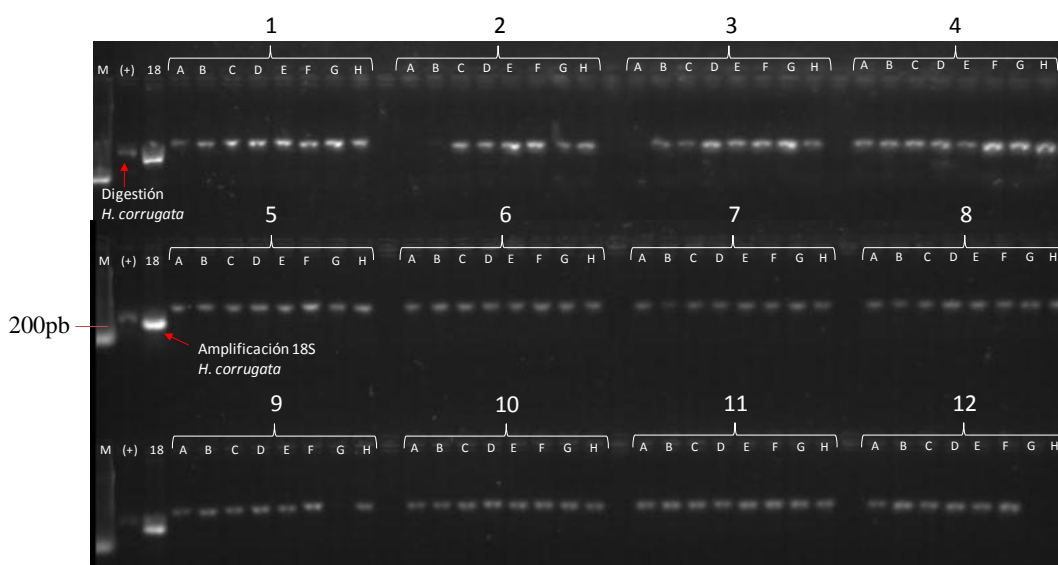


Figura 24. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con *DdeI*. Muestras de la estación CT01 (Cabo Tosco).

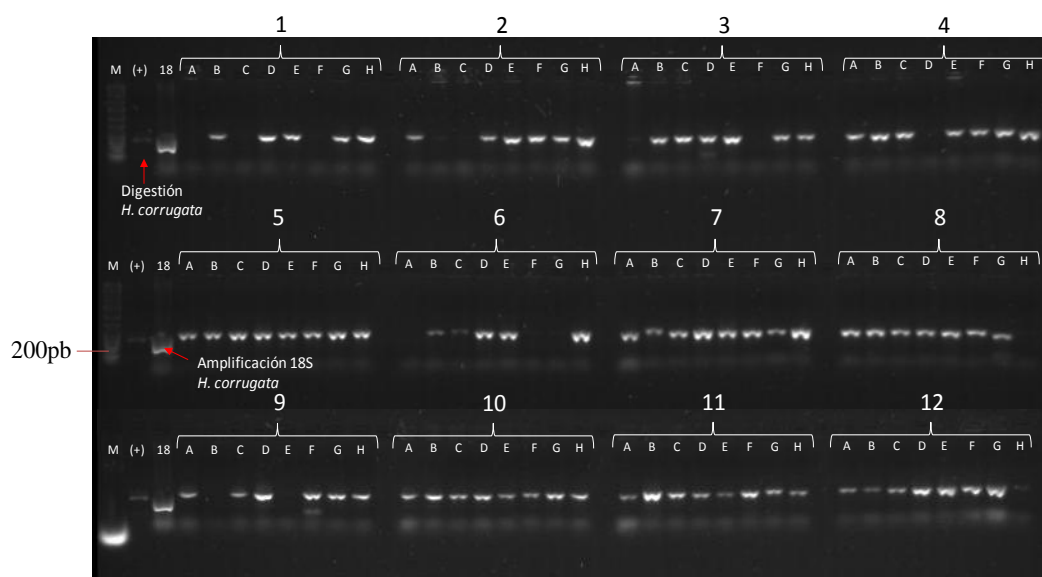


Figura 25. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con *DdeI*. Muestras de la estación CT02 (Cabo Tosco).

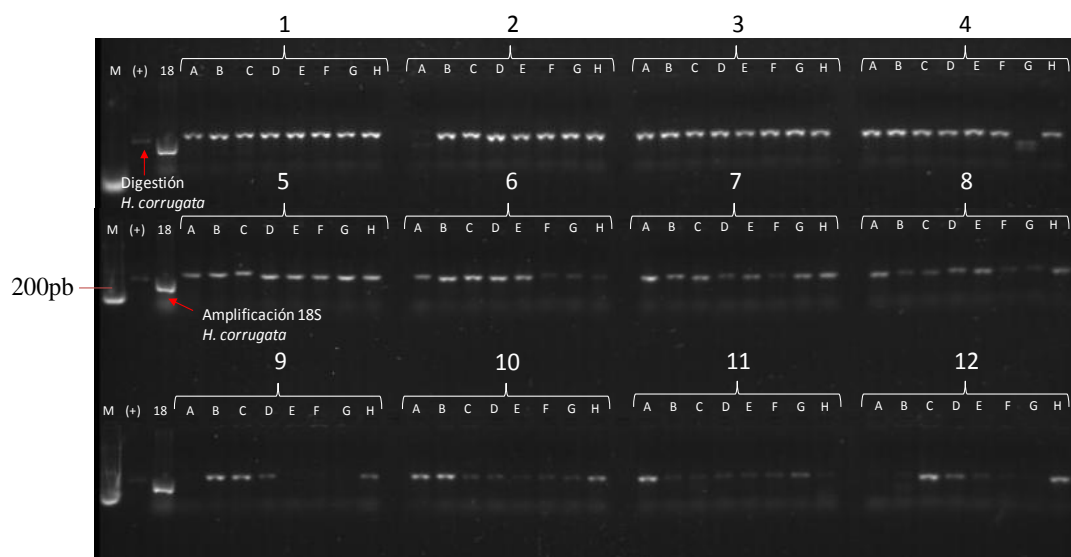


Figura 26. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con *DdeI*. Muestras de la estación CT08 (Cabo Tosco).

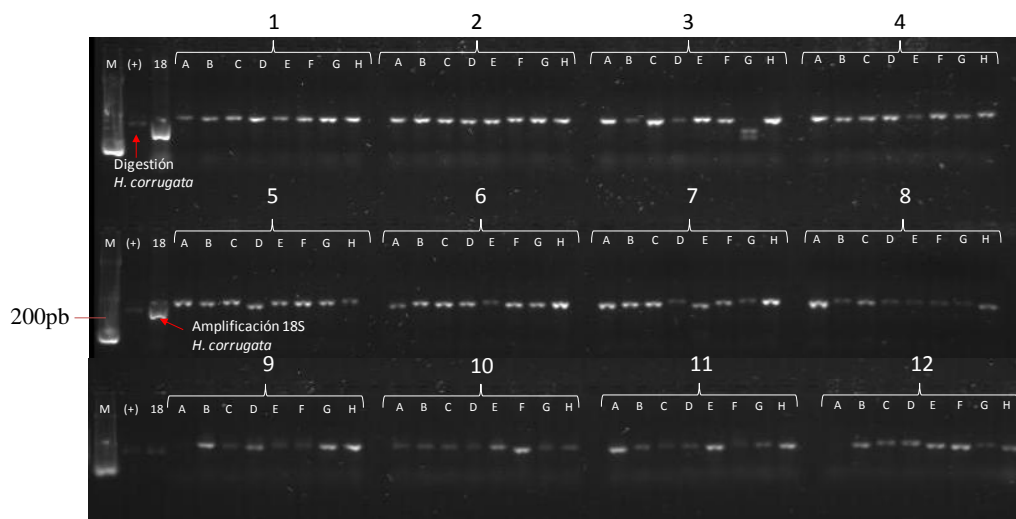


Figura 27. Electroforesis al 1.5% de los productos de la restricción enzimática con *DdeI*. Muestras de la estación CT13 (Cabo Tosco).

Posteriormente se tomaron muestras de ADN de aquellos individuos que presentaron un patrón de corte aparentemente positivo en la restricción enzimática con *DdeI*, para someterla a restricción enzimática con *Sau3AI* y corroborar que éstos individuos pertenecieran al género *Haliotis* spp. (Fig. 28). Los resultados obtenidos muestran concordancia con el análisis de restricción virtual y el análisis comparativo de secuencias con la base de datos del programa BLAST, en el que ninguno de estos especímenes mostró similitud con secuencias de organismos haliótidos.

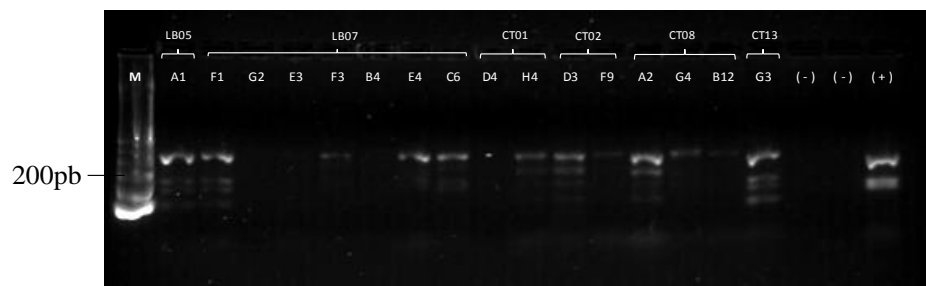


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, digestión con *Sau3AI*. Muestras de las estaciones que presentaron previamente en uno o más organismos un patrón de corte positivo con la enzima *DdeI*. Los controles negativos (-) son coctel de reacción enzimática sin ADN y el control positivo (+) es una muestra de *H. corrugata* sometida al mismo tratamiento de reacción enzimática.

7.2.3 Disociación de Alta Resolución (HRM)

Se llevó a cabo una prueba con el equipo StepOnePlus™ (Applied Biosystems), en donde se analizaron muestras de ADN de 3 organismos adultos (por duplicado) de los géneros *Haliotis*, *Fissurella* y *Megathura*, observando una clara diferenciación por medio de las gráficas de sus temperaturas de fusión (Melting Temperature o Tm's), lo que indica que utilizar el gen 18S para diferenciar a nivel de género es posible en estos organismos (Fig. 29).

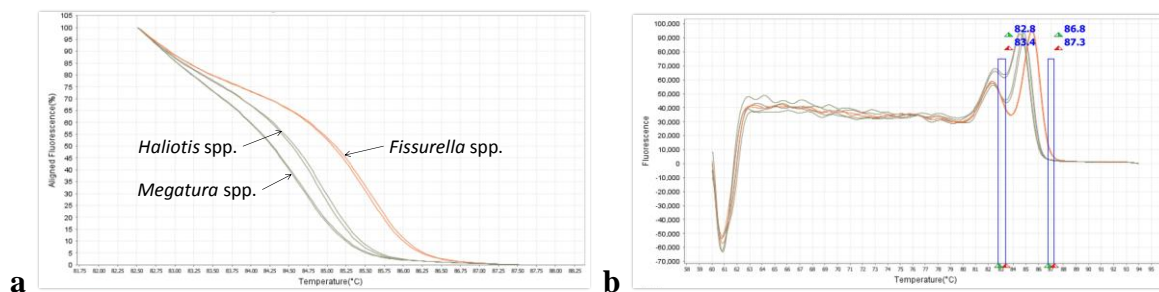


Figura 29. Gráficas generadas por el software HRM v3.0. Curva de disociación (Melt) estándar (a); Curva de disociación (Melt) derivativa, después de que el software generó la 1° derivada negativa del punto de inflexión (b).

En la segunda prueba realizada con el equipo Rotor-Gene™ 6000, se analizaron muestras de ADN de organismos adultos de *Haliotis corrugata*, *Haliotis fulgens* y *Fissurella volcano*, cada una por triplicado en donde se obtuvieron resultados totalmente diferentes a los obtenidos en la prueba anterior, ya que desde la amplificación de los fragmentos se observaron irregularidades (Fig. 30a) y por consecuencia la gráfica generada en la fase de temperatura de fusión se presenta con ruido, lo que dificulta la diferenciación de los organismos analizados (Fig. 30b) Lo anterior indica que el análisis de HRM hasta el momento es más adecuado mediante el equipo StepOnePlus™.

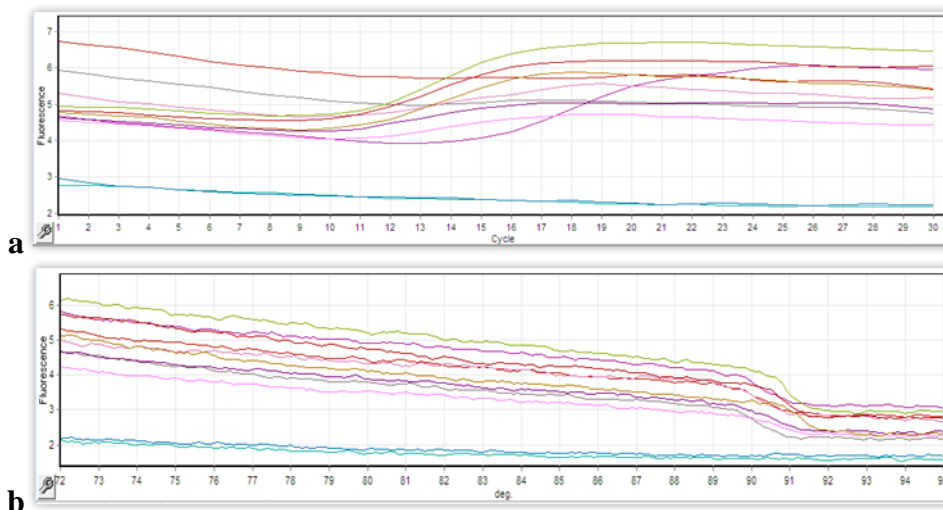


Figura 30. Gráficas generadas por el software Rotor-Gene™ 6000 v.1.7. Gráfica de amplificación (a); Gráfica de fusión del fragmento (b).

7.2.4 Análisis de secuencias del gen 18S ARNr

Se analizaron en total 480 muestras de las estaciones LB01, LB07 y LB10, de la localidad La Bocana, CT01 y CT08 de la localidad de Cabo Tosco, de las cuales se obtuvieron en total 324 secuencias limpias. Con dichas secuencias se realizó el análisis de alineamiento con el programa DnaSP obteniéndose 160 genotipos que, de acuerdo con el análisis comparativo de BLAST en el GenBank correspondieron a 19 órdenes (Tabla III) de los cuales se identificaron 38 familias y 41 géneros (Anexo 1).

Sobresalen caracoles litorinimorfos (Littorinimorpha), babosas de mar del orden Sacoglossa y caracoles neogasterópodos (Neogastropoda).

La mayoría de los genotipos fueron identificados de manera precisa (con valores de porcentaje de identidad superiores al 90% y de la probabilidad de correspondencia $E < 10^{60}$) a nivel de orden y en algunos casos a nivel familia (Anexo 1). Sin embargo, no fue posible la identificación a nivel de especie debido a dos razones: i) un genotipo correspondiente a un solo género dio como resultado 100% de identidad genética con más de una especie (p.ej. genotipo 145 con 100% de identidad con el género *Fissurella* y las especies *F. angusta*, *F. barbadensis*, *F. nubecula* y *F. volcano*); ii) hubo genotipos en los

que no se obtuvo la identidad del 100% con ninguna especie del GenBank (p.ej. genotipos 15, 32, 42 y 93 de la familia Akeridae, género *Akera*).

Se obtuvieron 5 individuos, representados en 3 genotipos, para los cuales solo fue posible determinar la clasificación a nivel de clase (Gastropoda) ya que registraron un elevado porcentaje de identidad (98%) con varios órdenes (Tabla III, Anexo 1).

En la estación LB01, se estimaron 55 genotipos de 83 secuencias limpias, en la estación LB07, 21 genotipos de 74 secuencias limpias, y en la LB10, 52 genotipos a partir de 77 secuencias limpias; para la estación CT01 de la localidad de Cabo Tosco se estimaron 47 genotipos en 90 secuencias limpias, lo que nos indica una gran diversidad de organismos dentro de cada estación.

Se observa una gran abundancia de organismos del orden Littorinimorpha, con 119 individuos sumando las 4 estaciones, y particularmente en la estación LB07 de la localidad de La Bocana, se estimaron 54 individuos pertenecientes a este orden de los 74 analizados. El segundo orden con mayor representación tanto de genotipos como de número de individuos es el de Sacoglossa, con 37 individuos en total de las 4 estaciones analizadas (Tabla III).

La composición de genotipos entre la estación de Cabo Tosco y las 3 estaciones de La Bocana, indica una alta diferenciación. De los 160 genotipos registrados, solamente 5 estuvieron compartidos entre las localidades, por lo que el resto de genotipos de Cabo Tosco (46) y La Bocana (109) fueron exclusivos de las mismas (Anexo 1).

En la localidad de La Bocana, la finalidad de analizar la estación LB01 y LB10 fue para comparar la diversidad de especies encontradas en superficie (LB01) y fondo (LB10) de un mismo punto, identificando 10 órdenes en común, de los cuales se determinó que comparten 15 familias (Anexo 1).

De los 97 genotipos encontrados en estas dos estaciones, el número de compartidos entre superficie (LB01) y fondo (LB10) es únicamente de 10, lo que indica que cada estación tuvo, respectivamente, 45 y 42 genotipos exclusivos. Los órdenes presentes en superficie no representados en la estación de fondo son Archaeogastropoda, Bivalbulida (Cnidaria),

Cheilostomatida y Euphausiacea (Arthropoda); en el caso inverso presentes en LB10 pero no en LB01, se tienen los órdenes Calanoida (Arthropoda) y Cycloneritimorpha.

Cabe destacar que los órdenes Cephalaspidea y Cycloneritimorpha se encontraron solamente en las estaciones LB01 y CT01; los órdenes Neotaenioglossa y Thecostomata se encontraron sólo en las estaciones de la localidad de La Bocana y no en Cabo Tosco.

Tabla III Listado de órdenes representados en los diferentes genotipos y porcentaje (%) de identidad.

ORDEN	No. Genotipos	% de identidad	Valor de E
Anaspidea	8	98-99	>3E-93
Archaeogastropoda	6	95-100	>9E-74
Archaeopulmonata	1	99	5E-101
Bivalvulida ¹	1	82	3E-27
Calanoida ²	1	100	*
Cephalaspidea	8	92-99	>1E-76
Cheilostomatida	1	95	2E-70
Cumacea ²	1	83	*
Cycloneritimorpha	8	98-99	>2E-89
Euphausiacea ²	3	99-100	>8E-94
Heterostropha	6	96-97	>4E-77
Littorinimorpha	37	95-100	>5E-81
Neogastropoda	17	96-99	>1E-82
Neotaenioglossa	9	97-99	>9E-84
Nudibranchia	12	92-99	>5E-81
Patellogastropoda	1	100	7E-156
Pleurobranchomorpha	3	95	>7E-60
Sacoglossa	22	95-100	>2E-80
Thecosomata	12	98-100	1E-87
Mollusca; Gastropoda ³	3	97-98	*
TOTAL	160		

¹ Fila Cnidaria.

² Fila Arthropoda

³ Especímenes que no pudieron ser identificados más allá de fila y clase.

* Especímenes que presentaron mismos valores de E para varios órdenes.

7.4 Análisis filogenético

En una primera aproximación, se obtuvieron árboles filogenéticos agrupando los genotipos de cada una de las estaciones LB01, LB07, LB10 y CT01 (Figs. 31-34), haciendo uso del programa MEGA v 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

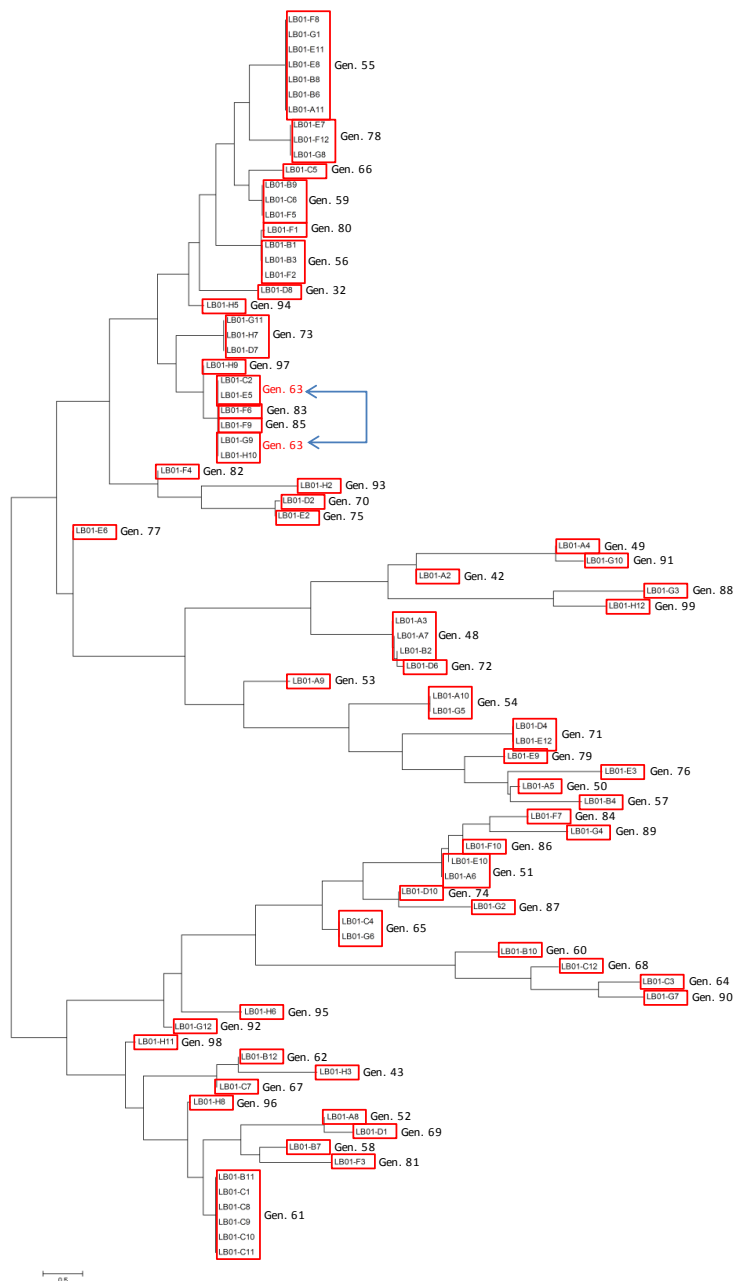


Figura 31. Árbol filogenético de la estación LB01 de la localidad de La Bocana.

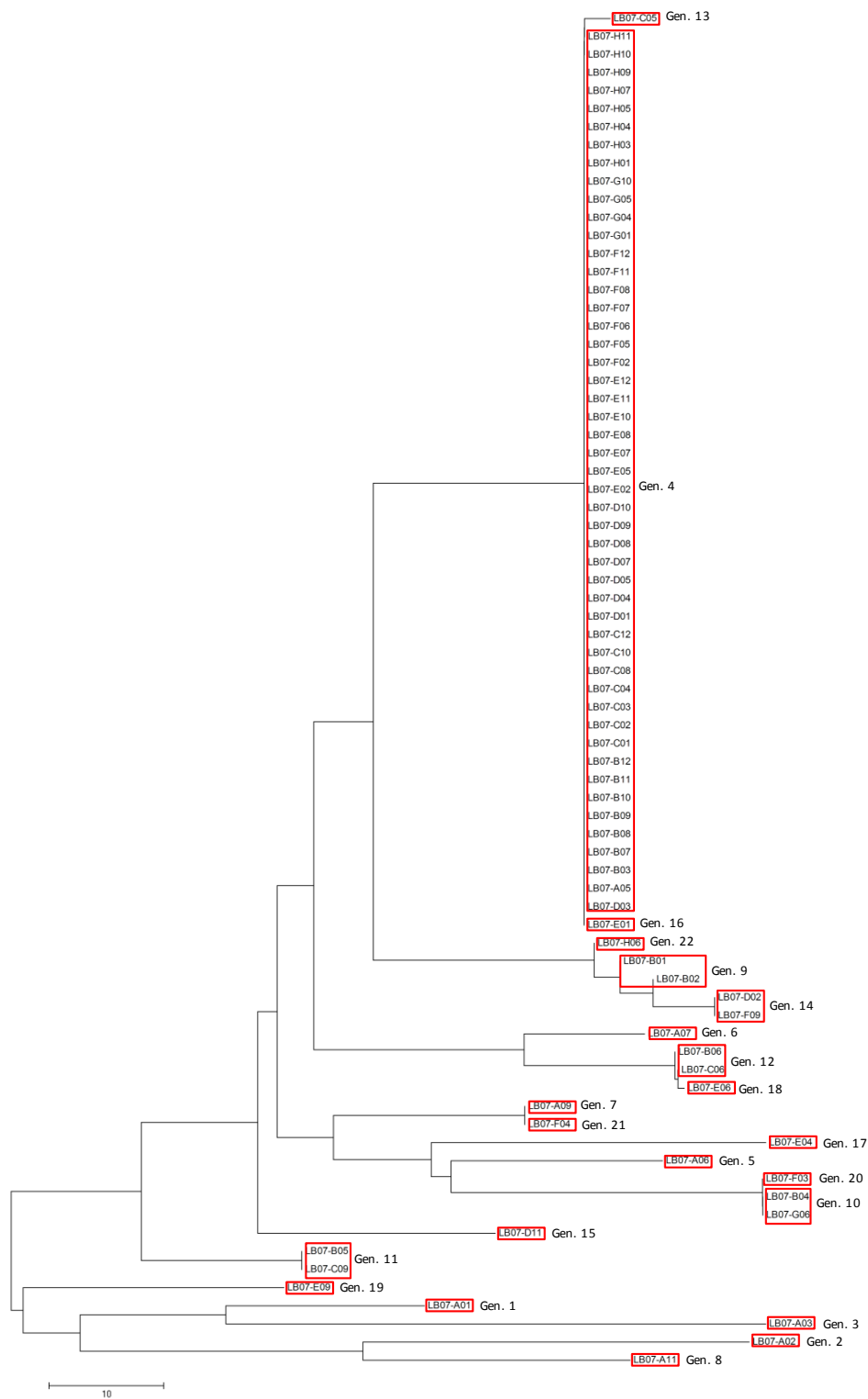


Figura 32. Árbol filogenético de la estación LB07 de la localidad de La Bocana.

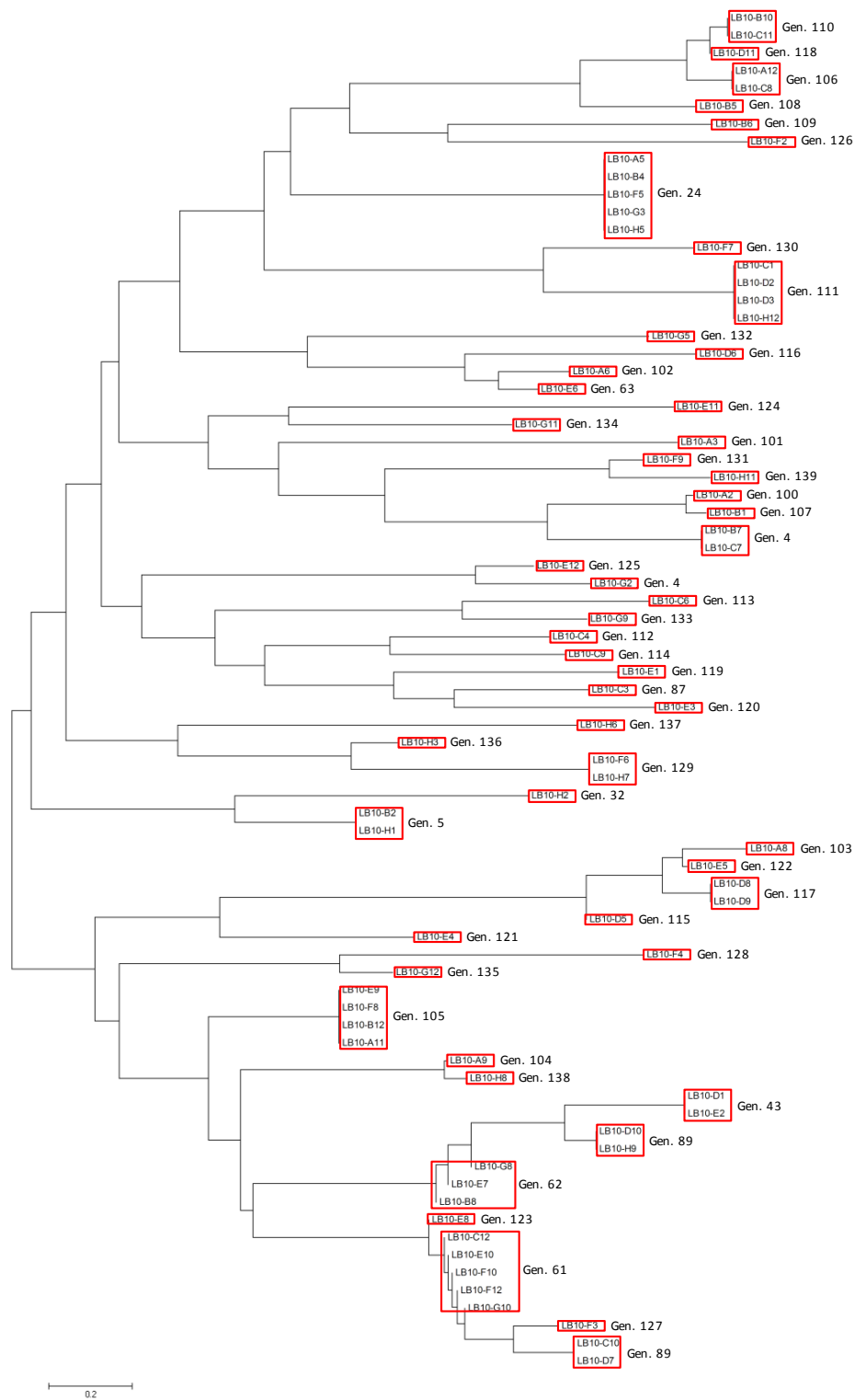


Figura 33. Árbol filogenético de la estación LB10 de la localidad de La Bocana.

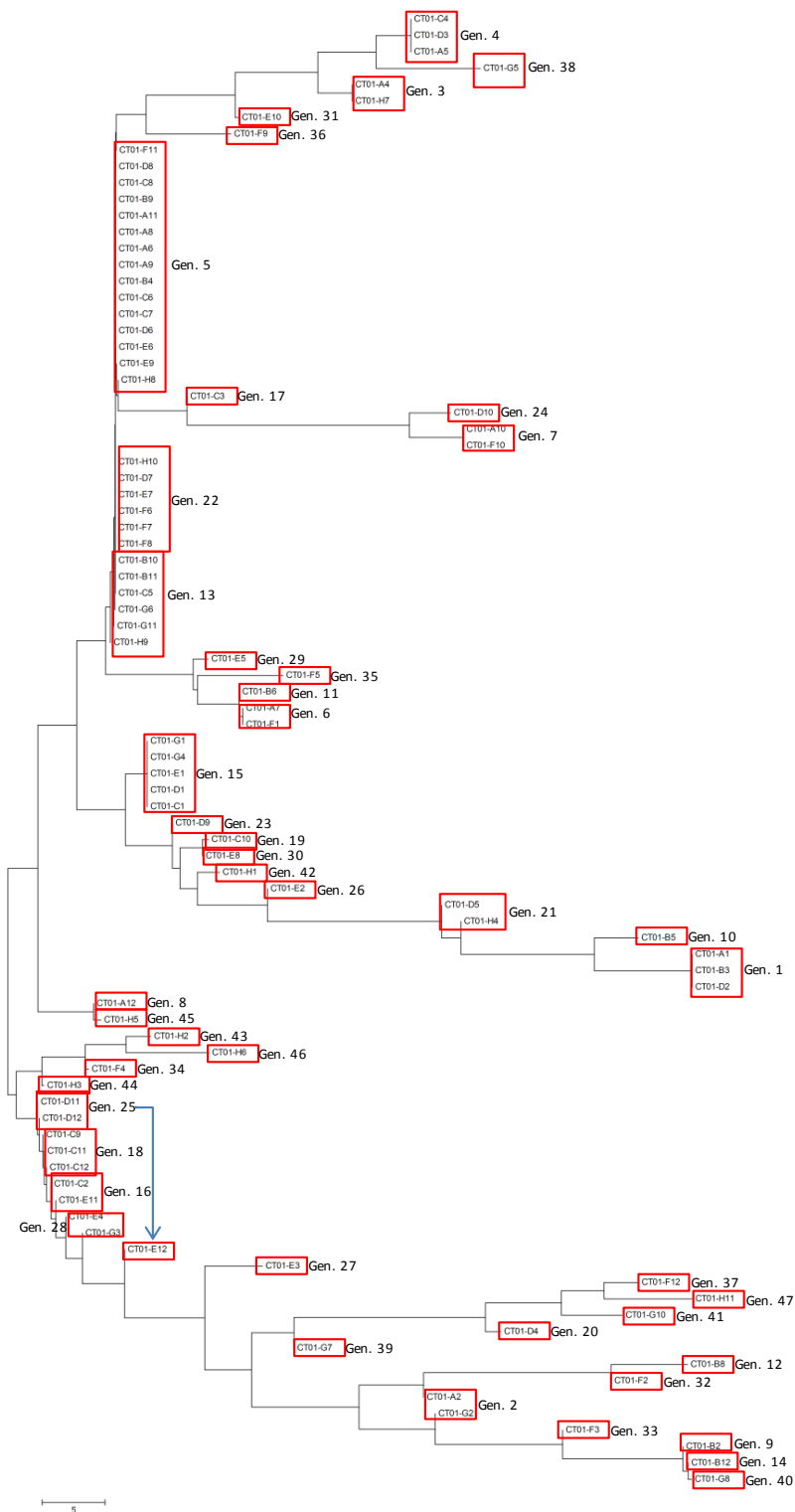


Figura 34. Árbol filogenético de la estación CT01 de la localidad de Cabo Tosco.

En éste análisis se pueden observar las relaciones filogenéticas entre los individuos de cada estación, así como la representación de cada uno de los genotipos obtenidos en el análisis con el programa DnaSP, aunque cabe destacar que algunos individuos pertenecientes a presuntos diferentes genotipos no se presentan con una relación filogenética separada como se esperaba observar o viceversa, tal es el caso de la estación LB01 (Fig 31), donde la relación filogenética entre los individuos C2, E5, F6, F9, G9 y H10 es estrechamente cercana, mientras que el análisis de genotipos indica que se trata de tres genotipos diferentes.

De forma inversa, en la estación CT01 (Fig. 34) se observa una relación distante entre los individuos D11, D12 y E12, en tanto que el análisis de genotipos indica que se trata de individuos con un genotipo idéntico.

8 DISCUSIÓN

8.1 Diseño de sondas tipo Molecular Beacon

Actualmente, el uso de sondas moleculares del tipo Molecular Beacon, TaqMan y otras, ha sido aplicado principalmente en análisis clínicos que requieren precisión en la detección de parásitos como los causantes de la malaria, diversos virus, diagnóstico de enfermedades genéticas, expresión de genes etc. obteniendo resultados bastante positivos para su aplicación oportuna en tiempo real (Heid *et al.*, 1996 [TaqMan]; Fang *et al.*, 1999 [MB]; Rougemont *et al.*, 2004 [TaqMan-18S], Elsayed *et al.*, 2006 [MB]). En el campo de la Ecología Marina se están implementando cada vez con mayor frecuencia para la identificación de especies, como es el caso de Banks *et al.* (1993), quienes utilizaron sondas para distinguir entre tres especies de ostras y en otros estudios se han utilizado sondas para distinguir entre diferentes especies de organismos marinos en estadio larvario (Olson *et al.*, 1991; Medeiros-Bergen *et al.*, 1995); también se han referido al estudio de las dinámicas de floraciones algales nocivas (Tyrrell *et al.*, 1997), y en todos los casos se busca la estandarización de éste método, por sí solo o en combinación con otros métodos moleculares para su aplicación práctica en cualquier laboratorio molecular y sin la necesidad de un experto en taxonomía.

En este estudio se logró la obtención de dos sondas moleculares de tipo Molecular Beacon, las cuales son capaces de reconocer las secuencias de moluscos gasterópodos para las que fueron diseñadas, y si bien no se logró alcanzar la estandarización del método, la eficacia de las sondas fue corroborada con la utilización de geles de agarosa visualizados en el equipo apropiado para la detección de la fluorescencia emitida por las sondas. Esto deja como antecedente la practicidad de la aplicación de estas sondas en PCR en tiempo real para el estudio de dinámica larvaria o reclutamiento ya que el método ofrece múltiples ventajas: 1) un mecanismo de transducción de señal inherente para una alta sensibilidad (Tyagi y Kramer, 1996), 2) la habilidad de detectar el híbrido sonda-blanco sin necesidad de separar las sondas hibridizadas de las no hibridizadas (Fang *et al.*, 2000; Tan *et al.*,

2000), 3) una especificidad aumentada sobre las sondas de ADN lineares tradicionales, i.e., la capacidad de distinguir la incompatibilidad de una sola base (Tyagi y Kramer, 1996; Sokol *et al.*, 1998; Perlette y Tan, 2001; Matsuo, 1998; Fang *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2000), y 4) se lleva a cabo en un sistema cerrado en tubo y no requiere manipulación post-PCR de la muestra, lo que reduce el riesgo de contaminación en el laboratorio debido a que los productos amplificados pueden ser analizados y eliminados sin abrir los tubos de reacción (Heid *et al.*, 1996).

Con los resultados obtenidos tanto en las pruebas con los equipos de qPCR como en los de PCR convencional, no se puede descartar una falla técnica aún no identificada o incluso la utilización de material inapropiado, considerando que los equipos utilizados no habían sido probados previamente para ésta técnica y por supuesto, siempre tomar en consideración que en los procedimientos basados en PCR puede haber inhibición de PCR debida a contaminantes de ADN, potenciales causantes de falsos negativos (Bott *et al.*, 2010).

8.2 Restricción enzimática (RFLP)

Se logró la obtención de patrones de restricción discriminantes para la identificación de moluscos gasterópodos con ambas enzimas seleccionadas, *DdeI* y *Sau3AI* en las pruebas con ADN de organismos adultos de los cuales se tenía conocimiento previo de la especie. La utilización de enzimas de restricción en combinación con PCR para la discriminación o identificación de especies ha resultado bastante exitosa en estudios previos, tales como el realizado por Silberman y Walsh (1992), que identificaron larvas de tres especies de langosta con datos obtenidos de la restricción del gen 28S ARN; Bell y Grassle, (1998) han utilizado una combinación de sondas moleculares con RFLP del gen 18S para la identificación de la almeja *Spisula solidissima*; Scholin y Anderson (1994) utilizaron PCR-RFLP para distinguir entre seis especies del género de dinoflagelados *Alexandrium*; Fernandez-Tajes y Mendez (2007) discriminaron almejas del género *Ensis* con el gen 5S ARNr y Yamasaki *et al.* (2006) emplearon RFLP del gen mitochondrial citocromo C oxidasa subunidad 1 (COI) para identificar el cangrejo japonés *Eriocheir japonica*. En

general, el análisis de sitios de restricción se reporta como una técnica bastante útil en estudios de población o estudios de especies estrechamente relacionadas donde es indispensable muestrear una gran cantidad de individuos (Dowling *et al.*, 1990).

Las inconsistencias observadas en algunas muestras larvarias de campo al momento de la visualización en geles de agarosa, específicamente la detección de carriles vacíos, podría tener varias explicaciones, como la falta de templado o una amplificación fallida que podría tener origen durante el proceso de separación y transferencia de larvas a los tubos donde fue llevada a cabo la reacción tanto de amplificación y posteriormente de restricción, lo cual ya ha sido reportado previamente (Bell y Grassle, 1998). Otras razones aceptadas podrían ser que se presentara una muerte larvaria y degradación del ADN antes de la preservación, baja preservación, errores técnicos, impurezas químicas o la posible inclusión de organismos pertenecientes a órdenes cuya secuencia nucleotídica no pudo ser reconocida por los cebadores de 18S α 2 utilizados en este trabajo (Evans *et al.*, 1998; Medeiros-Bergen *et al.*, 1995).

En las muestras donde se obtuvieron cortes presuntamente positivos (con un patrón de corte similar al de haliótidos) y que el análisis de secuencias dio un resultado diferente al de haliótidos, podría tratarse de la falta de resolución de bandas de los geles de agarosa que no distinguen diferencias de pocas bases nucleotídicas. Este problema pudo ser detectado al someter las mismas muestras a la validación con la segunda enzima seleccionada (*Sau3AI*) y al aumentar el porcentaje de concentración de agarosa en la preparación de los geles (2%), con la cual las bandas pudieron separarse de manera clara permitiendo la discriminación de las muestras; además también se corroboró con el porcentaje de identidad observado con otros organismos diferentes a haliótidos en la alineación de secuencias con la base de datos en BLAST (Stephen *et al.*, 1990).

En resumen, la diferenciación de larvas (en este estudio de haliótidos) es posible mediante la metodología de los RFLPs considerando la necesidad de realizar la digestión del amplicón con al menos dos enzimas (*DdeI* y *Sau3AI* para haliótidos) y analizando por electroforesis en geles de mayor resolución. La identificación de otras familias sería factible sobre la base de los polimorfismos específicos que tengan.

8.3 Disociación de Alta Resolución (HRM)

Los resultados preliminares obtenidos con ésta técnica muestran potencial en la discriminación de organismos utilizando el marcador molecular 18S ARNr, logrando diferenciar secuencias pertenecientes a diferentes géneros con la implementación de reactivos y equipo especializado (Applied Biosystems). Este tipo de ensayo permite un rápido análisis post-PCR de variantes en secuencias o cepas/especies, o una validación de la presencia de un amplicón blanco en una muestra basada en la consistencia de la curva de disociación con estándares de ADN definidos; las moléculas colorantes intercalantes se unen y permiten la detección de cualquier ADN de doble hebra, lo que representa una gran ventaja pero a la vez la unión potencial a productos no específicos y a dímeros de cebadores, por lo que se requiere una optimización cuidadosa de la PCR para determinar las concentraciones óptimas del colorante intercalante, aunque generalmente el uso de las aplicaciones post-PCR como lo es el análisis de disociación (HRM) permite distinguir entre un producto no específico, dímeros de cebador y un amplicón de PCR (Bott *et al.*, 2010). Estudios previos reportan un bajo desempeño del colorante SYBR Green I en su aplicación en la técnica de HRM, en comparación con otros especialmente diseñados para ella, así como la inhibición de la reacción de amplificación cuando se agregan concentraciones elevadas (Reed *et al.*, 2007; Wittwer *et al.*, 2003; Herrmann *et al.*, 2006), lo que podría explicar la baja calidad de las amplificaciones obtenidas en la segunda prueba realizada con el equipo Rotor-Gene™ 6000, y podría indicar un exceso en la concentración del colorante SYBR Green I utilizado en el presente estudio.

No obstante, ésta técnica es hoy en día de las más prometedoras, pero la mayoría de los estudios se encuentran en el campo de la biotecnología y área clínica ya que permite la medición exacta de la fluorescencia del colorante intercalante en el proceso de disociación de la doble hebra de ADN (Reed y Wittwer 2004), es un método poderoso, rápido y relativamente barato para detectar mutaciones (Reed y Wittwer 2004; Zhou *et al.* 2005; Erali *et al.*, 2008); se ha utilizado en numerosos estudios para el diagnóstico de enfermedades ocasionadas por microorganismos, mutaciones en genes de importancia metabólica y especialmente en estudios de genotipificación, polimorfismos de un

nucleótido (SNP), entre otras aplicaciones clínicas (Hussein *et al.*, 2009; Wittwer *et al.*, 2003; Liew *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005)

La principal ventaja de un análisis de curvas de disociación es que, en lugar de solamente determinar la presencia o ausencia de un alelo específico, el método puede abordar una región entera con el uso de sondas. Estas y todas las ventajas antes mencionadas ya están siendo aprovechadas en el campo de la biología marina, aunque aun son pocos los estudios que se han realizado, éstos abordan principalmente aproximaciones para posibles aplicaciones en campo o alternativas para métodos como genotipificación de poblaciones silvestres (Bott *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2010).

8.4 Análisis de secuencias del gen 18S ARNr

El uso del marcador molecular 18S ARNr, mediante el análisis BLAST (Stephen *et al.*, 1990) con secuencias reportadas en GenBank, permitió llegar a una identificación en el nivel taxonómico de Orden y en la mayoría de los casos (82 de 97 genotipos) con altos porcentajes de identidad (>92%) hasta Familia (Anexo 1). Si bien en algunos casos se obtuvieron porcentajes de identidad bastante altos a nivel de Género (>91%), a fin de estandarizar el nivel de identificación para el presente estudio se considera más confiable hasta el nivel de Familia. En ocasiones, los porcentajes de identidad fueron lo suficientemente altos entre varias familias como para definir cuál era la correspondencia más cercana, tal fue el caso de algunos genotipos de los órdenes Cephalaspidea, Littorinimorpha, Neogastropoda, Nudibranchia y Sacoglossa, cuando esto ocurrió, la identificación se dejó hasta el nivel de Orden (Anexo 1).

La mayoría de los estudios realizados previamente en donde se utilizan secuencias de la subunidad pequeña de ARNr en eucariotas multicelulares se han referido a las relaciones taxonómicas más altas, en el nivel de filas y clases (Hillis y Dixon, 1991). Sin embargo, existen algunos impedimentos prevalecientes en la secuenciación de organismos representativos de ciertos taxones, como es el caso de las clases de moluscos Solenogastres y Tryblidia (Okusu y Giribet, 2003; Giribet *et al.*, 2006); el fracaso en la obtención de

secuencias de 18S para un taxón es considerado un fenómeno común, pero raramente es reportado y contrario a las grandes expectativas, este gen no puede resolver los nodos en todos los niveles taxonómicos, además su eficacia varía considerablemente entre clados (Meyer *et al.*, 2010), esto ha sido discutido como un efecto de una rápida radiación antigua durante periodos breves (Abouheif *et al.*, 1998). Por consecuencia, los análisis con múltiples genes son considerados actualmente sinérgicos y más confiables para llegar a la identificación molecular de un nivel taxonómico más cercano al de género o especie (Anne, 2006), o en la obtención de eventos más lejanos en las ramificaciones de los metazoos, sin embargo el gen 18S sigue siendo utilizado ampliamente en los análisis filogenéticos (Meyer *et al.*, 2010).

Previamente, el gen 18S ha sido utilizado en la certificación de abulón enlatado para su comercialización, logrando una identificación a nivel de género en muestras de tejido fresco y producto enlatado de organismos adultos (Aranceta-Garza *et al.*, 2011), así como marcador filogenético en gasterópodos diferenciando exitosamente abulones de otros moluscos (Geiger y Thacker, 2005; Yoon y Kim, 2005; 2007).

El gen de la citocromo C oxidasa subunidad 1 (COI) presenta atributos que lo hacen elegible para la identificación de especies, incluyendo algunas regiones conservadas que permiten el desarrollo de cebadores universales para PCR, y una variación suficiente entre especies que permite su uso para discriminar en este nivel de taxón y el acceso gratuito a una base de datos de código de barras que representa un gran recurso para la ecología marina (Burton, 2009).

Sin embargo, al igual que el recurso en línea de BLAST (Stephen *et al.*, 1990), estas bases de datos se encuentran limitadas al estudio y reporte previo de determinadas especies para las cuales puede no existir un registro en la actualidad. No obstante, las relaciones evolutivas entre las secuencias de ADN significan que incluso cuando no existe coincidencia exacta reportada, los datos de la secuencia de ADN generalmente puede proporcionar por lo menos alguna información taxonómica sobre el espécimen como por ejemplo, la identificación de una especie relacionada (Burton, 2009).

Para todo el conjunto de estaciones secuenciadas y analizadas en el presente estudio, se determinó una alta diversidad de organismos correspondientes al filo Mollusca, clase Gastropoda con 317 individuos correspondientes a 15 órdenes. Esta alta diversidad sugiere que el tamaño de muestra debe ser incrementado para la realización de estudios ecológicos comparativos de la diversidad de las localidades de estudio.

Un resultado inesperado fue la obtención de 7 individuos correspondientes a otras filas distintas a la Mollusca (Arthropoda y Cnidaria), lo que podría deberse a organismos oportunistas en las conchas vacías de los gasterópodos encontrados en las muestras de campo o posibles presas de las que se alimenta el molusco que se encontraba originalmente en la concha. Previamente, se ha reportado la presencia de ADN exógeno en especies de moluscos presumiblemente debido a contaminación de la muestra con células de otros organismos presentes en el tracto digestivo (Meyer *et al.*, 2010) o de nematocistos de cnidarios que se asocian a moluscos aplacóforos (Okusu y Giribet, 2003), lo que puede resultar en la sub- o sobreestimación de biodiversidad en programas de análisis con muestras ambientales.

En cuanto a las secuencias que no pudieron ser utilizadas para ningún análisis y se reportaron como “sucias”, posiblemente se deba también a una contaminación, ya que algo similar a lo obtenido en este estudio lo reportan Osuku y Giribet (2003), donde obtuvieron múltiples productos de PCR de tamaño idéntico y en los cromatogramas de las secuencias se reflejaba en múltiples picos superpuestos.

8.3 Análisis filogenético

La identificación molecular de larvas es un paso clave en el entendimiento de los procesos de dispersión y reclutamiento que tiene repercusiones importantes en el ámbito ecológico y económico, especialmente en aquellas especies de importancia comercial (Bell y Grassle, 1998; Coffroth y Mulawka, 1995; Morgan y Rogers, 2001; Evans *et al.*, 1998). Una vez que se logra llegar a la identificación molecular de especies, es posible analizar las relaciones que existen entre los organismos encontrados, desde filogenéticas hasta de

parentesco, comparando y agrupando las secuencias, dependiendo del marcador molecular que se haya elegido en base en la finalidad del estudio (Medeiros-Bergen *et al.*, 1995; Scheltema y Rice, 1990; Pedrotti y Fenaux, 1992; Morgan y Rogers, 2001; Evans *et al.*, 1998).

Otras aplicaciones en Ecología incluyen análisis de diversidad (Barber y Boyce, 2006), donde el uso de otros genes conservados como el de la citocromo C oxidasa I (COI) y con las crecientes bases de datos en línea con secuencias obtenidas a partir de organismos adultos perfectamente identificados, permite caracterizar la diversidad de un sitio, aún sin tener amplio conocimiento en la taxonomía de especies.

El análisis de diversidad de genotipos mostró una variabilidad muy elevada con 160 genotipos de 324 especímenes, lo que indica que, en promedio, cada genotipo tuvo dos ejemplares. Para sacar conclusiones del análisis comparativo de la diversidad es necesario incrementar el tamaño de muestra al menos al número estimado sobre la base de la ecuación 1 (ver metodología) de 330 ejemplares por estación.

En este estudio se llevó a cabo un análisis de la relación filogenética entre los organismos encontrados en cada localidad para tratar de dilucidar la cercanía de los genotipos generados por el análisis previo de las secuencias obtenidas de cada espécimen, observando agrupaciones cercanas de los individuos correspondientes a un mismo genotipo, aunque no en un mismo clado. Una posible explicación a éste fenómeno, podría ser la diferencia en la longitud de la secuencia de cada espécimen, lo que el programa utilizado (MEGA v. 4.0) podría haber interpretado como genotipos diferentes en base al grado de similitud entre ellas.

No obstante, al momento de hacer el análisis comparativo de los diferentes genotipos con secuencias reportadas en GenBank, varios de éstos correspondían al mismo orden o incluso a la misma familia, confirmando así que la topología de los árboles podría estar influenciada por el tamaño de las secuencias analizadas.

9 CONCLUSIONES

1. La identificación molecular de larvas de moluscos gasterópodos en muestras de plancton utilizando el gen 18S ARNr es factible mediante análisis de RFLPs y secuenciación.
2. La diferenciación de larvas de haliótidos es factible mediante el análisis de RFLPs basado en el gen 18S ARNr digerido con dos enzimas: *DdeI* y *Sau3AI*. Se recomienda hacer electroforesis en geles de mayor resolución. La identificación de otras familias o géneros sería factible sobre la base de los polimorfismos específicos de éstos.
3. El análisis de las secuencias del gen 18S ARNr permitió la identificación molecular de larvas obtenidas de un arrastre de plancton a distintos niveles taxonómicos, principalmente orden y familia. Sin embargo, este gen no presenta suficiente variación que permita la diferenciación a nivel de género o especie.
4. La aplicación de las técnicas derivadas de las sondas Molecular Beacon y Disociación de Alta Resolución (HRM) tienen el potencial de diferenciar organismos del género *Haliotis* de otras especies de moluscos. Para estudios posteriores se recomienda evaluar su potencialidad en la identificación de larvas de dicho género.
5. Se registró una alta diversidad de genotipos (154) de moluscos gasterópodos representantes de 15 órdenes. De éstos, 125 genotipos pudieron ser identificados a nivel familia con un porcentaje de identidad genética de al menos el 90%, respecto a secuencias del GenBank. Para la realización de estudios ecológicos de diversidad de especies (o genotipos) se recomienda incrementar el tamaño de muestra.

6. La mayor diversidad de genotipos se registró en La Bocana en las estaciones de superficie y fondo (LB01 y LB10), las cuales compartieron casi la totalidad de los órdenes identificados. Entre las localidades de La Bocana y Cabo Tosco también se encontró similitud en los órdenes presentes, pero ésta fue menor que la observada entre las estaciones de la localidad de La Bocana (LB01, LB07 y LB10).

7. En una primera aproximación, los resultados obtenidos de la utilización del análisis de secuencias permitieron la obtención de relaciones filogenéticas y su comparación entre las estaciones en estudio.

10 LITERATURA CITADA

- Abouheif, E., R. Zardoya, A. Meyer. 1998. Limitations of Metazoan 18S rRNA Sequence Data: Implications for Reconstructing a Phylogeny of the Animal Kingdom and Inferring the Reality of the Cambrian Explosion. *J Mol Evol.* 47(4):394-405.
- Akimoto, S., S. Itoi, K. Sezaki, P. Borsa, S. Watabe. 2006. Identification of alfonsino, *Beryx mollis* and *B.splendens* collected in Japan, based on the mitochondrial cytochrome b gene, and their comparison with those collected in New Caledonia. *Fish Sci.* 72:202–207.
- André, C., M. Lindergarth, P.R. Jonsson, P. Sundberg. 1999. Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*. *J Mar Biolog Assoc UK.* 79:563-565.
- Anne, C. 2006. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica.* 127:101–120.
- Aoyama, J., S. Watanabe, M. Nishida, K. Tsukamoto. 2000. Discrimination of catadromous eels of genus *Anguilla* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the mitochondrial 16S ribosomal RNA domain. *Trans Am Fish Soc.* 129:873–878.
- Appels, R., R.L. Honeycutt. 1986. rDNA evolution over a billion years. En *DNA Systematics*. S. K. Dutta (ed.). CRC Press, Boca Raton. 55p.
- Aranceta-Garza, F., R. Perez-Enriquez, P. Cruz. 2011. PCR-SSCP method for genetic differentiation of canned abalone and commercial gastropods in the Mexican retail market. *Food Control.* 22:1015-1020.
- Bakun, A. 1996. *Patterns in the Ocean: Ocean Processes and Marine Population Dynamics*. La Jolla, California: California Sea Grant College System, NOAA. 323p.

- Banks, M.A., D. Hedgecock, C. Waters. 1993. Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 3:129–136.
- Barber, P., S.L. Boyce. 2006. Estimating diversity of Indo-Pacific coral reef stomatopods through DNA barcoding of stomatopod larvae. *Proc. R. Soc. B.* 273:2053-2061.
- Bayha, K.M., W.M. Graham, F.J. Hernandez. 2008. Multiplex assay to identify eggs of three fish species from the northern Gulf of Mexico, using locked nucleic acid Taqman real-time PCR probes. *Aquat Biol.* 4:65–73.
- Beers, J.R. 1976. Volumetric methods. En: Steedmann, H.F. (ed). Zooplankton, fixation and preservation. Monographs on Oceanographic. Methodology. No. 4. UNESCO Press Paris. 5p.
- Bell, J.L., J.P. Grassle. 1998. A DNA probe for identification of larvae of the commercial surfclam (*Spisula solidissima*). *Mol Mar Biol Biotech.* 7(2):127–137.
- Bernard, F. 1895. Première note sur le développement et la morphologie de la coquille chez les lammellibranches. *Bulletin de la Société Géologique de France.* 23:104-154.
- Bott, N.J., K.M. Ophel-Keller, M.T. Sierp, Herdina, K.P. Rowling, A.C. McKay, M.G.K. Loo, J.E. Tanner, M.R. Deveney. 2010. Toward routine, DNA-based detection methods for marine pests. *Biotechnology Advances.* 28:706–714.
- Brink, L. 2001. Mollusca: Bivalvia. En: Shanks, A. (Ed.), An Identification Guide to Larval Marine Invertebrates of the Pacific Northwest. Oregon State University Press, Corvallis, 129-149p.
- Burton, R.S. 1996. Molecular tools in marine ecology. *J Exp Mar Biol Ecol.* 200:85-101.
- Burton, R.S. 2009. Molecular Markers, Natural History, and Conservation of Marine Animals. *BioScience*, 59(10):831-840.
- Cedergen, R., M.W. Gray, Y. Abel, D. Sankoff. 1988. The evolutionary relationships among known life forms. *J Mol Evol.* 28:98–112.

- Chakravorty, S., B. Aladegbami, M. Burday, M. Levi, S.E. Marras, D. Shah, H.H. El-Hajj, F.R. Kramer, D. Alland. 2010. Rapid universal identification of bacterial pathogens from clinical cultures by using a novel sloppy molecular beacon melting temperature signature technique. *J Clin Microbiol.* 48(1):258-67.
- Chanley, P., J.D. Andrews. 1971. Aids for identification of bivalve larvae of Virginia. *Malacologia.* 11:45-119.
- Chiou, L.M., M.C. Chung, P.G. Tung, T. Hsu, J.S. Yang. 2004. The use of egg chorion glycoprotein of *Epinephelus malabaricus* for egg identification. *J Fish Biol.* 65:1614–1621.
- Coffroth, M.A., J.M. Mulawka III. 1995. Identification of marine invertebrate larvae by means of PCR-RAPD species-specific markers. *Limnol Oceanogr.* 40:181-189.
- Courtois de Viçose, G., M.P. Viera, A. Bilbao, M.S. Izquierdo. 2007. Embryonic and larval development of *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve: an indexed micro-photographic sequence. *J Shell Res.* 26(3):847-854.
- Cowen, R.K., C.B. Paris, A. Srinivasan. 2006. Scaling connectivity in marine populations. *Science.* 311:522–527.
- Daniel, L.B., J.E. Graves. 1994. Morphometric and genetic identification of eggs of spring-spawning sciaenids in lower Chesapeake Bay. *Fish Bull.* 92:254–261.
- Domínguez, M., M. Alcaraz. 1983. Larvas de moluscos lamelibranquios de la ría de Pontevedra: Metodología y sistemática. *Investigación Pesquera.* 47:345-357.
- Dowling, T. E., C. Moritz, J.D. Palmer. 1990. Nucleic acids II: restriction site analysis. En D. M. Hillis y C. Moritz (eds.). *Molecular Systematics.* 250-317p. Sinauer Associates, Sunderland.
- Elsayed, S., K. Plewes, D. Church, B. Chow, K. Zhang. 2006. Use of Molecular Beacon probes for real-time PCR detection of *Plasmodium falciparum* and other *Plasmodium* species in peripheral blood specimens. *J Clin Microbiol.* 44(2):622–624.

- Erali, M., K. Voelkerding, C. Wittwer. 2008. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol.* 85:50–58.
- Erwin, D.H., P.W. Signor. 1991. Extinction in an extinction-resistant clade: The evolutionary history of the Gastropoda. En *The Unity of Evolutionary Biology. Proceedings of the 4th International Congress of Systematic and Evolutionary Biology*, 1 (E. C. Dudley, ed.). Dioscorides Press, Portland, OR. 8p.
- Evans, B.S., R.W.G. White, R.D. Ward. 1998. Genetic identification of asteroid larvae from Tasmania, Australia, by PCR-RFLP. *Mol Ecol.* 7:1077-1082.
- Fang, X., X. Liu, S. Schuster, W. Tan. 1999. Designing a Novel Molecular Beacon for Surface-Immobilized DNA Hybridization Studies. *J Am Chem Soc.* 121:2921-2922.
- Fang, X, J.W.J. Li, J. Perlette, W. Tan, K. Wang. 2000. Molecular beacons - novel fluorescent probes. *Anal Chem.* 11:2921–2922.
- Fernandez-Tajes, J., J. Mendez. 2007. Identification of the Razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region. *J Agric Food Chem.* 55:7278–82.
- García-Vázquez, E., P. Álvarez, P. Lopes, N. Karaiskou, J. Pérez, A. Teia, J.L. Martínez, L. Gomes, C. Triantaphyllidis. 2006. PCR-SSCP of the 16S rRNA gene, a simple methodology for species identification of fish eggs and larvae. *Sci Mar.* 70(2):13–21.
- Garland, E.D., C.A. Zimmer. 2002. Techniques for the identification of bivalve larvae. *Mar Ecol Prog Ser.* 225:299-310.
- Geiger, D.L., C.E. Thacker. 2005. Molecular phylogeny of Vetigastropoda reveals non-monophyletic Scissurellidae, Trochoidea, and Fissurelloidea. *Mollusc Res.* 25:47-55.
- Giribet, G., A. Okusu, A.R. Lindgren, S.W. Huff, M. Schroedl, M.K. Nishiguchi. 2006. Evidence for a clade composed of molluscs with serially repeated structures: Monoplacophorans are related to chitons. *Proc Nat Acad Sci.* 103(20):7723-7728.

- Gouy, M., W-H. Li. 1989. Molecular phylogeny of the kingdoms Animalia, Plantae and Fungi. *Mol Biol Evol.* 6:109–122.
- Graves, J.E., M.J. Curtis, P.A. Oeth, R.S. Waples. 1990. Biochemical genetics of southern California basses of the genus *Paralabrax*-Specific identification of fresh and ethanol-fixed individual eggs and early larvae. *Fish Bull.* 88:59–66.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hare, M.P., S.R. Palumbi, C.A. Butman. 2000. Single-step species identification of bivalve larvae using multiplex polymerase chain reaction. *Mar Biol.* 137:953-961.
- Hasegawa, M., T. Hashimoto, J. Adachi, N. Iwabe, T. Miyata. 1993. Early branchings in the evolution of eukaryotes: ancient divergence of *Entamoeba* that lacks mitochondria revealed by protein sequence data. *J Mol Evol.* 36:380–388.
- Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak, P.M. Williams. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-994.
- Hendriks, I.E., L.A. van Duren, P.M.J. Herman. 2005. Image analysis techniques: A tool for the identification of bivalve larvae? *J Sea Res.* 54:151-162.
- Hillis, D.M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annu Rev Ecol Syst.* 18:23-42.
- Hillis, D.M., M.T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology.* 66(4):411-453.
- Hillis, D.M., C. Moritz, C. A. Porter, R.J. Baker. 1991. Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science.* 251:308-310.
- Hiroishi, S., Y. Yuki, E. Yuruzume, Y. Onishi, T. Ikeda, H. Komaki, M. Okiyama. 2004. Identification of formalin-preserved eggs of red sea bream (*Pagrus major*) (Pisces: Sparidae) using monoclonal antibodies. *Fish Bull.* 102:555–560.

- Herrmann, M.G., J.D. Durtschi, L.K. Bromley, C.T. Wittwer, K.V. Voelkerding. 2006. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem.* 52(3):494-503.
- Hosoi-Tanabe, S., Y. Sako. 2005. Species-specific detection and quantification of toxic marine dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* by real-time PCR assay. *Mar Biotechnol.* 7:506-514.
- Hu, Y.P., R.A. Lutz, R.C. Vrijenhoek. 1992. Electrophoretic identification and genetic analysis of bivalve larvae. *Mar Biol.* 113:227-230.
- Hussein, E.M., A.I. Al-Mohammed, A.M. Hussein. 2009. Genetic diversity of *Dientamoeba fragilis* isolates of irritable bowel syndrome patients by high-resolution melting-curve (HRM) analysis. *Parasitol Res.* 105:1053–1060.
- Hyde, J.R., E. Lynn, R. Humphreys, M. Musyl, A.P. West, R. Vetter. 2005. Shipboard identification of fish eggs and larvae by multiplex PCR, and description of fertilized eggs of blue marlin, shortbill spearfish, and wahoo. *Mar Ecol Prog Ser.* 286:269–277.
- Karaiskou, N., A.P. Apostolidis, A. Triantafyllidis, A. Kouvatsi, C. Triantaphyllidis. 2003. Genetic identification and phylogeny of three species of the genus *Trachurus* based on mitochondrial DNA analysis. *Mar Biotechnol.* 5:493–504.
- Kawakami, T., J. Aoyama, K. Tsukamoto. 2010. Morphology of pelagic fish eggs identified using mitochondrial DNA and their distribution in waters west of the Mariana Islands. *Environ Biol Fish.* 87:221–235.
- Kendall, A.W., E.H. Ahlstrom, H.G. Moser. 1984. Early life history stages of fishes and their characters. In: *Ontogeny and Systematics of Fishes* (eds Moser HG, Richards WJ, Cohen DM, Fahay MP, Kendall AW, Richardson SL), pp. 12–22.
- Kochzius, M., M. Nölte, H. Weber, N. Silkenbeumer, S. Hjörleifsdottir, G.O. Hreggvidsson, V. Marteinson, K. Kappel, S. Planes, F. Tinti, A. Magoulas, E. Garcia-Vazquez, C. Turan, C. Hervet, D. Campo-Falgueras, A. Antoniou, M. Landi,

- D. Blohm. 2008. DNA Microarrays for Identifying Fishes. *Mar Biotechnol* 10:207–217.
- Kong, D., L. Gu, H. Shen, H. Mi. 2002. A modified molecular beacon combining the properties of TaqMan probe. *Chem Commun.* 854-855.
- Librado, P., J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25:1451–1452.
- Liew, M., R. Pryor, R. Palais, C. Meadows, M. Erali, E. Lyon. 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem.* 50:1156–64.
- Loosanoff, V.L., H.C. Davis, P. Chanley. 1966. Dimensions and shapes of larvae of some marine bivalve mollusks. *Malacología;* 4:351-435.
- Luikart, G., P.R. England. 1999. Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends Ecol Evol.* 14: 632–638.
- Lutz, R.A. 1985. Identification of bivalve larvae and postlarvae: A review of recent advances. *Am Malacol Bull.* 1:59-78.
- Lutz, R.A, H. Hidu. 1979. Hinge morphogenesis in the shells of larval and early post-larval mussels (*Mytilus edulis* L. and *Modiolus modiolus* L.). *J Mar Biol.* 59:111-121.
- Manaresi, S., B. Mantovani, F. Zaccanti. 2001. Egg to adult identification of 13 freshwater fishes from Italy: a biochemical-genetic key. *Aquat Sci.* 63:182–190.
- Matsuo, T. 1998. In situ visualization of messenger RNA for basic fibroblast growth factor in living cells, *Biochim. Biophys. Acta.* 1379:178–184.
- McArthur, A.G., M.G. Harasewych. 2003. Molecular systematics of the major lineages of the Gastropoda. En: McArthur, A.G., M.G. Harasewych M.G. (eds) *Molecular Systematics and Phylogeography of Mollusks*. Smithsonian Digital Repository. 2nd Edition. Washington, D.C. 20p.

- Medeiros-Bergen, D.E., R.R. Olson, J.A. Conroy, T.D. Kocher. 1995. Distribution of holothurian larvae determined with specie-specific genetic probes. *Limnol Oceanogr.* 40:1225-1235.
- Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. En: Hochacka PW, Mommsen TP (eds) *Molecular biology frontiers*. Elsevier. 6th Edition. Amsterdam. 38p.
- Meyer, A., C. Todt, N.T. Mikkelsen, B. Lieb. 2010. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC Evolutionary Biology.* 2010:10:70.
- Miller, K.M., J. Roughgarden. 1991. Monoclonal antibodies as species-specific probes in oceanographic research: examples with intertidal barnacle larvae. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1:35-47.
- Miller, K.J., B.T Maynard, C.N. Mundy. 2009. Genetic diversity and gene flow in collapsed and healthy abalone fisheries. *Mol Ecol.* 18: 200 211.
- Mindell, D.P., R.L. Honeycutt. 1990. Ribosomal RNA in vertebrates: evolution and phylogenetic applications. *Annu Rev Ecol Syst.* 21:541-566.
- Morgan, T.S., A.D. Rogers. 2001. Specificity and sensitivity of microsatellite markers for the identification of larvae. *Mar Biol.* 139:967-973.
- Mork, J., P. Solemdal, G. Sundnes. 1983. Identification of marine fish eggs: a biochemical genetics approach. *Can J Fish Aquat Sci.* 40:361–369.
- Okusu, A, G. Giribet. 2003. New 18S rRNA sequences from neomenioid aplacophorans and the possible origin of persistent exogenous contamination. *J. Mollusc Studies.* 69(4):385-387.
- Olson, R.R., J.A. Runstadler, T.D. Kocher. 1991. Whose larvae? *Nature.* 351:357-358.
- Onishi, Y., T. Ikeda, S. Hiroishi, M. Okiyama. 2003. Identification of pelagic fish eggs using monoclonal antibody. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 69:170–177.

- Orlowski, S.J., S.S. Herman, R.G. Malsberger, H.N. Pritchard. 1971. Distinguishing cunner and tautog eggs by immunodiffusion. *J Fish Res Board Can.* 29:111–112.
- Paine MA, J.R. McDowell, J.E. Graves. 2008. Specific identification using COI sequence analysis of scombrid larvae collected off the Kona coast of Hawaii Island. *Ichthyol Res.* 55:7–16.
- Patterson, C. 1987. *Molecules and Morphology in Evolution: Conflict or Compromise?* Cambridge University Press, 1st Edition. Cambridge. 229p.
- Pedrotti, M.L., L. Fenaux. 1992. Dispersal of echinoderm larvae in a geographical area marked by upwelling (Ligurian Sea, NW Mediterranean). *Mar Ecol Prog Ser.* 86:217-227.
- Perlette, J., W. Tan. 2001. Real-time monitoring of intracellular mRNA hybridization inside single living cells. *Anal Chem.* 73:5544–5550.
- Ratnasingham S, P.D.N. Hebert. 2008. BOLD management and analysis system. www.barcodinglife.com. Página consultada el 06/03/2012.
- Reed, G.H., J.O. Kent, C.T. Wittwer. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics.* 8(6): 597-608.
- Reed G, C. Wittwer. 2004. Sensitivity and specificity of single nucleotide polymorphism scanning by high resolution melting analysis. *Clin Chem.* 50:1748–1754.
- Rougemont, M., M. Van Saanen, R. Sahli, H.P. Hinrikson, J. Bille, K. Jaton. 2004. Detection of Four *Plasmodium* Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays. *J Clin Microbiology.* 42(12):5636–5643.
- Rosel PE, T.D. Kocher. 2002. DNA-based identification of larval cod in stomach contents of predatory fishes. *J Exp Mar Biol Ecol.* 267:75–88.
- Saitoh K, M. Takagaki, Y. Yamashita. 2003. Detection of Japanese flounder-specific DNAs from gut contents of potential predators in the field. *Fish Sci.* 69:473–477.

- Scheltema, R.S., M.E. Rice. 1990. Occurrence of teleplanic pelagosphaera larvae of sipunculans in tropical regions of the Pacific and Indian oceans. *Bull Mar Sci.* 47(1):159-181.
- Scholin, C.A., D.M. Anderson. 1994. Identification of group-specific and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). 1. RFLP analysis of SSU ribosomal-RNA genes. *J. Phycol.* 30:744–54.
- Schweinitz, E.H., R.A. Lutz. 1976. Larval development of the northern horse mussel *Modiolus modiolus* (L.) including a comparison with the larvae of *Mytilus edulis* L. as an aid in planktonic identification. *Biol Bull.* 150:348-360.
- Selvamani, M.J.P., S.M. Degnan, B.M. Degnan. 2001. Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: parentage assignment in aquaculture. *Mar Biotechnol.* 3:478–485.
- Sezaki K, Y. Kuboshima, I. Mitani, A. Fukui, S. Watabe. 2001. Identification of chub and spotted mackerels with mitochondrial cytochrome b gene and its application to respective pelagic eggs fixed with formalin. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 67:17–22.
- Silberman, J.D., P.J. Walsh. 1992. Species identification of spiny lobster phyllosome larvae via ribosome DNA analysis. *Mol Mar Biol Biotech.* 1:195–205.
- Smith, P. E., S.L. Richardson. 1979. Técnicas modelo para prospecciones de huevos de larvas de peces pelágicos. Departamento de Pesca F. A. O Roma Italia. Doc. Pesca. No. 175, 107 p.
- Smith, B.L., C.-P. Lu, J.R. Alvarado-Bremer. 2010. High-resolution melting analysis (HRMA): a highly sensitive inexpensive genotyping alternative for population studies. *Mol Ecol Resources.* 10:193–196.
- Sokol, D.L., X.L. Zhang, P.Z. Lu, A.M. Gewitz. 1998 Real time detection of DNA-RNA hybridization in living cells, *Proc Natl Acad Sci. USA.* 95:11538–11543.

- Song, L.S., B.Z. Liu, J.H. Xiang, P.Y. Qian. 2001. Molecular phylogeny and species identification of pufferfish of the genus *Takifugu* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae). *Mar Biotechnol.* 3:398–406.
- Stafford, J. 1906. On the recognition of bivalve larvae in plankton collections. *Contributions to Canadian Biology and Fisheries.* b-1: 221-242.
- Stephen, F., W.G. Altschul, E.W. Webb Miller, D.J.L. Myers. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403-410.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol Evol* 15:199–203.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, S. Kumar. 2007. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evo.* 24:1596-1599.
- Tan, W., X. Fang, J. Li, X. Liu. 2000. Molecular beacons: a novel DNA probe for nucleic acid and protein studies. *Chem. Eur. J.* 6:107–1111.
- Toro, J.E. 1998. Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based nuclear markers: the potential use in studies involving planktonic surveys. *J Shellfish Res.* 17:1203-1205.
- Tracey, S., J.A. Todd, D.H. Erwin. 1993. Mollusca: Gastropoda. En: M.J. Benton (ed.). *The Fossil Record.* Chapman and Hall. 2nd Edition. London. 30p.
- Tringali, M.D., T.M. Bert, S. Seyoum, E. Bermingham, D. Bartolacci. 1999. Molecular phylogenetics and ecological diversification of the transisthmian fish genus *Centropomus* (Perciformes: Centropomidae). *Mol Phylogenet Evol.* 13:193–207.
- Tyagi, S., F.R. Kramer. 1996. Molecular Beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* 14:303-308.
- Tyrrell, J.V., P.R. Bergquist, D.J. Saul, L. MacKenzie, P.L. Bergquist. 1997. Oligonucleotide probe technology as applied to the study of harmful algal blooms. New Zealand. *J Mar Fresh Res.* 31(4):551-560.

- Vrieling, E.G., D.M. Anderson. 1996. Immunofluorescence in phytoplankton research: applications and potential. *J Phycol.* 32:1-16.
- Ward, R.D., T.S. Zemplak, B.H. Innes, P.R. Last, P.D.N. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos T R Soc B.* 360:1847–1857.
- Waser, P.M., C. Strobeck, 1998. Genetic signatures of interpopulation dispersal. *Trend Ecol Evol.* 13:43–44.
- Watanabe, S., Y. Minegishi, T. Yoshinaga, J. Aoyama, K. Tsukamoto. 2004. A quick method for species identification of Japanese Eel (*Anguilla japonica*) using real-time PCR: an onboard application for use during sampling surveys. *Mar. Biotechnol.* 6:566-574.
- Winnepenninckx, B.M.H., D.G. Reid, T. Backeljau. 1998. Performance of 18S rRNA in Littorinid Phylogeny (Gastropoda: Caenogastropoda). *J Mol Evol.* 47:586–596.
- Wittwer, CT., GH. Reed, C.N. Gundry, J.G. Vandersteen, R.J. Pryor. 2003. High-Resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.* 49(6):853–860
- Woese, C.R., G.E. Fox. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5088–5090
- Yamasaki, I., G. Yoshizaki, M. Yokota, C.A. Strüssmann, S. Watanabe. 2006. Mitochondrial DNA variation and population structure of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica*. *Fish Sci.* 72:299–309
- Yang, S., S. Lin, G. Kelen, T. Quinn, J. Dick, C. Gaydos, R. Rothman. 2002. Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens. *J Clin Microbiol.* 40:3449-3454.
- Yoon, S.H., W. Kim. 2005. Phylogenetic relationships among six Vetigastropod subgroups (Mollusca, Gastropoda) based on 18S rDNA sequences. *Molecules and Cells.* 19:283-288.

- Yoon, S.H., W. Kim. 2007. 18S ribosomal DNA sequences provide insight into the phylogeny of Patellogastropod limpets (Mollusca: Gastropoda). *Molecules and Cells*. 23:64-71.
- Zhou, L., L. Wang, R. Palais, C. Wittwer. 2005. High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution. *Clin Chem* 51:1770–1777.

ANEXO 1

Identificación molecular de especímenes de las estaciones LB01, LB07 y LB10 de la localidad de La Bocana y CT01 de la localidad de Cabo Tosco, agrupados por Ordenes taxonómicos

Genotipo	Especímenes	CT01	LB01	LB07	LB10	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	% de identidad	Valor de E
15	CT01-C1, CT01-D1, CT01-E1, CT01-G1, CT01-G4	5				Mollusca	Gastropoda	Anaspidea	Akeridae	<i>Akera</i>	99	2E-100
32	CT01-F2, LB01-D8, LB10-H2	1	1		1	Mollusca	Gastropoda	Anaspidea	Akeridae	<i>Akera</i>	98	2E-100
42	CT01-H1, LB01-A2	1	1			Mollusca	Gastropoda	Anaspidea	Akeridae	<i>Akera</i>	99	3E-93
93	LB01-H2		1			Mollusca	Gastropoda	Anaspidea	Akeridae	<i>Akera</i>	99	1E-102
2	CT01-A2, CT01-G2	2				Mollusca	Gastropoda	Anaspidea	Aplysiidae		99 *	
94	LB01-H5		1			Mollusca	Gastropoda	Anaspidea	Aplysiidae	<i>Aplysia</i>	98	7E-100
112	LB10-C4				1	Mollusca	Gastropoda	Anaspidea	Aplysiidae	<i>Aplysia</i>	99	1E-101
17	CT01-C3	1				Mollusca	Gastropoda	Anaspidea	Aplysiidae		99 *	
145	LB07-A07			1		Mollusca	Gastropoda	Archaeogastropoda	Fissurellidae	<i>Fissurella</i>	100	1E-133
99	LB01-H12		1			Mollusca	Gastropoda	Archaeogastropoda	Haliotidae	<i>Haliotis</i>	100	5E-86
147	LB07-A11			1		Mollusca	Gastropoda	Archaeogastropoda	Haliotidae	<i>Haliotis</i>	100	4E-132
66	LB01-C5		1			Mollusca	Gastropoda	Archaeogastropoda	Tricoliidae	<i>Tricolia</i>	95	9E-74
29	CT01-E5	1				Mollusca	Gastropoda	Archaeogastropoda	Turbinidae		100 *	
1	CT01-A1, CT01-B3, CT01-D2	3				Mollusca	Gastropoda	Archaeogastropoda	Turbinidae		100 *	
87	LB01-G2, LB10-C3		1		1	Mollusca	Gastropoda	Archaeopulmonata	Ellobiidae	<i>Melampus</i>	99	5E-101
120	LB10-E3				1	Mollusca	Gastropoda	Cephalaspidea	Diaphanidae	<i>Toledonia</i>	93	2E-80
27	CT01-E3	1				Mollusca	Gastropoda	Cephalaspidea	Bullidae	<i>Bulla</i>	97	7E-85
38	CT01-G5	1				Mollusca	Gastropoda	Cephalaspidea	Bullidae	<i>Bulla</i>	97	1E-76
136	LB10-H3				1	Mollusca	Gastropoda	Cephalaspidea	Bullidae	<i>Bulla</i>	96	3E-93
10	CT01-B5	1				Mollusca	Gastropoda	Cephalaspidea	Haminoeidae	<i>Alys</i>	97	8E-94
133	LB10-G9				1	Mollusca	Gastropoda	Cephalaspidea	Haminoeidae	<i>Alys</i>	99	7E-100

* Genotipos que obtuvieron mismo porcentaje de identidad con varias secuencias diferentes ya sea de Familia, Género o en ambas clasificaciones.

Genotipo	Especímenes	CT01	LB01	LB07	LB10	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	% de identidad	Valor de E
34	CT01-F4	1				Mollusca	Gastropoda	Cephalaspidea			93 *	
135	LB10-G12				1	Mollusca	Gastropoda	Cephalaspidea			92 *	
91	LB01-G10		1			Mollusca	Gastropoda	Cheilostomatida	Scrupariidae	<i>Scruparia</i>	95	2E-70
3	CT01-A4, CT01-H7	2				Mollusca	Gastropoda	Cycloneritimorpha	Neritidae	<i>Nerita</i>	99	2E-89
5	CT01-A6, CT01-A8, CT01-A9, CT01-A11, CT01-B4, CT01-B9, CT01-C6, CT01-C7, CT01-C8, CT01-D6, CT01-D8, CT01-E6, CT01-E9, CT01-F11, CT01-H8	15				Mollusca	Gastropoda	Cycloneritimorpha	Neritidae	<i>Nerita</i>	99	2E-94
6	CT01-A7, CT01-F1	2				Mollusca	Gastropoda	Cycloneritimorpha	Neritidae	<i>Nerita</i>	99	3E-93
11	CT01-B6	1				Mollusca	Gastropoda	Cycloneritimorpha	Neritidae	<i>Nerita</i>	99	7E-95
13	CT01-B10, CT01-B11, CT01-C5, CT01-G6, CT01-G11, CT01-H9	6				Mollusca	Gastropoda	Cycloneritimorpha	Neritidae	<i>Nerita</i>	99	1E-92
22	CT01-D7, CT01-E7, CT01-F6, CT01-F7, CT01-F8, CT01-H10	6				Mollusca	Gastropoda	Cycloneritimorpha	Neritidae	<i>Nerita</i>	99	2E-94
46	CT01-H6	1				Mollusca	Gastropoda	Cycloneritimorpha	Neritidae	<i>Nerita</i>	98	5E-91
117	LB10-D8, LB10-D9				2	Mollusca	Gastropoda	Cycloneritimorpha			99 *	
92	LB01-G12		1			Mollusca	Gastropoda	Heterostropha	Pyramidellidae	<i>Otopleura</i>	97	2E-94
114	LB10-C9				1	Mollusca	Gastropoda	Heterostropha	Pyramidellidae	<i>Otopleura</i>	96	2E-90
20	CT01-D4	1				Mollusca	Gastropoda	Heterostropha	Pyramidellidae	<i>Odostomia</i>	97	4E-77
21	CT01-D5, CT01-H4	2				Mollusca	Gastropoda	Heterostropha	Pyramidellidae	<i>Odostomia</i>	97	4E-78
50	LB01-A5		1			Mollusca	Gastropoda	Heterostropha	Pyramidellidae	<i>Hinemoa</i>	97	9E-89
58	LB01-B7		1			Mollusca	Gastropoda	Heterostropha	Pyramidellidae	<i>Turbonilla</i>	96	2E-89
142	LB07-A03			1		Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Cypraeidae	<i>Erronea</i>	96	7E-110
154	LB07-E01			1		Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Cypraeidae	<i>Erronea</i>	99	1E-127
157	LB07-E09			1		Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Cypraeidae	<i>Erronea</i>	95	4E-107
52	LB01-A8		1			Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Hydrobiidae		99 *	

Genotipo	Especímenes	CT01	LB01	LB07	LB10	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	% de identidad	Valor de E
55	LB01-A11, LB01-B6, LB01-B8, LB01-E8, LB01-E11, LB01-F8, LB01-G1		7			Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Hydrobiidae		98 *	
63	LB01-C2, LB01-E5, LB01-G9, LB01-H10, LB10-E6		4		1	Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Hydrobiidae		98 *	
69	LB01-D1		1			Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Hydrobiidae		98 *	
83	LB01-F6		1			Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Hydrobiidae		98 *	
85	LB01-F9		1			Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Hydrobiidae		98 *	
96	LB01-H8		1			Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Hydrobiidae		98 *	
97	LB01-H9		1			Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Hydrobiidae		98 *	
101	LB10-A3				1	Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Hydrobiidae	<i>Bythiospeum</i>	99	5E-81
64	LB01-C3		1			Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Naticidae	<i>Sinum</i>	98	3E-98
23	CT01-D9	1				Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Rissoidae	<i>Rissoina</i>	99	4E-92
47	CT01-H11	1				Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Rissoidae	<i>Rissoina</i>	99	7E-89
8	CT01-A12	1				Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha			98 *	
14	CT01-B12	1				Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha			99 *	
16	CT01-C2, CT01-E11	2				Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha			98 *	
18	CT01-C9, CT01-C11, CT01-C12	3				Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha			99 *	
30	CT01-E8	1				Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha			98 *	
40	CT01-G8	1				Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha			99 *	
41	CT01-G10	1				Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha			99 *	
48	LB01-A3, LB01-A7, LB01-B2		3			Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha			98 *	
72	LB01-D6		1			Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha			99 *	
61	LB01-B11, LB01-C1, LB01-C8, LB01-C9, LB01-C10, LB01-C11, LB10-C12, LB10-E10, LB10-F10, LB10-F12, LB10-G10		6		5	Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Hydrobiidae		98 *	
9	CT01-B2	1				Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Cypraeidae	<i>Erronea</i>	99	4E-86

Genotipo	Especímenes	CT01	LB01	LB07	LB10	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	% de identidad	Valor de E
49	LB01-A4		1			Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Cypraeidae	<i>Erronea</i>	99	4E-92
59	LB01-B9, LB01-C6, LB01-F5		3			Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Cypraeidae	<i>Erronea</i>	99	3E-93
82	LB01-F4, LB10-C10, LB10-D7		1		2	Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Cypraeidae	<i>Erronea</i>	99	3E-93
105	LB10-A11, LB10-B12, LB10-E9, LB10-F8				4	Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Cypraeidae	<i>Erronea</i>	99	3E-93
106	LB10-A12, LB10-C8				2	Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Cypraeidae	<i>Erronea</i>	99	1E-87
140	LB07-A01			1		Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Cypraeidae	<i>Erronea</i>	100	3E-129
	LB07-A05, LB07-B03, LB07-B07, LB07-B08, LB07-B09, LB07-B10, LB07-B11, LB07-B12, LB07-C01, LB07-C02, LB07-C03, LB07-C04, LB07-C08, LB07-C10, LB07-C12, LB07-D01, LB07-D03, LB07-D04, LB07-D05, LB07-D07, LB07-D08, LB07-D09, LB07-D10, LB07-E02,											
143	LB07-E05, LB07-E07, LB07-E08, LB07-E10, LB07-E11, LB07-E12, LB07-F02, LB07-F05, LB07-F06, LB07-F07, LB07-F08, LB07-F11, LB07-F12, LB07-G01, LB07-G04, LB07-G05, LB07-G10, LB07-H01, LB07-H03, LB07-H04, LB07-H05, LB07-H07, LB07-H09, LB07-H10, LB07-H11			49		Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Cypraeidae	<i>Erronea</i>	100	3E-129

Genotipo	Especímenes	CT01	LB01	LB07	LB10	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	% de similitud	Valor de E
118	LB10-D11				1	Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Hydrobiidae		97 *	
134	LB10-G11				1	Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Hydrobiidae	<i>Pseudobithynia</i>	98	2E-85
110	LB10-B10, LB10-C11				2	Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha			98 *	
152	LB07-C05			1		Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha			95 *	
89	LB01-G4, LB10-D10, LB10-H9		1		2	Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda	Drilliidae	<i>Splendrillia</i>	97	3E-88
104	LB10-A9				1	Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda	Drilliidae	<i>Splendrillia</i>	97	3E-88
132	LB10-G5				1	Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda	Drilliidae	<i>Splendrillia</i>	98	7E-85
39	CT01-G7	1				Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda	Muricidae	<i>Coralliophila</i>	99	4E-82
45	CT01-H5	1				Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda	Muricidae	<i>Coralliophila</i>	98	2E-89
31	CT01-E10	1				Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda			96 *	
115	LB10-D5				1	Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda			98 *	
122	LB10-E5				1	Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda			97 *	
160	LB07-H06			1		Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda			99 *	
98	LB01-H11		1			Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda;	Buccinidae	<i>Nassaria</i>	99	4E-92
123	LB10-E8				1	Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda;	Buccinidae		98 *	
7	CT01-A10, CT01-F10	2				Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda;	Conidae		98 *	
127	LB10-F3				1	Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda;	Conidae		99 *	
148	LB07-B01, LB07-B02			2		Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda;	Muricidae		100 *	
19	CT01-C10	1				Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda;	Nassariidae	<i>Nassarius</i>	97	7E-85
25	CT01-D11, CT01-D12, CT01-E12	3				Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda;	Nassariidae	<i>Nassarius</i>	96	1E-82
37	CT01-F12	1				Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda;	Nassariidae	<i>Nassarius</i>	98	9E-84
53	LB01-A9		1			Mollusca	Gastropoda	Neotaenioglossa	Epitonidae	<i>Epitonium</i>	97	9E-84
62	LB01-B12, LB10-B8, LB10-E7, LB10-G8		1		3	Mollusca	Gastropoda	Neotaenioglossa	Eulimidae	<i>Balcis</i>	99	7E-95
67	LB01-C7		1			Mollusca	Gastropoda	Neotaenioglossa	Eulimidae	<i>Balcis</i>	99	1E-96
73	LB01-D7, LB01-G11, LB01-H7		3			Mollusca	Gastropoda	Neotaenioglossa	Eulimidae	<i>Balcis</i>	99	7E-95
78	LB01-E7, LB01-F12, LB01-G8		3			Mollusca	Gastropoda	Neotaenioglossa	Eulimidae	<i>Balcis</i>	99	7E-95
102	LB10-A6				1	Mollusca	Gastropoda	Neotaenioglossa	Eulimidae	<i>Balcis</i>	99	8E-94
103	LB10-A8				1	Mollusca	Gastropoda	Neotaenioglossa	Eulimidae	<i>Balcis</i>	98	1E-91
109	LB10-B6				1	Mollusca	Gastropoda	Neotaenioglossa	Eulimidae	<i>Balcis</i>	99	7E-90
138	LB10-H8				1	Mollusca	Gastropoda	Neotaenioglossa	Eulimidae	<i>Balcis</i>	97	1E-87

Genotipo	Especímenes	CT01	LB01	LB07	LB10	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	% de identidad	Valor de E
57	LB01-B4		1			Mollusca	Gastropoda	Nudibranchia	Chromodorididae		92 *	
77	LB01-E6		1			Mollusca	Gastropoda	Nudibranchia	Dotidae	<i>Doto</i>	99	3E-108
95	LB01-H6		1			Mollusca	Gastropoda	Nudibranchia	Chromodorididae	<i>Diversidoris</i>	92	5E-81
126	LB10-F2				1	Mollusca	Gastropoda	Nudibranchia	Chromodorididae	<i>Mexichromis</i>	98	4E-92
150	LB07-B05, LB07-C09			2		Mollusca	Gastropoda	Nudibranchia	Chromodorididae	<i>Diversidoris</i>	94	5E-112
137	LB10-H6				1	Mollusca	Gastropoda	Nudibranchia	Dotidae	<i>Doto</i>	98	6E-105
113	LB10-C6				1	Mollusca	Gastropoda	Nudibranchia	Eubranchidae	<i>Eubranchus</i>	99	1E-96
24	CT01-D10, LB10-A5, LB10-B4, LB10-F5, LB10-G3, LB10-H5	1			5	Mollusca	Gastropoda	Nudibranchia			93 *	
90	LB01-G7		1			Mollusca	Gastropoda	Nudibranchia			93 *	
108	LB10-B5				1	Mollusca	Gastropoda	Nudibranchia			90 *	
116	LB10-D6				1	Mollusca	Gastropoda	Nudibranchia			98 *	
131	LB10-F9				1	Mollusca	Gastropoda	Nudibranchia			94 *	
141	LB07-A02			1		Mollusca	Gastropoda	Patellogastropoda	Lottiidae	<i>Lottia</i>	100	7E-156
71	LB01-D4, LB01-E12, LB10-B7, LB10-C7		2		2	Mollusca	Gastropoda	Pleurobranchomorpha	Pleurobranchidae	<i>Berthella</i>	91	7E-60
144	LB07-A06			1		Mollusca	Gastropoda	Pleurobranchomorpha	Pleurobranchidae	<i>Pleurobranchus</i>	95	2E-121
155	LB07-E04			1		Mollusca	Gastropoda	Pleurobranchomorpha	Pleurobranchidae	<i>Pleurobranchus</i>	95	1E-118
33	CT01-F3	1				Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Caliphyllidae	<i>Polybranchia</i>	98	4E-97
75	LB01-E2		1			Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Caliphyllidae	<i>Cyerce</i>	98	5E-96
43	CT01-H2, LB01-H3, LB10-D1, LB10-E2	1	1		2	Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Hermæidae	<i>Aplysiopsis</i>	98	3E-93
151	LB07-B06, LB07-C06			2		Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Hermæidae	<i>Aplysiopsis</i>	99	1E-128
156	LB07-E06			1		Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Hermæidae	<i>Aplysiopsis</i>	97	1E-118
65	LB01-C4, LB01-G6		2			Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Limapontiidae	<i>Aplysiopsis</i>	98	2E-95
80	LB01-F1		1			Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Limapontiidae	<i>Aplysiopsis</i>	95	9E-84
81	LB01-F3		1			Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Limapontiidae	<i>Aplysiopsis</i>	98	7E-95
107	LB10-B1				1	Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Limapontiidae	<i>Stiliger</i>	97	2E-80
111	LB10-C1, LB10-D2, LB10-D3, LB10-H12				4	Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Limapontiidae	<i>Aplysiopsis</i>	98	9E-89
128	LB10-F4				1	Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Limapontiidae	<i>Aplysiopsis</i>	98	1E-97

Genotipo	Especímenes	CT01	LB01	LB07	LB10	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	% de identidad	Valor de E	
56	LB01-B1, LB01-B3, LB01-F2, LB10-B2, LB10-H1		3		2	Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Limapontiidae	<i>Aplysiopsis</i>	98	8E-94	
36	CT01-F9	1				Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Oxynoidae	<i>Oxynoe</i>	100	1E-112	
70	LB01-D2		1			Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Polybranchiidae		97 *		
44	CT01-H3	1				Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa			95 *		
119	LB10-E1				1	Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa			95 *		
4	CT01-A5, CT01-C4, CT01-D3, LB10-G2	3			1	Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Limapontiidae	<i>Stiliger</i>	95	2E-84	
12	CT01-B8	1				Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Limapontiidae	<i>Stiliger</i>	96	5E-86	
26	CT01-E2	1				Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Limapontiidae	<i>Stiliger</i>	95	2E-84	
100	LB10-A2				1	Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Limapontiidae	<i>Aplysiopsis</i>	96	1E-76	
121	LB10-E4				1	Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Limapontiidae	<i>Aplysiopsis</i>	98	5E-96	
125	LB10-E12				1	Mollusca	Gastropoda	Sacoglossa	Limapontiidae	<i>Limapontia</i>	99	2E-95	
51	LB01-A6, LB01-E10		2			Mollusca	Gastropoda	Thecosomata	Desmopteridae	<i>Desmopterus</i>	99	5E-101	
54	LB01-A10, LB01-G5		2			Mollusca	Gastropoda	Thecosomata	Desmopteridae	<i>Desmopterus</i>	99	8E-104	
60	LB01-B10		1			Mollusca	Gastropoda	Thecosomata	Desmopteridae	<i>Desmopterus</i>	98	8E-99	
68	LB01-C12		1			Mollusca	Gastropoda	Thecosomata	Desmopteridae	<i>Desmopterus</i>	99	2E-104	
74	LB01-D10		1			Mollusca	Gastropoda	Thecosomata	Desmopteridae	<i>Desmopterus</i>	98	1E-97	
84	LB01-F7		1			Mollusca	Gastropoda	Thecosomata	Desmopteridae	<i>Desmopterus</i>	98	1E-97	
86	LB01-F10		1			Mollusca	Gastropoda	Thecosomata	Desmopteridae	<i>Desmopterus</i>	99	1E-102	
129	LB10-F6, LB10-H7				2	Mollusca	Gastropoda	Thecosomata	Desmopteridae	<i>Desmopterus</i>	99	2E-104	
130	LB10-F7				1	Mollusca	Gastropoda	Thecosomata	Desmopteridae	<i>Desmopterus</i>	98	1E-87	
139	LB10-H11				1	Mollusca	Gastropoda	Thecosomata	Desmopteridae	<i>Desmopterus</i>	100	8E-99	
146	LB07-A09			1		Mollusca	Gastropoda	Thecosomata	Desmopteridae	<i>Desmopterus</i>	99	2E-136	
159	LB07-F04			1		Mollusca	Gastropoda	Thecosomata	Desmopteridae	<i>Desmopterus</i>	99	8E-135	
28	CT01-E4, CT01-G3	2				Mollusca	Gastropoda				98 *		
88	LB01-G3		1			Mollusca	Gastropoda				97 *		
153	LB07-D02, LB07-F09			2		Mollusca	Gastropoda				98 *		
79	LB01-E9		1			Cnidaria	Myxozoa	Bivalvulida			82	3E-27	
124	LB10-E11				1	Arthropoda	Maxillopoda	Calanoida	Paracalanidae		100 *		
35	CT01-F5	1				Arthropoda	Malacostraca	Cumacea			83		
76	LB01-E3		1			Arthropoda	Malacostraca	Euphausiacea	Euphausiidae	<i>Nyctiphanes</i>	100	8E-94	
149	LB07-B04, LB07-G06			2		Arthropoda	Malacostraca	Euphausiacea	Euphausiidae	<i>Nyctiphanes</i>	100	1E-137	
158	LB07-F03			1		Arthropoda	Malacostraca	Euphausiacea	Euphausiidae	<i>Nyctiphanes</i>	99	6E-136	
TOTAL DE ESPECÍMENES		90	83	74	77								