

## Estimation of *Anadara tuberculosa* genetic diversity in five mangroves from Tumaco, using Cytochrome oxidase I enzyme

### Estimación de la diversidad genética de *Anadara tuberculosa* en cinco manglares de Tumaco, utilizando la enzima citocromo oxidasa I

Esmeralda Chamorro L,<sup>1,2</sup> M.Sc, Carol Rosero G,<sup>3\*</sup> Ph.D.

<sup>1</sup>Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Recursos Hidrobiológicos, Programa de Ingeniería en Producción Acuícola. Ciudadela Universitaria Torobajo. Pasto Colombia. <sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de Camarões Marinhos, Programa de pós-graduação em aquicultura, Centro de Ciências Agrarias, Brasil. CEP: 88062-601. <sup>3</sup>Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología. Ciudadela Universitaria Torobajo. Pasto Colombia. \*Correspondence: cyroga@yahoo.com

Received: October 2015; Accepted: March 2016.

#### ABSTRACT

**Objective.** To estimate the genetic diversity of the *Anadara tuberculosa* in five mangrove swamps of Tumaco, Nariño, Colombia using as a mitochondrial molecular marker the cytochrome oxidase sub-unit I (COI). **Materials and methods.** A total of 50 individuals were collected from the San Jorge, La Tiburonera, El Pajal, La Playa y Bajito Vaquería mangrove swamps, randomly selecting 10 specimens of each zone. The tissue sample was worked with absolute alcohol at ambient temperature in microtubes. DNA was extracted, and the mitochondrial DNA was amplified using the PCR technique (*polymerase chain reaction*). The amplified and quantified products of PCR were sequenced on both sides (Macrogen). Each one of the obtained sequences was edited and aligned. Later, the parameters of genetic diversity (haplotypal and nucleotidical) were measured, and the analysis of distribution between frequency pairs (*Mistmach distribution*) was elaborated. Finally, the analysis of nucleotidic variation and population structure (AMOVA) was completed. **Results.** The amplified product gene weighed 710 bp. The haplotypal diversity reported for all the populations was high ( $0.683 \pm 0.060$ ) and the reported nucleotidical diversity was low for all the populations ( $0.040 \pm 0.020$ ). The AMOVA results indicate that the variance amongst populations is low (4.20%) and that the variance within populations is high (95.80%). **Conclusions.** The studied populations are not structured and although there is a decrease of natural banks, the genetic diversity is high.

**Key words:** COI, genetics population, mangroves swamps, mitochondrial DNA, (*Fuentes: tesaurus ambiental para Colombia, CAB, MeSH*).

#### RESUMEN

**Objetivo.** Estimar la diversidad genética de *Anadara tuberculosa* en cinco manglares de Tumaco Nariño, Colombia utilizando como marcador molecular mitocondrial la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI). **Materiales y métodos.** Se colectaron en total 50 individuos de los manglares San Jorge, La Tiburonera, El Pajal, La Playa y Bajito Vaquería, tomando 10 ejemplares al azar de cada

zona. La muestra de tejido se fijó con alcohol absoluto a temperatura ambiente en microtubos. Se extrajo y amplificó el ADN mitocondrial mediante la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Los productos de PCR amplificados y cuantificados se secuenciaron por ambos lados (Macrogen). Una vez se obtuvo las secuencias, se editó y alineo cada secuencia. Posteriormente, se midió los parámetros de diversidad genética (haplotípica y nucleotídica) y se elaboró el análisis de distribución entre pares de frecuencias (*Mistmach distribution*). Finalmente se efectuó el análisis de variación nucleotídica y la estructura poblacional (AMOVA). **Resultados.** El gen amplificado tuvo una longitud de 710 pb. La diversidad haplotípica reportada para todas las poblaciones fue alta ( $0.683 \pm 0.060$ ) y la diversidad nucleotídica reportada fue baja para todas las poblaciones ( $0.040 \pm 0.020$ ). Los resultados del AMOVA indican que la varianza entre poblaciones es baja (4.20%) y la varianza dentro de las poblaciones es alta (95.80%). **Conclusiones.** Las poblaciones estudiadas no se encuentran estructuradas y a pesar de la disminución de los bancos naturales de las poblaciones de *Anadara tuberculosa*, se estima que la diversidad genética es alta.

**Palabras clave:** ADN mitocondrial, COI, genética de poblaciones, manglares (*Fuentes: tesaurus ambiental para Colombia, CAB, MeSH*).

## INTRODUCTION

*Anadara tuberculosa* belongs to the Mollusca phylum, Bivalvia class, Arcoida order and Arcidae family. This species sustains one of the main artisanal fisheries of the coastal zone in the Nariño Pacific region, constituting an important source of protein for the human communities of the littoral and its extraction volumes have depended as much on the necessities of family supply as on local commerce (1). There is an uncontrolled increase in the extraction of this resource where it is distributed, especially in southern Colombia (2,3). This increase in exploitation poses a problem associated with the natural supply of the resource, for fishery and for the communities that obtain their daily livelihood from this activity (2). Due to these and other indications of a decline in the fishing density in Colombia and other countries (1,4,5), *A. tuberculosa* was included in the Red Book of Marine Invertebrates of Colombia as a threatened species in the Vulnerable category (6).

Currently there are tools to evaluate genetic diversity, which include molecular markers that are a set of techniques that allow visualizing or indicating the presence of allelic variants, as a result of some type of mutation through evolutionary time (7). The application of these markers provides information on the history, demography, ecology and behavior of species that can assist in risk assessment, prioritization, delineation of units and design of effective conservation strategies (8). Since 1970 the analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) has been established as a powerful tool for evolutionary studies in animals. The cytochrome oxidase subunit I (COI) is part of a complex gene encoding of transmembrane proteins, involved in the electrical transport and catalysis of the respiratory chain of eukaryotic organisms and has been the subject

## INTRODUCCIÓN

*Anadara tuberculosa* pertenece al filo Mollusca, clase Bivalvia, orden Arcoida y familia Arcidae. Esta especie sostiene una de las principales pesquerías artesanales de la zona costera en la región del Pacífico nariñense, constituyendo una importante fuente de proteína para las comunidades humanas del litoral y sus volúmenes de extracción han dependido tanto de las necesidades de abastecimiento familiar como de comercio local (1). Existe un incremento incontrolado en la extracción de este recurso donde se distribuye, especialmente en el sur de Colombia (2,3). Este incremento en la explotación plantea una problemática asociada a la oferta natural del recurso, a la pesquería y a las comunidades que obtienen el sustento diario de esta actividad (2). Por estos y otros indicios de disminución de la densidad de pesca en Colombia y en otros países (1,4,5), *A. tuberculosa* fue incluida en el Libro rojo de Invertebrados Marinos de Colombia, como especie amenazada en la categoría Vulnerable (6).

Actualmente existen herramientas que permiten evaluar la diversidad genética, dentro de ellas están los marcadores moleculares que son un conjunto de técnicas que permiten visualizar o indicar la presencia de variantes alélicas, producto de algún tipo de mutación a través del tiempo evolutivo (7). La aplicación de éstos marcadores aporta información sobre la historia, la demografía, la ecología y el comportamiento de las especies que puede ayudar en la evaluación de riesgos, la asignación de prioridades, la delimitación de unidades y el diseño de estrategias de conservación eficaces (8). Desde 1970 el análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) se ha establecido como una poderosa herramienta para estudios evolutivos en animales. El Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) es parte de un complejo génico codante de proteínas transmembrana, involucradas en el transporte eléctrico y catálisis de la cadena

of population genetic variability studies due to its universality and evolutionary importance (9). The mtDNA has characteristics such as its matrilineal inheritance, it is haploid, has a high rate of evolution and includes conserved and variable regions, which has made it a tool used in several studies (10-12). Therefore, the purpose of this research was to use COI as molecular marker to estimate genetic diversity in five mangrove islands in Tumaco, Colombia.

## MATERIALS AND METHODS

**Sampling.** The collection of individuals was carried out in five mangrove islands located in Tumaco, in the southwest of the department of Nariño, Colombia (1° 48' 24" N, 78° 45' 53" W): San Jorge, La Tiburonera, El Pajal, La Playa or Resurrection and Bajito Vaqueria. The individuals were collected during low tide hours, when mangroves are uncovered, lasting approximately from four to six hours. Ten specimens were collected at random from each mangrove and were taken to a sterile area where a sample of the muscle tissue of the foot was taken. The samples were placed in absolute alcohol previously arranged in individual 1.5 ml microtubes and were stored at room temperature.

**DNA Extraction.** The 50 samples were transported to the laboratory (Laboratory of Animal Genetic Improvement of Universidad de Nariño) where the extraction of DNA was carried out. Between 50 and 100 mg of preserved tissue were taken, the tissue was washed with distilled water three times and shook with Vortex (Labnet, USA). It was subsequently macerated until small particles were obtained and buffered saline was immediately added (0.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8 and 2 mM pH 8 EDTA). Afterwards 80 µl of 20% SDS and 16 µl of proteinase K (20 mg ml<sup>-1</sup>) were added and homogenized inversely for 1 minute. Each sample was incubated for 16 hours at temperatures of 55-65 °C. In order to separate the DNA from the proteins present, 300 µL of 5M NaCl was added and inversely mixed 5 times, followed by centrifugation at 10,000 rpm for 35 minutes. The supernatant was transferred into a volume of 400 µL to a new microtube and the same volume of isopropanol was added thereto, admixed inversely and then incubated at -20 °C from 15 to 60 minutes.

To isolate the DNA, it was centrifuged at 10,000 rpm for 20 minutes and the supernatant was discarded. Finally, the DNA was washed with 300 µL of 70% ethanol and centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes. Excess ethanol was removed and the precipitated DNA was dried in the presence

respiratoria de organismos eucariotas y ha sido motivo de estudios poblacionales de variabilidad genética por su universalidad e importancia evolutiva (9). El ADNmt presenta características como su herencia matrilineal, es haploide, presenta una alta tasa de evolución y contiene regiones conservadas y variables, que lo han convertido en una herramienta utilizada en varios estudios (10-12). Por lo anterior, el propósito de la presente investigación fue utilizar el COI como marcador molecular para estimar la diversidad genética en cinco islas de manglar en Tumaco, Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Toma de muestras.** La recolección de individuos se llevó a cabo en cinco islas de manglar ubicadas en Tumaco, ubicado en el suroccidente del departamento de Nariño, Colombia (1° 48' 24" N, 78° 45' 53" W): San Jorge, La Tiburonera, El Pajal, La Playa o Resurrección y Bajito Vaquería. La recolección se llevó a cabo en horario de marea baja, cuando los manglares quedan descubiertos, durando aproximadamente de cuatro a seis horas. Se recolectó 10 ejemplares al azar de cada manglar, estos se llevaron a un área estéril donde se tomó una muestra del tejido del músculo del pie. Las muestras fueron fijadas en alcohol absoluto previamente dispuesto en microtubos individuales de 1.5 ml y se conservaron a temperatura ambiente.

**Extracción de ADN.** Las 50 muestras fueron transportadas al laboratorio (Laboratorio de Mejoramiento Genético Animal de la Universidad de Nariño) donde se llevó a cabo la extracción de ADN. Se tomaron entre 50 a 100 mg de tejido conservado, el tejido se lavó con agua destilada tres veces agitando con Vortex (Labnet, USA). Posteriormente se maceró hasta obtener partículas pequeñas e inmediatamente se adicionó tampón salino (NaCl 0.4 M; Tris-HCl 100 mM pH 8 y EDTA 2 mM pH 8). Luego se adicionó 80 µL de SDS al 20% y 16 µL de proteinasa K (20 mg ml<sup>-1</sup>) y se homogenizó por inversión durante 1 minuto. Cada muestra se incubó por 16 horas a temperaturas entre 55-65°C. Con el fin de separar el ADN de las proteínas presentes, se adicionó 300 µL de NaCl 5M y se mezcló por inversión 5 veces, seguido de centrifugación a 10.000 rpm durante 35 minutos. El sobrenadante se transfirió, en un volumen de 400 µL, a un nuevo microtubo y a este se le adicionó el mismo volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y posteriormente se incubó a -20°C de 15 a 60 minutos.

Para aislar el ADN, se centrifugó a 10.000 rpm por 20 minutos y se descartó el sobrenadante. Finalmente el ADN fue lavado con 300 µL de etanol 70% y centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos.

of heat for 15 minutes. Finally, the DNA was resuspended in 150  $\mu\text{L}$  of TE buffer. To improve DNA quality, a treatment was carried out with RNase (20 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) and incubated at 37 °C for 1 hour.

**PCR of the mitochondrial gene COI.** PCR amplification was carried out in a reaction volume of 25  $\mu\text{l}$  using the following working components and concentrations: 10 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  of DNA; 2 mM of dNTPs (Promega, Madison, USA); 1  $\mu\text{M}$  of primers (IDI, Coralville) forward (LCO1490) and 1  $\mu\text{M}$  of reverse (HCO2198); 2.5 mM of  $\text{MgCl}_2$ ; 0.5 units of Taq polymerase (Promega, Madison, USA) and the volume was completed with nuclease-free water (IDI, Coralville). The gene was then amplified in a thermocycler (Bio-rad MyCycler, Hercules, CA, USA) with the following program: 1 denaturation cycle of 5 minutes at 94 °C; followed by 35 hybridization cycles, composed for 30 seconds at 94 °C, 45 seconds at 50 °C and 1 minute at 72 °C; finally, an extension cycle for 7 minutes at 72 °C (Concepto Azul). The PCR products were sequenced with an ABI 3730 XL Automated Sequencers (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

**Statistical analysis of sequences.** Sequences were verified with the GenBank database for COI by BlastN. The sequences obtained with identity percentages greater than or equal to 95% were edited with the Bioedit program and aligned with the Mega4 program. The haplotype and nucleotide diversity was estimated with the DnaSp5 program. The same program was used to estimate the Fs statistic (13) and the distribution between pairs of frequencies (Mismatch distribution) was evaluated. Finally an analysis of nucleotide variation and population structure was carried out through AMOVA (Analysis of Molecular Variance), executing 10,000 permutations with the 2006 Arlequin program.

In addition, a phylogenetic tree was elaborated using sequences of sister species as external groups (*A. similis* and *A. grandis*), for the same gene, available in GenBank and a tree was constructed with the UPGMA method on the Mega4 program.

## RESULTS

The PCR products showed a molecular size of 710 bp. According to the BlastN analysis, 74 sequences had identity percentages greater than or equal to 95%, which were used for the estimation of genetic parameters. For the populations evaluated, the haplotype diversity

Se eliminó el exceso de etanol y el ADN precipitado se secó en presencia de calor por 15 minutos. Por último el ADN se resuspendió en 150  $\mu\text{L}$  de buffer TE. Para mejorar la calidad de ADN se realizó un tratamiento con RNasa (20 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) incubando a 37°C por 1 hora.

**PCR del gen mitocondrial COI.** La amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 25  $\mu\text{l}$  usando los siguientes componentes y concentraciones de trabajo: 10 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  de ADN; 2 mM de dNTPs (promega, Madison, USA); 1  $\mu\text{M}$  de cebadores (IDI, Coralville) forward (LCO1490) y 1  $\mu\text{M}$  de reverse (HCO2198); 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0.5 unidades de Taq polimerasa (Promega, Madison, USA) y se completó el volumen con agua libre de nucleasas (IDI, Coralville). Posteriormente se amplificó el gen en un termociclador (Bio-rad MyCycler, Hercules, CA, USA) con el siguiente programa: 1 ciclo de denaturación 5 minutos a 94°C; seguido de 35 ciclos de hibridación, compuestos por 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C; finalmente un ciclo de extensión por 7 minutos a 72°C (Concepto azul). Los productos de PCR fueron secuenciados con equipo ABI 3730 XL *Automated Sequencers* (Macrogen Inc., Seoul, Corea).

**Análisis estadístico de secuencias.** Las secuencias se verificaron con la base de datos de GenBank para COI mediante BlastN. Las secuencias obtenidas con porcentajes de identidad mayores o iguales a 95% se editaron con el programa *Bioedit* y se alinearon conjuntamente con el programa Mega4. Se estimó la diversidad haplotípica y nucleotídica con el programa DnaSp5. Con el mismo programa se estimó el estadístico Fs (13) y se evaluó la distribución entre pares de frecuencias (*Mismatch distribution*). Finalmente se realizó un análisis de variación nucleotídica y estructura poblacional Mediante AMOVA (por sus siglas en inglés *Analysis of Molecular Variance*) ejecutando 10.000 permutaciones con el programa Arlequin versión 2006.

Adicionalmente se elaboró un árbol filogenético tomando como grupos externos secuencias de especies hermanas (*A. similis* y *A. grandis*), para el mismo gen, disponibles en *GenBank* y se construyó un árbol con el método UPGMA en el programa Mega4.

## RESULTADOS

Los productos de PCR resultaron con talla molecular de 710 pb. De acuerdo con el análisis de BlastN, 74 secuencias tuvieron porcentajes de identidad mayor o iguales al 95% las cuales fueron utilizadas para la



was  $0.6830 \pm 0.0600$  (variance of 0.0035) and nucleotide diversity was  $0.0399 \pm 0.0195$  (variance of 0.0004). Table 1 shows the values analyzed for each population.

**Table 1.** Haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (d) for the populations evaluated according to DNAsp.

h	Population				
	1	2	3	4	5
0.943	0.859	0.879	0.882	0.962	
$\pm 0.040$	$\pm 0.063$	$\pm 0.058$	$\pm 0.052$	$\pm 0.040$	
0.012	0.014	0.096	0.008	0.103	
$\pm 0.003$	$\pm 0.003$	$\pm 0.066$	$\pm 0.001$	$\pm 0.062$	

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

Ninety-nine changes were observed in the sequences of the species *A. tuberculosa*, corresponding to mutations describing 21 haplotypes (Table 2).

**Table 2.** Transitions and transversions of the 21 haplotypes found in *A. tuberculosa* population. Calculated with Mega4.

Transitions/ Transversions	
G --> A	21.76
T --> C	26.79
C --> T	20.22
A --> G	5.62
T --> A	3.79
C --> G	1.26
G --> T	3.79
C --> A	2.86

The general transition / transversion trend is  $R = 1.857$

The analysis of nucleotide variation showed percentages of base composition equal to 22.6% for cytosine (C), 23.5% for thymine (T), 38.7% for adenine (A) and 15.2% for guanine (G). The mean nucleotide difference (k) was 5.56. We analyzed 640 bases, where 541 monomorphic sites and 99 polymorphic sites were found, of which 81 were parsimonious sites that provided information to define the haplotypes found. A total of 74.39 transitions and 11.70 transversions were identified, as described in table 2.

On the other hand, the analysis of the distribution between pairs of sequences (Mismatch distribution) performed in the five islands under study as a whole, showed a unimodal distribution as shown in figure 1. The solid line (blue) represents the expected distribution in the case of individuals collected from different islands belong to a stationary population. The dotted line (red) represents the observed distribution. When the analysis was done separately for each island, a unimodal distribution for La Tiburonera and a

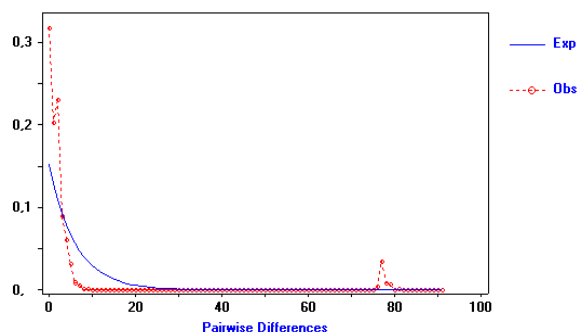
estimación de los parámetros genéticos. Para las poblaciones evaluadas en conjunto la diversidad haplotípica fue  $0.6830 \pm 0.0600$  (varianza 0.0035) y nucleotídica fue  $0.0399 \pm 0.0195$  (varianza 0.0004). En la tabla 1 se observan los valores analizados para cada población.

En las secuencias de la especie *A. tuberculosa* se observaron 99 cambios, los cuales correspondieron a mutaciones que describen 21 haplotipos (Tabla 2).

El análisis de variación nucleotídica indicó porcentajes de composición de bases iguales a 22.6% para citosina (C), 23.5% para timina (T), 38.7% para adenina (A) y 15.2% para guanina (G). El promedio de diferencia de nucleótidos (k) fue de 5.56. Se analizaron 640 bases, donde se encontró 541 sitios monomórficos y 99 sitios polimórficos, de los cuales 81 fueron sitios parsimoniosos que brindaron información para definir los haplotipos encontrados. Se identificó en total 74.39 transiciones y 11.70 transversiones, descritas en la tabla 2.

Por otro lado, el análisis de la distribución entre pares de secuencias (*Mismatch distribution*) realizado en las cinco islas de estudio en conjunto, presentó una distribución unimodal como se aprecia en la figura 1. La línea continua (azul) representa la distribución esperada en el caso que los individuos colectados de diferentes islas pertenezcan a una población estacionaria. La línea discontinua (roja) representa la distribución observada. Cuando el análisis se hizo por separado para cada isla, se observó para La Tiburonera una distribución unimodal, y para las demás islas (San Jorge, El Pajal, La Playa y Bajito Vaquería) una distribución multimodal (Figura 2).

El valor del estadístico  $F_s$  de  $F_u$  resultó negativo y no significativo ( $F_s = -2.96$ ). Cuando fue estimado para cada isla estudiada se encontró valor



**Figure 1.** Frequency distribution of the number of nucleotide differences of sequences of the COI gene of *Anadara tuberculosa* for all sequences as a whole.

multimodal distribution for the other islands was observed (San Jorge, El Pajal, La Playa and Bajito Vaqueria) (Figure 2).

The value of the  $F_s$  statistic of  $F_u$  was negative and non-significant ( $F_s=-2.96$ ). When it was estimated for each island studied, a negative value was found in three of them (San Jorge  $F_s=-0.87$ , La Tiburonera  $F_s=-0.94$  and La Playa  $F_s=-0.20$ ) and a positive value was found for the remaining islands (El Pajal  $F_s=4.53$  y Bajito Vaqueria  $F_s=2.57$ ).

The molecular analysis of genetic variance and structure showed that there is no population structure in the mitochondrial region of *A. tuberculosa* studied (Table 3), finding that only 4.20% of the total variation observed is explained by the variation between islands ( $F_{ST}=0.042$ ,  $p \leq 0.05$ ).

**Table 3.** Analysis of Molecular Variance (AMOVA) according to 2006 Arlequin program. Degrees of freedom (D.F.), Sum of squares (S.C.),  $p \leq 0.05$ .

Variation sources	D.F.	SC	Variance components	Variance percentage
Between populations	4	201.695	1.34188 Va	4.20
In populations	69	2.111.657	30.60372 Vb	95.80
Total	73	2.313.351	3.194.560	

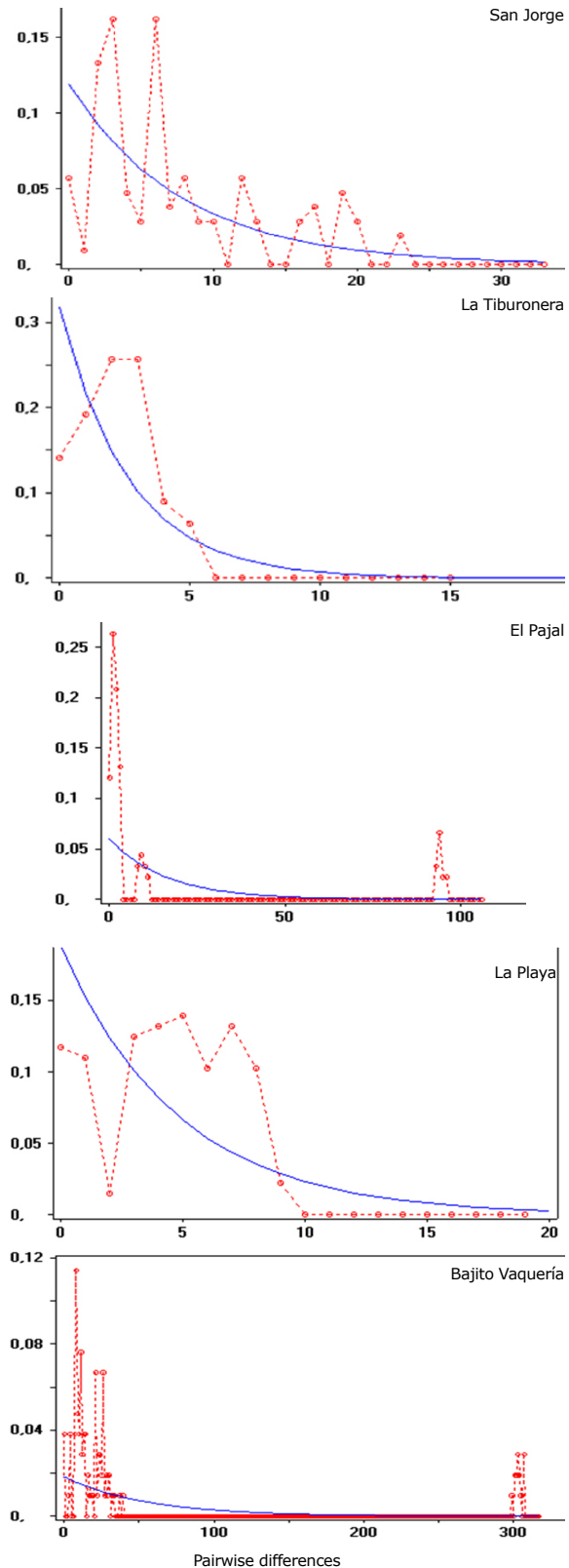
As shown in table 4, the paired population analysis revealed genetic differences below 0.10, except for the data observed between the Tiburonera and Playa islands ( $F_{ST}=0.19$ ,  $p \leq 0.05$ ).

**Table 4.** Values of the fixation index ( $F_{ST}$ ) among pairs of populations, according to 2006 Arlequin program.

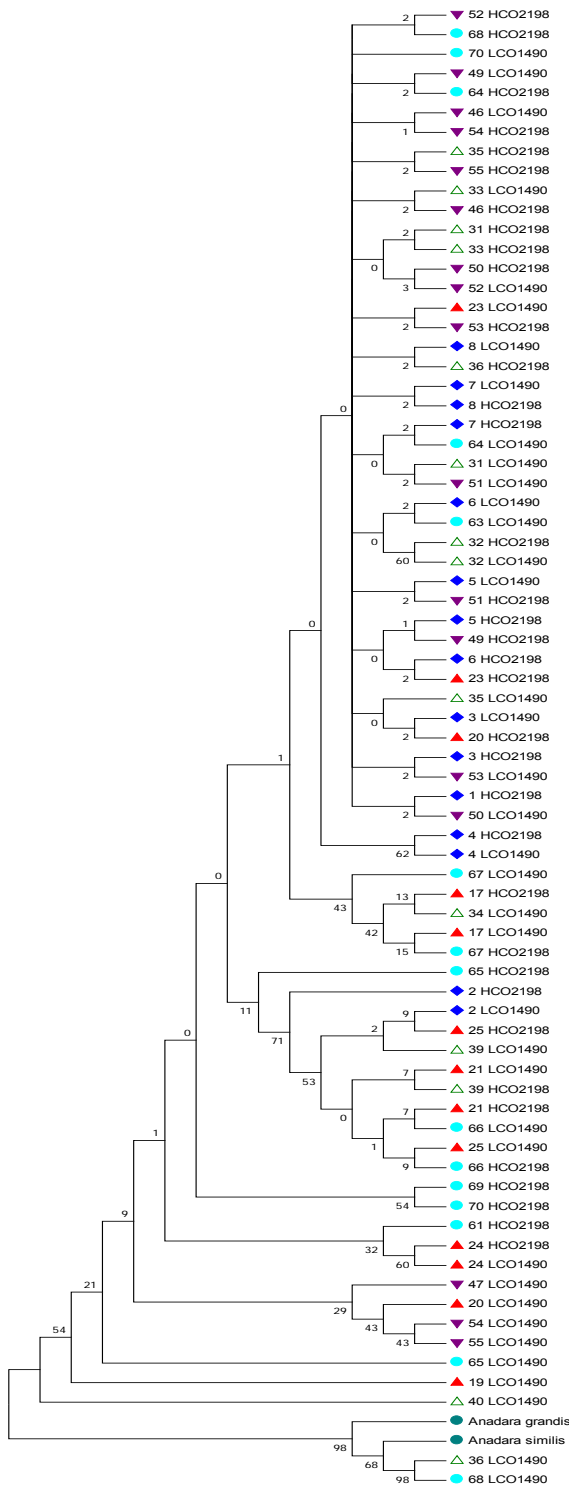
Site	Fixation Index ( $F_{ST}$ )	$F_{ST}$ between population pairs				
		SJ	LT	EP	LP	BV
Total	0.04201					
SJ	0.09248	0.000				
LT	0.01677	0.086	0.000			
EP	-0.02837	0.027	-0.035	0.000		
LP	0.10020	0.044	0.186	0.071	0.000	
BV	0.01314	0.073	-0.013	-0.031	0.148	0.000

SJ: San Jorge; LT: La Tiburonera; EP: El Pajal; LP: La Playa y BV: Bajito Vaqueria. NS: no significant differences; \*:  $p \leq 0.05$

Finally, figure 3 shows the phylogenetic tree of the resulting groups among individuals from the five islands. A total of 138 positions were found in the final data set.



**Figure 2.** Frequency distribution of the number of nucleotide differences between pairs of COI gene sequences of *Anadara tuberculosa* in the five populations evaluated.



**Figure 3.** Visualization of the phylogenetic tree for the species *Anadara tuberculosa*, found using the Mega4 program. The symbols mean the geographical population, as shown below.  
 ▲ : La Playa. ● : Bajito Vaqueria. ▲ : El Pajal. ▲ : La Tiburonera. ● : San Jorge.

negativo en tres de ellas (San Jorge  $F_s = -0.87$ , La Tiburonera  $F_s = -0.94$  y La Playa  $F_s = -0.20$ ) y positivo para las islas restantes (El Pajal  $F_s = 4.53$  y Bajito Vaquería  $F_s = 2.57$ ).

El análisis molecular de varianza y estructura genética, evidenciaron que no existe estructura poblacional en la región mitocondrial de *A. tuberculosa* estudiada (Tabla 3), encontrando que sólo el 4.20% de la variación total observada se explica por la variación entre islas ( $F_{ST} = 0.042$ ,  $p \leq 0.05$ ).

Como se aprecia en la tabla 4, el análisis por pares de poblaciones evidenció diferencias genéticas inferiores a 0.10 a excepción de lo observado entre las islas de la Tiburonera y la Playa ( $F_{ST} = 0.19$ ,  $p \leq 0.05$ ).

Por último en la figura 3 se evidencia el árbol filogenético de los grupos resultantes entre individuos procedentes de las cinco islas. Se encontraron un total de 138 posiciones en el conjunto de datos final.

### DISCUSIÓN

*A. tuberculosa* es un molusco bivalvo que se encuentra asociado a las raíces del mangle, especialmente *Rhizophora* spp., en el Pacífico americano. En Colombia son los bivalvos más explotados en el litoral Pacífico y de ellos se benefician las comunidades que habitan esta región (2).

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

La diversidad haplotípica encontrada para *A. tuberculosa* en el presente estudio es menor ( $H = 0.683$ ) y la diversidad nucleotídica es mayor ( $\pi = 0.040$ ) a las encontrados por otro estudio para *Neosarmatium meinerti* (14). Del mismo modo, para un mejillón domesticado *Mytilus coruscus*, obtiene una diversidad genética con la misma tendencia ( $H = 0.895$  y  $\pi = 0.008$ ), (15). Estos resultados de diversidad indican una posible expansión poblacional (16); sin embargo, se requiere de estudios más avanzados para especificar este aspecto, como lo son la metagenómica, epigenómica, proteómica, metabolómica (17).

## DISCUSSION

*A. tuberculosa* is a bivalve mollusk that is associated with the roots of mangroves, especially *Rhizophora spp.*, in the American Pacific. In Colombia, they are the most exploited bivalves in the Pacific coast and the communities that inhabit this region benefit from them (2).

The results obtained in this study, using the COI gene as genetic marker, are the first reports on the genetic diversity for *A. tuberculosa*; therefore, the results obtained were analyzed by comparison with studies on other bivalves.

The haplotype diversity found for *A. tuberculosa* in this study is lower ( $H=0.683$ ) and the nucleotide diversity is greater ( $\pi=0.040$ ) than those found in another study for *Neosarmatium meinerti* (14). Similarly, for a domesticated mussel *Mytilus coruscus*, it shows a genetic diversity with the same tendency ( $H=0.895$  and  $\pi=0.008$ ), (15). These diversity results indicate a possible population expansion (16); however, more advanced studies are needed to specify this aspect such as metagenomics, epigenomics, proteomics, metabolomics (17).

Although studies report the same relationship between haplotype and nucleotide diversity, Regionieri et al (14) and González et al (16) report values higher than those found for *A. tuberculosa* in this study ( $h=0.683$ ). This loss of variability is probably associated with the fishing of this species without any catch restriction by minimum size (1.18), thus avoiding the genetic flow to the next generation. Similarly, this declining trend in genetic diversity may be related to the discharge of large volumes of waste into mangroves, the high water temperatures reported and oil pollution. The genetic diversity observed is the result of the action of the forces of mutation and natural selection, derived from the response of individuals to natural and anthropological environmental changes.

On the other hand, the value of the  $F_s$  statistic of  $F_u$  reported in this study shows an excess in the number of alleles, as it would be expected from a recent population expansion by linkage or drag. With respect to the analysis of the distribution between pairs of sequences or "Mismatch distribution" carried out in the five study populations as a whole, it showed a unimodal distribution, demonstrating that there is a moderate population expansion and that it is in demographic growth or that it has suffered a recent demographic expansion. The analysis for each population shows only a unimodal distribution for La Tiburonera, and for the other populations (San Jorge, El Pajal, La Playa and Bajito Vaquería) the distribution is multimodal, suggesting

A pesar que los estudios reportan la misma relación entre diversidad haplotípica y nucleotídica Regionieri et al (14) y González et al (16), informan valores mayores a los encontrados para *A. tuberculosa* en el presente estudio ( $h=0.683$ ). Esta pérdida de variabilidad probablemente se asocia a la pesca de esta especie sin restricción de captura por talla mínima (1,18), evitando de este modo el flujo genético a la siguiente generación. Del mismo modo, esta tendencia de disminución de la diversidad genética puede estar relacionada con las descargas de grandes volúmenes de residuos en los manglares, las altas temperaturas del agua reportadas y la contaminación por hidrocarburos. La diversidad genética observada es el resultado de la acción de las fuerzas de mutación y la selección natural, efecto de la respuesta de los individuos a cambios medioambientales naturales y antropológicos.

Por otro lado el valor del estadístico  $F_s$  de  $F_u$  reportado en el presente estudio, representa un exceso en el número de alelos, como sería de esperar de una reciente expansión de la población o arrastre por ligamiento. Con respecto al análisis de la distribución entre pares de secuencias o "Mismatch distribution" realizado en las cinco poblaciones de estudio en conjunto, presentó una distribución unimodal, demostrando que existe una expansión poblacional moderada y que ésta se encuentra en crecimiento demográfico o que ha sufrido una reciente expansión demográfica. Realizando el análisis para cada población se observa solamente para La Tiburonera una distribución unimodal, y para las demás poblaciones (San Jorge, El Pajal, La Playa y Bajito Vaquería) la distribución es multimodal, sugiriendo que estas poblaciones son desiguales y estacionarias. Las distribuciones multimodales también representan una reducción del tamaño efectivo de la población que conlleva a un desajuste multimodal o que las poblaciones están en equilibrio demográfico después de haber pasado por un cuello de botella.

En este estudio, la variación genética observada entre islas ( $F_{ST}=0.04$ ,  $p\leq 0.05$ ) evidencia la ausencia de estructura poblacional de esta especie para el gen COI en La Ensenada de Tumaco, valores que además, fueron similares a los reportados en estudios para otros moluscos (15,19). Por otro lado, el análisis por pares de poblaciones, no presentó diferencias entre los pares de islas: El Pajal y San Jorge, La Playa y San Jorge, El Pajal y La Tiburonera, Bajito Vaquería y La Tiburonera, ni entre Bajito Vaquería y El Pajal. De este modo, se deduce



that these populations are unequal and stationary. Multimodal distributions also represent a reduction in the effective size of the population, which leads to a multimodal mismatch, or that populations are in demographic equilibrium after passing through a bottleneck.

In this study, the genetic variation observed between islands ( $F_{ST}=0.04$ ,  $p\leq 0.05$ ) evidences the absence of the population structure of this species for the COI gene in the Tumaco cove, values that were also similar to those reported in studies for other mollusks (15,19). On the other hand, the analysis by populations pairs showed no differences between pairs of islands: El Pajal and San Jorge, La Playa and San Jorge, El Pajal and La Tiburonera, Bajito Vaqueria and La Tiburonera, or between Bajito Vaqueria and El Pajal. In this way, the existence of a genetic population is inferred as in the observations made in other countries (18,20).

The analysis also shows that there is a structure between the islands of La Tiburonera and San Jorge, Bajito Vaqueria and San Jorge, La Playa and La Tiburonera, La Playa and El Pajal, as well as between Bajito Vaqueria and La Playa. The  $F_{ST}$  value between these islands indicates almost identical allelic frequencies and close to zero. This value also indicates that most haplotypes are shared and have similar frequencies (19).

According to the results of the phylogeny, it is possible to observe the formation of heterogeneous groups of individuals from different mangrove islands, asserting that genetic differences between individuals from each island are not explained by geographic distance. However, it is difficult to trace the phylogeny of organisms in the presence of an horizontal gene transfer, with the use of individual genes as markers (21). All contemporary molecules have their own history that goes back to an individual molecular ancestor. But, it is likely that these molecular ancestors were present in different organisms at different times.

In conclusion, this study showed moderately high haplotype diversity ( $0.683\pm 0.060$ ) when the individuals from each island were treated as one group. Similar values were observed when each island was considered as a population: San Jorge  $0.943\pm 0.040$ , La Tiburonera  $0.859\pm 0.063$ , El Pajal  $0.879\pm 0.058$ , La Playa  $0.882\pm 0.052$  and Bajito Vaqueria  $0.962\pm 0.040$ . This shows that, despite the decrease in the density of the population of *A. tuberculosa* in mangroves, there is no decrease in the values of genetic diversity.

Similarly, the nucleotide diversity reported in general was low for all the islands and equal to  $0.040\pm 0.020$  and for each island studied: San

la existencia de una población genética igual a lo observado en otros países (18,20).

El análisis también evidencia que existe estructuración entre las islas La Tiburonera y San Jorge, Bajito Vaquería y San Jorge, La Playa y La Tiburonera, La Playa y El Pajal, así como entre Bajito Vaquería y La Playa. El valor de  $F_{ST}$  entre estas islas indica frecuencias alélicas casi idénticas y cercanas a cero. Valor que también indica que la mayoría de haplotipos están compartidos y tienen frecuencias similares (19).

De acuerdo con los resultados de la filogenia se puede observar la formación de grupos heterogéneos con individuos de diferentes islas de manglar, afirmando que las diferencias genéticas entre los individuos procedentes de cada isla no se explican por la distancia geográfica. Sin embargo, es difícil trazar la filogenia de organismos en presencia de transferencia horizontal de genes, con el uso de genes individuales como marcadores (21). Todas las moléculas contemporáneas tienen su propia historia que se remonta a un ancestro molecular individual. Pero, es probable que estos ancestros moleculares estuvieran presentes en distintos organismos en tiempos distintos.

En conclusión el presente estudio evidenció diversidad haplotípica moderadamente alta ( $0.683\pm 0.060$ ) cuando los individuos procedentes de cada isla fueron tratados como un grupo. Iguales valores se observaron cuando se consideró cada isla como una población: San Jorge  $0.943\pm 0.040$ , La Tiburonera  $0.859\pm 0.063$ , El Pajal  $0.879\pm 0.058$ , La Playa  $0.882\pm 0.052$  y Bajito Vaquería  $0.962\pm 0.040$ . Lo anterior evidencia que, a pesar de la disminución en la densidad de la población de *A. tuberculosa* en los manglares, no existe una disminución en los valores de diversidad genética.

Del mismo modo, la diversidad nucleotídica reportada en general fue baja para todas las islas e igual a  $0.040\pm 0.020$  y para cada isla estudiada fue: San Jorge  $0.013\pm 0.003$ , La Tiburonera  $0.014\pm 0.003$ , El Pajal  $0.096\pm 0.066$ , La Playa  $0.008\pm 0.001$  y Bajito Vaquería  $0.103\pm 0.062$ .

El análisis molecular de varianza no evidenció una estructura genética  $F_{ST}=0.042$  ( $p\leq 0.05$ ) entre islas, por lo tanto se considera una sola población con diferencias genéticas dentro de las islas, hecho que se justifica por la variación entre individuos.

Jorge 0.013±0.003, La Tiburonera 0.014±0.003, El Pajal 0.096±0.066, La Playa 0.008±0.001 and Bajito Vaqueria 0.103±0.062.

The molecular analysis of variance did not show any genetic structure  $F_{ST}=0.042$  ( $p \leq 0.05$ ) between islands; therefore, it is considered as a single population with genetic differences within the islands, a fact that is justified by the variation between individuals.

The results obtained from this study generate new knowledge and will serve as comparison parameters for future works aimed at the conservation of *A. tuberculosa* and will become tools for the optimization of repopulation strategies within the mangroves analyzed in the Tumaco cove.

### Acknowledgements

To Universidad Nariño for funding the project. To the Program for Animal Genetic Improvement, for having allowed this project to be carried out. To Benoit Diringer and Concepto Azul for their scientific advice. To Asociación de Concheros de Nariño for the guidance in the mangroves of Tumaco.

Los resultados obtenidos a partir de éste estudio generan nuevo conocimiento y servirán como parámetros de comparación para trabajos futuros encaminados a la conservación de *A. tuberculosa* y se convierten en herramientas para la optimización de estrategias de repoblamiento dentro de los manglares analizados en la ensenada de Tumaco.

### Agradecimientos

A la Universidad de Nariño por la financiación. Al Programa de Mejoramiento Genético Animal, por haber permitido la ejecución del presente proyecto. A Benoit Diringer y Concepto Azul por su asesoría científica. A la Asociación de Concheros de Nariño por la orientación en los manglares de Tumaco.

## REFERENCES

1. Lucero C, Cantera J, Neira R. The fisheries and growth of Ark Clams (Arcoidea: Arcidae) *Anadara tuberculosa* in Malaga Bay, Colombian Pacific, 2005-2007. *Rev Biol Trop* 2012; 60(1):203-17.
2. Lucero-Rincon CH, Cantera JR, Gil-Agudelo DL, Munoz O, Zapata LA, Cortes N, et al. Spatio-temporal analysis of the reproductive biology and recruitment of the bivalve mollusks *Anadara tuberculosa* in the Colombian Pacific coast. *Rev Biol Mar Oceanog* 2013; 48(2):321-34.
3. Espinosa S, Hernández MFD, Riofrío BO, Mejía-Ladino LM, Gil-Agudelo DL. Estado de la población y valoración de algunas estrategias de conservación del recurso piangua *Anadara tuberculosa* (sowerby) en sectores de bazán y nerete, costa pacífica nariñense de Colombia. *Bol Invest Mar Cost* 2010; 39(1):161-76.
4. Flores L, Licandeo R, Cubillos LA, Mora E. Intra-specific variability in life-history traits of *Anadara tuberculosa* (Mollusca: Bivalvia) in the mangrove ecosystem of the Southern coast of Ecuador. *Rev Biol Trop* 2014; 62(2):473-82.
5. López-Rocha J, Félix-Pico E, Hernández-Rivas M. Productividad secundaria en los esteros de la barra de arena El Mogote en la Ensenada de La Paz, Baja California Sur, México. *Hidrobiológica* 2012; 22(1):79-88.
6. Ardila N. NGR, Reyes J. Libro rojo de invertebrados marinos de Colombia. Bogotá, Colombia.: INVEMAR. Ministerio de Medio Ambiente; 2002.
7. Borem A, Fritsche-Neto R. *Biotechnology and Plant Breeding*. San Diego: Academic Press; 2014.
8. Godoy JA. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas* 2009;18(1):23-33.
9. Ghatani S, Shylla JA, Roy B, Tandon V. Multilocus sequence evaluation for differentiating species of the trematode Family Gastrothylacidae, with a note on the utility of mitochondrial COI motifs in species identification. *Gene*. 2014; 548(2):277-84.

10. Eimanifar A, Van Stappen G, Wink M. Geographical distribution and evolutionary divergence times of Asian populations of the brine shrimp *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *Zool J Linn Soc-Lond* 2015; 174(3):447-58. P
11. Marigo J, Cunha HA, Bertozzi CP, Souza SP, Rosas FCW, Cremer MJ, et al. Genetic diversity and population structure of *Synthesium pontoporiae* (Digenea, Brachycladiidae) linked to its definitive host stocks, the endangered Franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei* (Pontoporiidae) off the coast of Brazil and Argentina. *J Helminthol* 2015; 89(1):19-27.
12. Vaschetto LM, Gonzalez-Ittig RE, Vergara J, Acosta LE. High genetic diversity in the harvestman *Geraecormobius sylvarum* (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae) from subtropical forests in north-eastern Argentina revealed by mitochondrial DNA sequences. *J Zool Syst Evol Res* 2015; 53(3):211-8.
13. Fu YX. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics Society of America* 1997; 147:925.
14. Ragionieri L, Cannicci S, Schubart CD, Fratini S. Gene flow and demographic history of the mangrove crab *Neosarmatium meinerti*: A case study from the western Indian Ocean. *Estuar Coast Shelf S* 2010; 86(2):179-88.
15. Shen YB, Li JI, Feng BB. Genetic Analysis of Cultured and Wild Populations of *Mytilus coruscus* Based on Mitochondrial DNA. *Zoological Research* 2009; 30(3):246.
16. González RR, Himelreichs JF, Cruzat FA, Asencio GC, Oyarzún P, Hernández-Miranda E. Frequent haplotypes of caged *Caligus rogercresseyi* in the austral south of Chile: The result of a long term serial passage experiment? *Aquaculture* 2016; 450:143-153.
17. Gómez-Chiarri M, Guo X, Tanguy A, Hee Y, Proestou D. The use of -omic tools in the study of disease processes in marine bivalve mollusks. *J Invertebr Pathol.* 2015; 131:137-154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.007>
18. Benavides AMS, Carrion RB. Abundance and morphometry of *Anadara-tuberculosa* and *Anadara-similis* (Mollusca : bivalvia) in the Purruja Mangrove Swamp, Golfo Dulce, Costa Rica. *Rev Biol Trop* 2001; 49:315-20.
19. An HS, Park KJ, Cho KC, Han HS, Myeong J-I. Genetic structure of Korean populations of the clam *Ruditapes philippinarum* inferred from microsatellite marker analysis. *Biochem Syst Ecol* 2012; 44(0):186-95.
20. Stern-Pirlot A, Wolff M. Population dynamics and fisheries potential of *Anadara tuberculosa* (Bivalvia : Arcidae) along the Pacific coast of Costa Rica. *Rev Biol Trop* 2006; 54:87-100.
21. Zhaxybayeva O, Gogarten P. Cladogenesis, coalescence and the evolution of the three domains of life. *Trends Genet* 2004; 20(4):187.