

## TRABAJOS ORIGINALES

Presentado: 19/07/2019  
Aceptado: 13/04/2020  
Publicado online: 25/05/2020  
Editor:

### Autores

#### Rina Ramírez\* <sup>1,2</sup>

rramirez@unmsm.edu.pe  
<https://orcid.org/0000-0003-1924-5844>

#### Maria Solis <sup>1,2</sup>

mariagsolisquispe@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0003-3051-5796>

#### André Ampuero <sup>1,2</sup>

andre.ampuero.l@upch.pe  
<https://orcid.org/0000-0001-6929-5423>

#### Jaime Morín <sup>1,2</sup>

jgmorin.c16@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0002-7570-1843>

#### Victor Jimenez-Vasquez <sup>1</sup>

vr.jimenez.vs@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0001-6547-6999>

#### Jorge L. Ramirez <sup>1,2</sup>

jramirezma@unmsm.edu.pe  
<https://orcid.org/0000-0001-8138-9203>

#### Carlos Congrains <sup>3</sup>

carloscongrains@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0001-7506-6133>

#### Haydee Temoche <sup>1</sup>

haydee.temoche@unmsm.edu.pe  
<https://orcid.org/0000-0001-5654-9447>

#### Betty Shiga <sup>1</sup>

bshigao@unmsm.edu.pe  
<https://orcid.org/0000-0001-6460-6982>

### Correspondencia

#### \*Corresponding author

1. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Facultad de Ciencias Biológicas
2. UNMSM, Museo de Historia Natural, Av. Arenales 1256, Lima-11, Perú.
3. Universidade Federal de São Carlos- Brasil, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Departamento de Genética e Evolução .

### Citación

Ramírez R, Solis M, Ampuero A, Morín J, Jimenez-Vasquez V, Ramírez JL, Congrains C, Temoche H, Shiga B. 2020. Identificación molecular y relaciones evolutivas de *Pomacea nobilis*, base para la autenticación específica del churo negro de la Amazonia peruana. Revista peruana de biología 27(2): 139- 148 (Mayo 2020). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v27i2.17875>

## Identificación molecular y relaciones evolutivas de *Pomacea nobilis*, base para la autenticación específica del churo negro de la Amazonia peruana

### Molecular identification and evolutionary relationships of *Pomacea nobilis*, basis for the specific authentication of the black apple snail from Peruvian Amazonia

#### Resumen

En la Amazonia Peruana los caracoles dulceacuicolas de la familia Ampullariidae son conocidos como churos y originalmente han sido descritas para Perú alrededor de 20 especies. Aunque son muy usadas para alimentación, medicina tradicional y objeto de muchos estudios para su cultivo e industrialización, solamente es mencionada en la literatura la especie *Pomacea maculata*. Se llevó a cabo la identificación molecular sobre la base del marcador mitocondrial COI, de individuos de churos negros (*Pomacea*) comercializados en los mercados de Iquitos, así como los usados en platos a la carta en la ciudad de Lima, contrastados con otros individuos de procedencia de su hábitat natural. Se encontró que estos especímenes expendidos corresponden a la especie *Pomacea nobilis* (Reeve, 1856). El análisis filogenético molecular mostró que *P. nobilis* es especie hermana de *P. guyanensis*, en el grupo de *P. glauca*, distantemente relacionada de *P. maculata*. Las distancias no corregidas encontradas entre ellas, para el marcador mitocondrial COI, fueron de 11.33% a 13.17%, mientras que con *P. maculata* fueron de 13.67% a 15.33%. Estos resultados demostraron la eficacia del código de barras de ADN para la identificación y autenticación de la especie, lo que le da un valor agregado para su eventual comercio de exportación.

#### Abstract

In the Peruvian Amazon, freshwater snails of the Ampullariidae family are known as churos, and around 20 species have originally been described for Peru. Although they are widely used for food, traditional medicine and the object of many studies for their cultivation and industrialization, only the species *Pomacea maculata* is mentioned in the literature. Molecular identification was carried out based on the mitochondrial marker COI of individuals of "churo negro" apple snails (*Pomacea*) commercialized in the markets of Iquitos, as well as those used in restaurant dishes in the city of Lima, and contrasted with specimens from their natural habitat. It was found that these specimens, correspond to the species *Pomacea nobilis* (Reeve, 1856). The molecular phylogenetic analysis showed *P. nobilis* as the sister species of *P. guyanensis*, in the *P. glauca* group, distantly related to *P. maculata*. The uncorrected distances found between them, for the mitochondrial marker COI, were from 11.33% to 13.17%, while with *P. maculata* were from 13.67% to 15.33%. These results demonstrated the effectiveness of the DNA barcode for the identification and authentication of the species, which gives it added value for its eventual export trade.

#### Palabras claves:

Filogenia molecular; COI; autenticación; Ampullariidae; Amazonia; código de barras de ADN; identificación molecular; taxonomía; identificación de especie; churo negro.

#### Keywords:

Molecular phylogeny; COI; authentication; Ampullariidae; Amazonia; DNA barcoding; molecular identification; Taxonomy; Species identification; apple snails.

## Introducción

Los caracoles dulceacuícolas del género *Pomacea* (Ampullariidae) son conocidos a nivel global como caracol manzana (*apple snail*), en cuanto que en la Amazonia Peruana como churos (Dourojeanni 1965; Llanos et al. 2018). Son consumidos por el poblador amazónico desde tiempos ancestrales (Alcántara & Nakagawa 1996; Lombardo et al. 2013), y están presentes en la culinaria regional (Vetter & Aliaga 2012). El consumo de churos se realiza todo el año, aunque en menor proporción en la época de vaciante (Cobos 1998; Manno et al. 2018), y son comercializados en mercados de Iquitos y otros de la Amazonia peruana, tanto por extractores, cultivadores como revendedores (Cobos 1998). Un proceso de globalización de la culinaria peruana iniciado hace unas décadas ha llevado a difundir la riqueza gastronómica amazónica más allá de los clubes departamentales y provinciales (Chirif 2005), llegándose a crear en Lima un restaurante gourmet dedicado completamente a la cocina amazónica donde uno de los platos más solicitados es el churo (Ferraro Vidal 2019).

La literatura regional correspondiente a los churos solo menciona a la especie *Pomacea maculata*, por ejemplo, en estudios sobre su biología (Mayta 1978; Alcántara et al. 1996; Alcántara & Nakagawa 1996; Cobos 1998; MINAM, 2014; Alcántara et al. 2015), cultivos (Padilla Pérez et al. 2000; Alcántara & Colace 2001; Álvarez & Ríos 2009; Ríos & Alava 2012), etnobiología (Gasché & Vela 2011; Huertas & Chanchari 2011; Zavaleta et al. 2018), industrialización (Padilla Pérez et al. 2000; López 2001; Sánchez Pinedo et al. 2008) y culinaria (Vetter & Aliaga 2012; Zocchi 2017).

Las especies de la familia Ampullariidae originalmente descritas para Perú son alrededor de 20 (Cowie & Thiengo 2003; Ramírez et al. 2003), y pocas fueron registradas con localidades específicas. Su taxonomía aún está pobremente dilucidada, porque muchas se conocen apenas por caracteres conquiológicos, y no existen revisiones taxonómicas completas que incluyan muestras

peruanas (Ramírez et al. 2003; Ampuero & Ramírez 2017). Ello conduce a un gran número de nombres disponibles relacionados a *Pomacea maculata* [e.g., *P. gigas* (Spix in Wagner, 1827), *P. crosseana* (Hidalgo, 1871)] y *P. urceus* (O. F. Müller, 1774) [e.g., *P. erythrostoma* (Reeve, 1856), *P. guyanensis* (Lamarck, 1822), *P. haemastoma* (Reeve, 1856), *P. nobilis* (Reeve, 1856)] (Pain 1960; Tillier 1980; Cowie & Thiengo 2003). Sobre la base morfológica y genética, Hayes et al. (2012) propusieron a *P. gigas* y *P. insularum* (d'Orbigny, 1835) como sinónimos de *P. maculata*, con amplia distribución en América del Sur, y que junto con *P. canaliculata* (Lamarck, 1822) son especies altamente invasoras, reportadas en América del Norte, Europa y Asia (Rawlings et al. 2007; Hayes et al. 2008; Perez et al. 2017; Yang et al. 2018). Sin embargo, la distribución de *P. maculata* en Perú aún no está confirmada (Hayes et al. 2012).

Ante la ausencia de estudios que confirmen la presencia de *P. maculata* como la especie más usada comercialmente en el Perú, en el presente trabajo se identifica mediante filogenia molecular a los caracoles más expendidos en los mercados de la región Loreto (Perú), conocidos como churos negros, y los usados en un plato gourmet proveniente de un restaurante en Lima.

## Material y métodos

**Obtención del material biológico.-** Se compraron churos en los años 2011, 2017 y 2018 (Tabla 1) en los mercados del departamento de Loreto, como Belén (3°46'01"S 73°14'48"W), Bellavista (3°42'12"S 73°14'54"W) y Yurimaguas (La Florida, 05°55'53.5"S, 076°06'50.0"W); además a pobladores de Nauta (río Marañón, cocha Mullaca, 4°35'10.93"S, 73°36'32.24"W) y río Itaya (4°5'14.75"S, 73°26'48.57"W), así como plato a la carta en la ciudad de Lima (Tabla 1). Los especímenes fueron relajados agregando pequeñas cantidades de etanol al agua que los contenía y sacrificados por shock térmico (4 °C); fueron preservados en etanol al 96 %.

**Tabla 1.** Datos de las 16 secuencias COI de *Pomacea nobilis* generadas en el presente trabajo. Se indica el haplotipo al que pertenece cada muestra.

Localidad en Perú	Coordenadas	Fecha de colecta	Código	# Accesoión en el GenBank	Haplotipo
Reg. Loreto, Cocha Mullaca (río Marañón)	4°35'10.93"S 73°36'32.24"W	18/09/2017	U89Mul	MN325111	H5
		05/02/2018	Z33Mul	MN325112	H7
		05/02/2018	Z58Mul	MN325113	H9
Reg. Loreto, Quebrada Pintuyacu (río Itaya)	4°5'14.75"S 73°26'48.57"W	26/06/2018	AB2k41	MN325117	H2
		26/06/2018	AB16k41	MN325118	H2
		26/06/2018	AB17k41	MN325119	H2
		26/06/2018	AC36k41	MN325120	H2
Reg. Loreto, Mercado Belén (Iquitos)	3°46'01"S 73°14'48"W	18/03/2011	o28MB	MN325109	H3
		19/09/2017	W1MB	MN325110	H11
Reg. Loreto, Mercado Bellavista (Iquitos)	3°42'12"S 73°14'54"W	15/09/2017	W10Pun	MN325105	H6
		15/09/2017	W11Pun	MN325106	H8
		15/09/2017	W12Pun	MN325107	H10
		15/09/2017	W14Pun	MN325108	H1
Reg. Loreto, La Florida (Yurimaguas)	5°55'53.5"S 76°06'50.0"W	16/06/2018	Z32Yur	MN325114	H5
Plato a la carta (Lima)		30/10/2018	AC18	MN325115	H4
		30/10/2018	AC20	MN325116	H3

Para la identificación morfológica se contó con las descripciones originales de las especies descritas para Perú, así como fotografías de los ejemplares tipos de diferentes museos (NHMUK, Natural History Museum, London; NMW.Z., National Museum of Wales, Cardiff, UK). También se revisaron muestras de la colección del Departamento de Malacología del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Los ejemplares utilizados en la presente investigación están depositados en el Departamento de Malacología del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

**Procesamiento molecular.**- Para el análisis se consideraron un total de 16 ejemplares (Tabla 1), trabajados en el Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La extracción de ADN total se realizó a partir de músculo de pie del caracol, mediante el kit de extracción E.Z.N.A. Mollusc DNA de OMEGA Bio-Tek. Un segmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) se amplificó por PCR con los primers de Folmer et al. (1994), LCO 1490 (5'-GGTCA-ACAAATCATAAAGATATTGG-3'), HCO 2198 (5'-TAAACTT-CAGGGTGACCAAAAAATCA-3'). Cada reacción de PCR fue trabajada en un total de 30 µL, cuyo mix conformado por solución buffer PCR 1X, 0.2 mM dNTP, 0.3 µM de cada primer, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 unidad de Taq DNA polimerasa, 3 µL de DNA genómico, y agua bidestilada para completar el volumen. Para la amplificación se comenzó con una denaturación inicial de 96 °C por 1 min, seguida de 35 ciclos: Denaturación a 95 °C por 60 s, hibridación de los iniciadores a 40°C (40 – 54 °C) por 60 s y extensión a 72

°C durante 90 s, terminando con un paso de extensión final a 72 °C por 7 min. La visualización de los productos de PCR se realizó en electroforesis submarina, con gel de agarosa a 1% preteñida con Sybr Green, a 60 voltios por 20 min. Ambas hebras de los amplicones fueron secuenciadas por la compañía MacroGen Korea (<https://dna.macrogen.com/eng/>). Las 16 secuencias se encuentran depositadas en la base de datos GenBank (Códigos de Acceso MN325105-MN325120) (Tabla 1).

**Análisis de datos moleculares.** Las secuencias recibidas en formato AB1 fueron editadas en CHROMAS LITE (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>) y las secuencias consenso obtenidas con el programa CAP3 Sequence Assembly Program (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>). La primera evaluación de las secuencias se realizó usando BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para descartar posibles contaminantes y hacer una identificación molecular preliminar. Secuencias (21) del gen COI de ocho especies del género *Pomacea*, incluyendo *P. maculata*, fueron obtenidas del GenBank para los análisis comparativos correspondientes (Tabla 2).

Las secuencias fueron alineadas con CLUSTAL W (Thompson et al. 1994). La evaluación de los haplotipos, y los cálculos de la diversidad haplotípica y nucleotídica fueron realizados con el programa DnaSP (Librado & Rozas 2009). Para obtener las distancias genéticas se usó distancia p en el programa MEGA (Tamura et al. 2011), así como para el análisis filogenético por Neighbour-Joining (NJ), en el que se emplearon 1000 réplicas de *bootstrap* para estimar el soporte de los nodos. Las distancias genéticas se graficaron usando el programa R (R Core Team 2016).

**Tabla 2.** Especies, procedencia, números de accesoión y referencias de las secuencias COI obtenidas en el GenBank.

Especie	Espécimen (haplotipo), País	# Accesoión	Referencia
<i>P. guyanensis</i>	GF02, French Guiana	FJ710319.1	Hayes 2009; Hayes et al. 2009b
<i>P. guyanensis</i>	BR400, Brazil	FJ710320.1	Hayes 2009; Hayes et al. 2009b
<i>P. guyanensis</i>	BR100, Brazil	FJ710321.1	Hayes 2009; Hayes et al. 2009b
<i>P. glauca</i>	SR05, Suriname	FJ710322.1	Hayes 2009; Hayes et al. 2009b
<i>P. glauca</i>	VE07, Venezuela	FJ710323.1	Hayes 2009; Hayes et al. 2009b
<i>P. maculata</i>	KM002, USA	KM107827.1	Deaton et al. 2016
<i>P. maculata</i>	KM013, USA	KR350499.1	Deaton et al. 2016
<i>P. insularum</i>	BR245, Brazil	EU528568.1	Hayes 2009; Hayes et al. 2009b
<i>P. insularum</i>	Hap3, Argentina	AB728584.1	Yoshida et al. 2014
<i>P. canaliculata</i>	Hap2, Argentina	AB728586.1	Yoshida et al. 2014
<i>P. canaliculata</i>	Hap3, Argentina	AB728587.1	Yoshida et al. 2014
<i>P. canaliculata</i>	HI39, USA	EU523129.1	Tran et al. 2008
<i>P. dolioides</i>	BR140, Brazil	EU528555.1	Hayes et al. 2008
<i>P. dolioides</i>	BR143, Brazil	EU528556.1	Hayes et al. 2008
<i>P. dolioides</i>	BR217, Brazil	EU528565.1	Hayes et al. 2008
<i>P. scalaris</i>	AR209, Argentina	EU528532.1	Hayes et al. 2008
<i>P. scalaris</i>	BR56, Brazil	EU528545.1	Hayes et al. 2008
<i>P. bridgesi</i>	BR329, Brazil	EU528573.1	Hayes et al. 2008
<i>P. bridgesi</i>	BR331, Brazil	EU528574.1	Hayes et al. 2008
<i>P. diffusa</i>	BR214, Brazil	EU528564.1	Hayes et al. 2008
<i>P. diffusa</i>	BR72, Brazil	EU528547.1	Hayes et al. 2008

El árbol filogenético de inferencia bayesiana (IB) fue estimado usando el programa BEAST (Bouckaert et al., 2014), usando un reloj relajado log normal, un modelo *birth and death* y el modelo de sustitución HKY+I+G, estimado en jModelTest (Posada 2008). El análisis fue implementado con 40 millones de cadenas de Markov (MCMC) y un *burn-in* de 10%. La convergencia de las cadenas fue evaluada usando el indicador ESS (*Effective sample size*) el cual fue superior a 200 en todos los *priors*.

## Resultados

**Variabilidad de la concha del churo negro.-** La característica más saltante de las conchas del churo negro es que son gruesas y sólidas, con un color castaño variando hasta casi negro (Figs. 1, 2). La concha es de forma globosa, umbilicada; con espira algo expandida y acuminada; con opérculo córneo. En cuanto al color del periostraco, si bien predomina el color castaño oscuro que se confunde con negro, en una misma población se puede encontrar variación de tonalidades, hasta un castaño claro que permite percibir líneas espirales oscuras, las cuales varían en forma y tamaño. El interior de la concha es de color anaranjado, los hay de diversas tonalidades e inclusive casi rojo. Sin embargo, a diferencia del color de la concha, el color de la parte blanda del caracol es bastante uniforme: el pie es amarillento cremoso, con el dorso, tentáculos y sifón con pigmento de color granate (Fig. 2).

Las características encontradas en las conchas del churo negro corresponderían a las descritas por Reeve (1856) para *Pomacea nobilis*, *P. erythrostoma* y *P. haemastoma*, las que fueron consideradas en la sinonimia de *P. guyanensis* (Lamarck, 1822) y *P. urceus* (Müller, 1774), (ver Pain 1960; Cowie & Thiengo 2003).



Figura 2. *Pomacea nobilis* vivo de Cocha Mullaca.

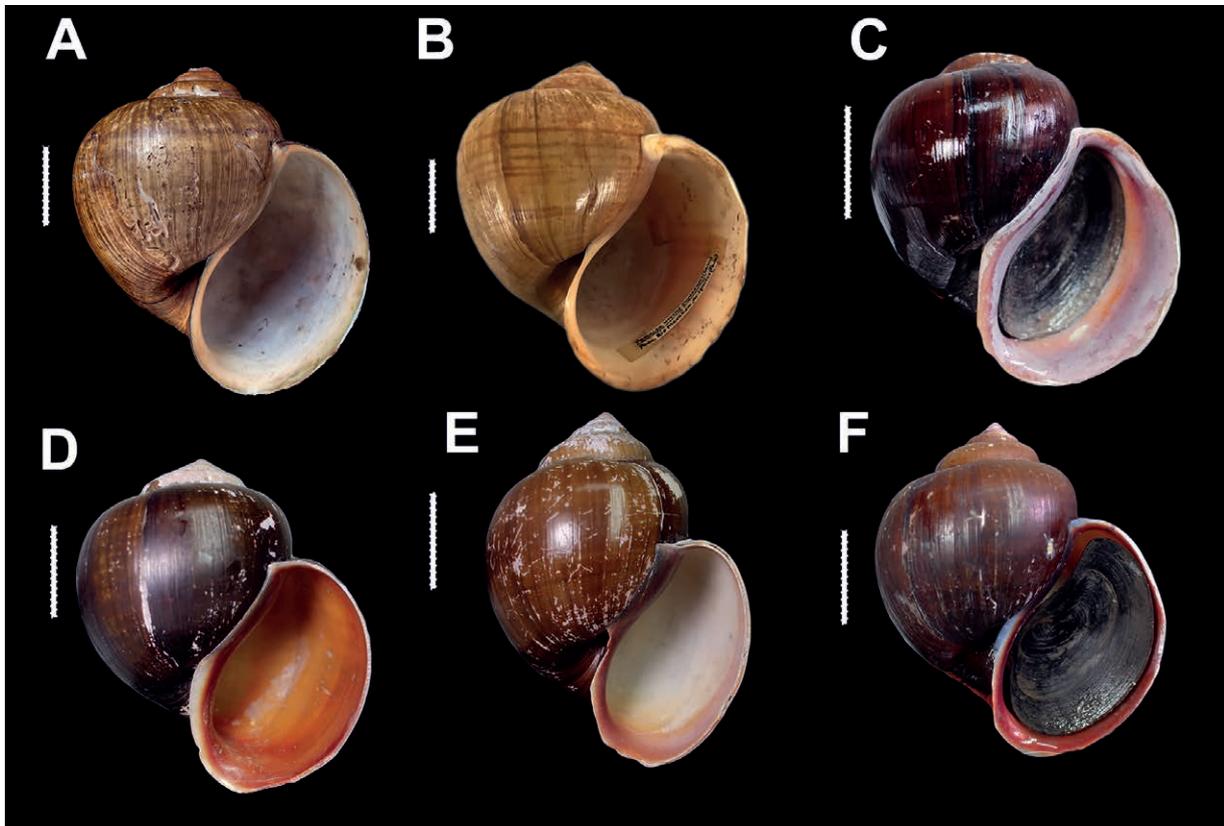


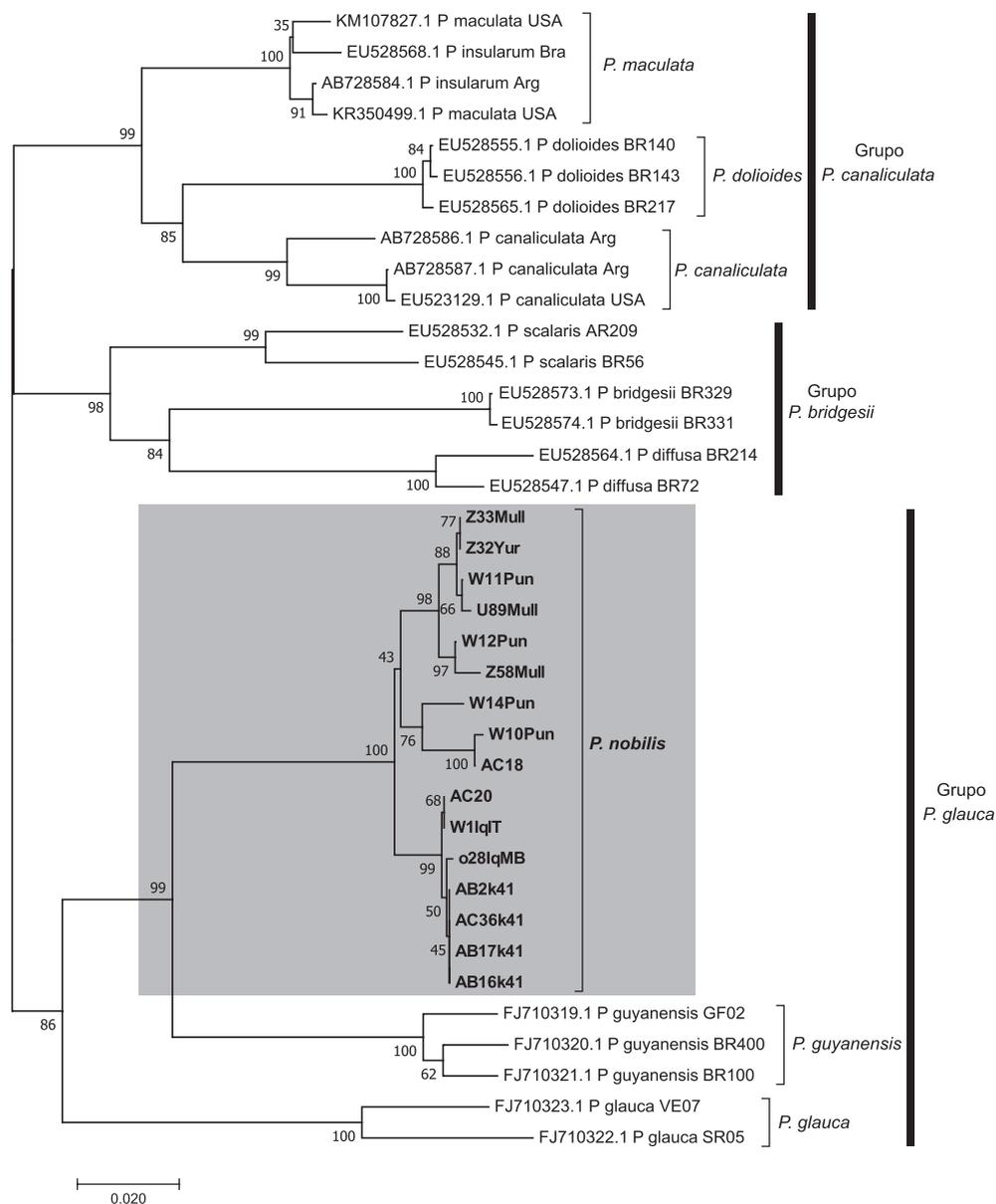
Figura 1. *Pomacea nobilis*. A: Posible sintipo de *Ampullaria nobilis* Reeve, 1856 (NHMUK 20020669) © NHMUK. B: *Pomacea urceus guyanensis* de Perú de la colección de Pain (1960) (NMW.Z.1981.118.04851) © Amgueddfa Cymru- National Museum Wales. C, D: Ejemplares procedentes de Cocha Mullaca. E y F: Especímenes comprados en los mercados de Belén y Bellavista. Escala: 3 cm.

**Distancias genéticas y relaciones evolutivas.-** De las 16 secuencias COI obtenidas en el presente trabajo, dos proceden de un restaurante en Lima donde figuran como plato a la carta, material al que se aplicó las mismas condiciones seguidas para los especímenes completos, obteniéndose resultados óptimos. Ninguna de las 16 secuencias del marcador COI obtenidas de distintos morfotipos de churo negro, así como de un plato servido a la carta, corresponde a alguna especie de *Pomacea* depositada en el GenBank. Sin embargo, sí se observa cercanía a *Pomacea guyanensis* (Lamarck, 1822). Los más altos porcentajes (87.38% y 88.50%) de identidad en el BLASTn lo dieron con *Pomacea guyanensis*.

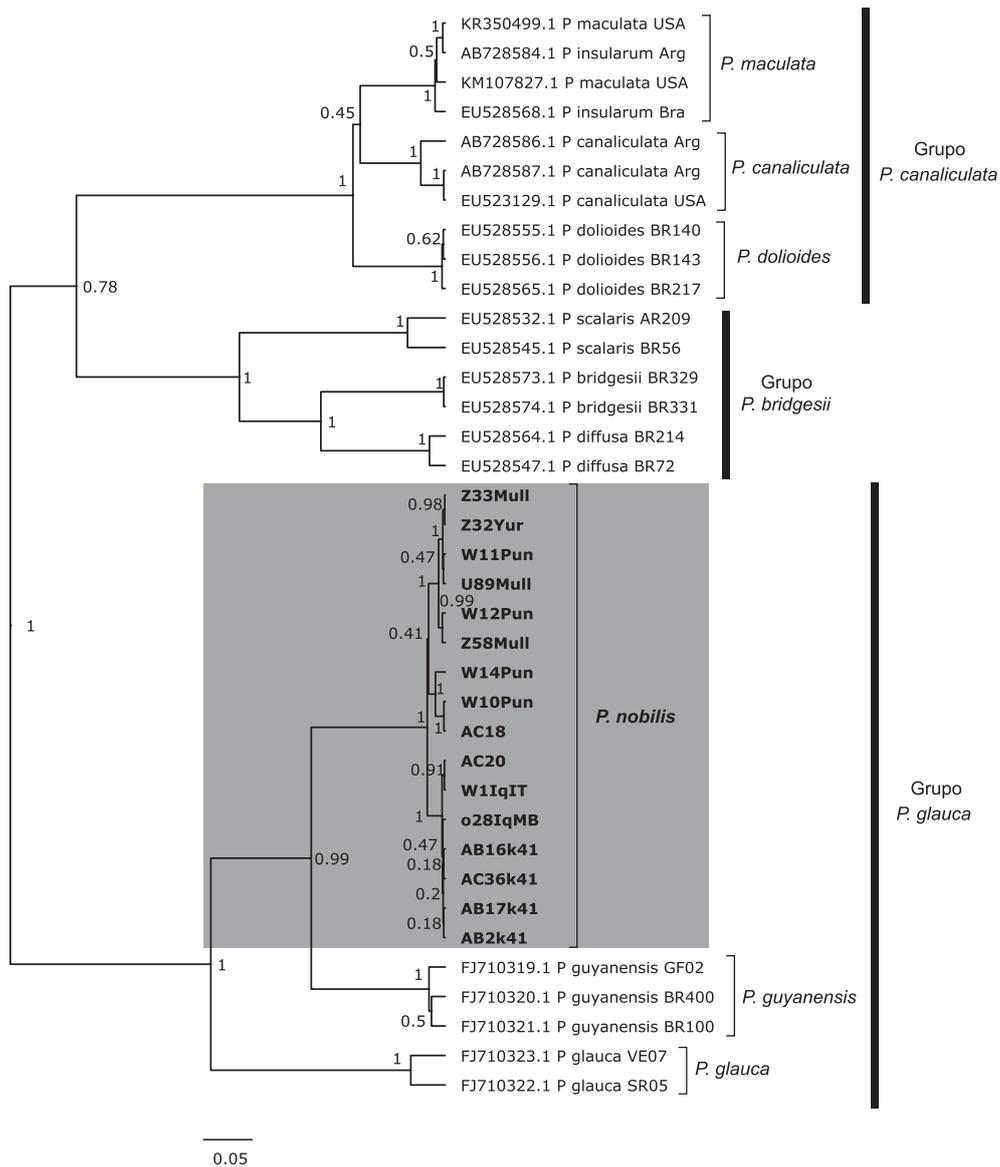
El alineamiento de las 16 secuencias resultó de 709 sitios, considerando los dos *primers*, que colapsaron en 11 haplotipos. Al agregar las 21 secuencias del GenBank

(Tabla 2), y luego de recortar los extremos para ajustar las secuencias al mismo tamaño, el nuevo alineamiento quedó de 600 sitios, sin *indels*, y las 37 secuencias colapsaron en 32 haplotipos. Ninguna de las especies compartió haplotipos. Once haplotipos son del churo negro, que presentó diversidad haplotípica de  $h = 0.9333$ , y diversidad nucleotídica de  $\pi = 0.0184$ .

En la filogenia molecular, las 14 secuencias COI del churo negro y las dos que proceden del plato a la carta servido en la ciudad de Lima formaron un grupo monofilético relacionado con *P. guyanensis* y *P. glauca*, con soporte *bootstrap* de 86% (Fig. 3) y un valor de probabilidad posterior de 1.0 (Fig. 4), siendo hermano del clado de *P. guyanensis*, tanto en el árbol filogenético por NJ, con un soporte *bootstrap* de 99 % (Fig. 3) como por IB, con un valor de probabilidad posterior de 0.99 (Fig. 4).



**Figura 3.** Árbol filogenético para el marcador mitocondrial COI obtenido usando distancias no corregidas, con *Neighbour-Joining*. Los números corresponden a valores de *bootstrap*. La escala corresponde a número de sustituciones por sitio. La nominación de grupos según Hayes (2009) y Hayes et al. (2009a, b). Note que las 16 secuencias de *Pomacea nobilis* conforman un grupo monofilético hermano de *Pomacea guyanensis*.



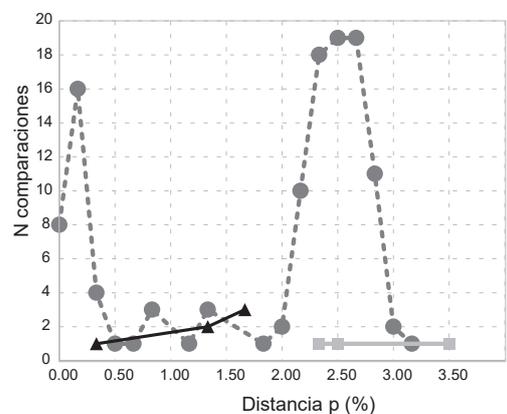
**Figura 4.** Árbol filogenético para el marcador mitocondrial COI obtenido utilizando el modelo de sustitución nucleotídica HKY+I+G, por el método de Inferencia Bayesiana. Los números corresponden a valores de probabilidades posteriores bayesianas. La escala corresponde a número de sustituciones por sitio. La nominación de grupos según Hayes (2009) y Hayes et al. (2009a, b). Note que las 16 secuencias de *Pomacea nobilis* conforman un grupo monofilético hermano de *Pomacea guyanensis*.

El análisis de distancia genética mostró una divergencia intraespecífica del churo negro de entre 0% y 3.17% (Fig. 5), en cuanto que la interespecífica con *P. guyanensis* entre 11.33% y 13.17%, y con *P. maculata* entre 13.67% y 15.33% (Fig. 6).

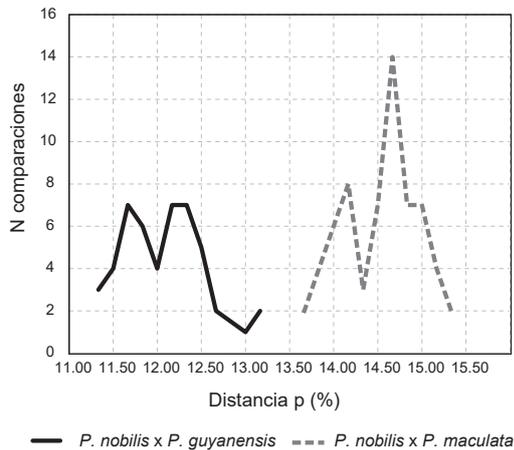
La variación morfológica de la concha no se reflejó en la filogenia molecular. Es así que, de las tres especies de Reeve (1856) antes mencionadas, aquí se identifica al churo negro como *Pomacea nobilis*, (ver discusión).

## Discusión

El churo negro es el caracol dulceacuícola del género *Pomacea* (Mollusca, Ampullariidae) más comercializado en la Amazonia peruana, y utilizado en la cocina gourmet de Lima, y que fue identificado en este trabajo como *Pomacea nobilis* (Reeve, 1856).



**Figura 5.** Distribución de distancia genética no corregida, intraespecífica, para *Pomacea nobilis*, *P. guyanensis* y *P. maculata*. N: número de comparaciones.



**Figura 6.** Distribución de distancia genética no corregida, interespecífica, de *Pomacea nobilis* con *P. guyanensis* y *P. maculata*. N: número de comparaciones.

Encontramos que la variación morfológica de la concha es intraespecífica, y que los morfotipos los podemos identificar como *Pomacea nobilis* (Reeve, 1856), *P. erythrostoma* (Reeve, 1856) y *P. haemastoma* (Reeve, 1856). Sin embargo, basados en el marcador mitocondrial COI, estos morfotipos se agrupan en el mismo clado y por lo tanto podrían representar variaciones de una misma especie. Debemos recalcar que *P. nobilis*, *P. erythrostoma* y *P. haemastoma*, han sido descritas solo sobre la base de sus conchas, y anteriormente ya han sido consideradas como una sola especie. Así, Sowerby (1909a, b) propuso a *P. erythrostoma* y *P. haemastoma* como sinónimos de *P. guyanensis* (Lamarck, 1822). Pain (1960) incluyó a *P. erythrostoma* y *P. haemastoma* en la sinonimia de *P. (Pomacea) urceus guyanensis* (Lamarck, 1819). Más tarde, Tillier (1980) propuso en la sinonimia de *Ampullaria urceus* (Mueller, 1774) a *Pomacea (Pomacea) urceus guyanensis* de Pain (1960), así como también a *A. guyanensis* Lamarck, 1819. Siguiendo a Tillier (1980), Cowie & Thiengo (2003) pasaron a la sinonimia de *P. urceus* a *P. nobilis*, *P. erythrostoma* y *P. haemastoma*. Entre las localidades tipo de las tres últimas especies, solamente la de *P. haemastoma* indica como “Perú”; este es el nombre que usaron Ampuero y Ramírez (2017) en su estudio anatómico descriptivo del churo negro, donde demuestran los aspectos morfológicos que la diferencian de *P. guyanensis* y de *P. urceus*.

En la filogenia molecular de la familia Ampullariidae (Hayes et al. 2009a, b) solo se encuentra a *P. guyanensis*, con material procedente de Guyana Francesa y de Brasil, sin hacer mención alguna a *P. urceus*. Al presente, *P. guyanensis* es considerada una especie válida (Hayes 2009; Massemín et al. 2009; Cowie & Héros 2012). En la filogenia molecular con el marcador COI, las 16 secuencias obtenidas en el presente estudio formaron un clado monofilético, con soporte *bootstrap* de 100% (Fig. 3) y un valor de probabilidad posterior de 1.0 (Fig. 4) y hermano al de *P. guyanensis*, con distancias intraespecíficas de 0 a 3.17% (Fig. 5) y distancias interespecíficas de 11.33% a 13.17% (Fig. 6), diferenciándose ampliamente ambos clados, cuyo nodo resultó fuertemente soportado con

*bootstrap* de 99 % (Fig. 3) y 0.99 de probabilidad posterior (Fig. 4). Aquí nominamos al churo negro como *Pomacea nobilis* (Reeve, 1856: pl. 2, fig. 8), proponiendo una revalidación de esta especie, y por prioridad, quedando como sus sinónimos *P. haemastoma* (Reeve, 1856: pl. 7, fig. 34) y *P. erythrostoma* (Reeve, 1856: pl. 13, fig. 59). El posible sintipo de *P. nobilis* está depositado en el Natural History Museum, London (NHMUK 20020669) (Cowie & Thiengo 2003) (Fig. 1A), con localidad tipo “River Marañón”, en cuanto que el paradero del de *P. erythrostoma* es desconocido, con localidad tipo reconocida por Sowerby (1909a) también para Perú, luego de un error de Reeve (1856) al colocarla para Zanzibar (archipiélago de Tanzania). *Pomacea nobilis* conforma parte del grupo de *P. glauca* (Hayes 2009; Hayes et al. 2009a), como es evidenciado en nuestros resultados por métodos filogenéticos de NJ (Figura 3) e IB (Fig. 4).

El churo negro ha sido referido en la literatura para Perú como *Pomacea maculata*. Sin embargo, al revisar las fotografías o dibujos identificables en esa literatura, se pudo notar que corresponden a *Pomacea nobilis* (Reeve, 1856) (e.g. Mayta 1978; Cobos 1998; Alcántara & Colace 2001; López 2001; Alcántara et al. 2015; Zocchi 2017). En el caso de Cobos (1998), que compara la mención de Pain (1960) para *P. maculata* (por encima de 155x135 mm), indica que la “longitud” y “ancho” máximo de los especímenes observados en el río Marañón fueron de 91.6x74.9mm, lo que está en concordancia con lo encontrado por Ampuero y Ramírez (2017) (entre 75 y 100 mm). Kobelt (1913) da las siguientes medidas para el tipo de *Ampullaria nobilis* Reeve: “Alt. 110, diam. cca. 100 mm.” En cuanto al material de *Pomacea maculata* estudiado por Pain (1960), éste no guarda ninguna semejanza con *P. nobilis*, mas sí el ejemplar que menciona como “*Pomacea urceus guyanensis* (Lamarck)”, cuyo espécimen procedente de “Peru: Río Marañón, nr. Iquitos (Pain)” se encuentra depositado en el National Museum of Wales (NMW.Z.1981.118.04851) (Fig. 1B).

Los ejemplares de *Pomacea nobilis* aquí trabajados proceden de mercados de las ciudades de Iquitos y Yurimaguas de la región Loreto, así como de zonas inundables de los ríos Marañón e Itaya. Esta especie es ampliamente comercializada y puede ser encontrada fácilmente siendo vendida en grandes cantidades (R. Ramírez obs. pers.), así como también lo mencionan Alcántara et al. (2015) que en diciembre del 2011 adquirieron dos lotes de 95 individuos. Cobos (1998) encontró un promedio de hasta 26.85 individuos por m<sup>2</sup> en su hábitat natural en una zona inundada por el río Marañón, y menciona que “la venta se realiza por cientos en el lugar de captura, a embarcaciones que se dirigen a la ciudad de Iquitos” o “transportados por los mismos pobladores hacia puertos de los pueblos más grandes (Santa Rita de Castilla y Nauta) y mercados de la ciudad de Iquitos”. Pero también lo venden fuera de la Amazonia, en platos a la carta servidos en la ciudad de Lima.

Con el presente trabajo queda identificada la especie de churo negro que llega a los mercados de Iquitos, *Pomacea nobilis* (Reeve, 1856), mediante su código de ba-

rras de ADN (Hebert et al. 2003; Ardura et al. 2010; Marín et al. 2018), que es el respaldo molecular fehaciente para autenticar productos procesados que refieren como base al churo negro, antes mal determinado como *Pomacea maculata*. Asimismo, el tener claramente identificada a la especie de churo (caracol manzana, *apple snail*) más comercializada de la Amazonia Peruana, *Pomacea nobilis*, es un paso importante para su eventual exportación, pues el etiquetado correcto es requerido por seguridad alimentaria (Wong et al. 2011; Wallace et al. 2012; Böhme et al. 2019; Calegari et al. 2020).

## Literatura citada

- Alcántara F, Nakagawa N, Zamora E. 1996. Características del desove de churo, *Pomacea maculata* en ambiente controlado. *Folia Amazonica* 8(2): 7-11. <https://doi.org/10.24841/fa.v8i2.317>.
- Alcántara F, Nakagawa N. 1996. Cultivo preliminar de churo, *Pomacea maculata* (Ampullariidae, Gasteropoda, Perry, 1810). *Folia Amazonica* 8(2): 29-34. <https://doi.org/10.24841/fa.v8i2.319>.
- Alcántara F, Colace M. 2001. Piscicultura, seguridad alimentaria y desarrollo sostenible en la carretera Iquitos-Nauta y el Río Tigre. Valorando y preservando nuestros peces amazónicos. Programa de seguridad alimentaria para unidades productivas familiares de la carretera Iquitos-Nauta y el Río Tigre. PROSEAL UPF. IIAP-Iquitos, Terra Nuova-Lima, Perú
- Alcántara F, Manchinari C, Franco P, Núñez J. 2015. Rasgos de vida de *Pomacea maculata* (Gasteropoda, Ampullariidae, Perry 1810) en ambiente controlado. *Folia Amazonica* 24 (1): 9 – 20. <https://doi.org/10.24841/fa.v24i1.61>.
- Álvarez L, Ríos S. 2009. Evaluación económica de la piscicultura en Loreto. Estudio de casos: piscigranjas eje carretera Iquitos-Nauta. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Serie: Avances Económicos N° 12.
- Ampuero A, Ramírez R. 2017. Anatomy of a commercial apple snail from the Peruvian Amazon. pp. 21-38. In: Sant'Anna & Hattori (eds.): Amazonian apple snails. New York: Nova Science Publishers.
- Ardura A, Linde AR, Moreira JC, Garcia-Vazquez E. 2010. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation*, 143, 1438-1443. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.03.019>
- Böhme K, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J, Ortea I. 2019. Review of Recent DNA-Based Methods for Main Food-Authentication Topics. *J. Agric. Food Chem.* 67: 3854–3864. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b07016.
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu C-H, Xie D, Suchard MA, Rambaut A, Drummond AJ. 2014. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLOS Computational Biology*. 10(4):e1003537. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>.
- Calegari BB, Avila EF, Reis RE, Alho CS. 2020. DNA barcode authentication reveals highly fraudulent Cod commerce in Porto Alegre, Brazil. *Forensic Science International: Reports*. 2:100072. <https://doi.org/10.1016/j.fsir.2020.100072>.
- Chirif A. 2005. Biodiversidad amazónica y gastronomía regional. *Folia Amazonica* 14(2): 91-98. <https://doi.org/10.24841/fa.v14i2.148>.
- Cobos M. 1998. Bioecología del churo *Pomacea maculata*, en el Caño Liverpool. Río Marañón. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos, 123 pp.
- Cowie RH, Héros V. 2012. Annotated catalogue of the types of Ampullariidae (Mollusca, Gastropoda) in the Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, with lectotype designations. *zoos*. 34(4):793–824. <https://doi.org/10.5252/z2012n4a8>.
- Cowie RH, Thiengo SC. 2003. The apple snails of the Americas (Mollusca: Gastropoda, Ampullariidae: *Asolene*, *Felipponea*, *Marisa*, *Pomacea*, *Pomella*): A Nomenclatural and Type Catalog. *Malacologia*, 45(1): 41-100.
- Deaton LE, Schmidt W, Leblanc B, Carter J, Mueck K, Merino S. 2016. Physiology of the Invasive Apple Snail *Pomacea maculata*: Tolerance to Low Temperatures. *Journal of Shellfish Research*, 35(1):207-210. <https://doi.org/10.2983/035.035.0122>
- Dourojeanni M.J. 1965. Denominaciones Vernaculares de Insectos y Algunos Otros Invertebrados en la Selva del Perú. *Revista Peruana de Entomología* 8(1): 131-137.
- Ferraro Vidal NM. 2019. Cocina y representación: el caso del restaurante amaZ en Lima. Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Antropología, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294–299.
- Gasché J, Vela N. 2011. Sociedad Bosquesina. Tomo I. Ensayo de antropología rural amazónica, acompañado de una crítica y propuesta alternativa de proyectos de desarrollo. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) – Consorcio de Investigaciones Económicas y Sociales (cies) – Center for Integrated Area Studies, Kyoto University (cias). Iquitos. 292 pp.
- Hayes KA. 2009. Evolution, Molecular Systematics and Invasion Biology of Ampullariidae. PhD Dissertation, University of Hawaii, Honolulu, xvi + 196 p.
- Hayes KA, Joshi RC, Thiengo SC, Cowie RH. 2008. Out of South America: multiple origins of non-native apple snails in Asia. *Diversity and Distributions*, 14: 701–712.
- Hayes KA, Cowie RH, Jørgensen A, Schultheiß R, Albrecht C, Thiengo SC. 2009a. Molluscan Models in Evolutionary Biology: Apple Snails (Gastropoda: Ampullariidae) as a System for Addressing Fundamental Questions. *American Malacological Bulletin*, 27(1/2):47-58 (2009). <https://doi.org/10.4003/006.027.0204>
- Hayes KA, Cowie RH, Thiengo SC. 2009b. A global phylogeny of apple snails: Gondwanan origin, generic relationships, and the influence of outgroup choice (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 98: 61–76.
- Hayes KA, Cowie RH, Thiengo SC, Strong EE. 2012. Comparing apples with apples: clarifying the identities of two highly invasive Neotropical Ampullariidae (Caenogastropoda). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2012, 166, 723–753. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2012.00867.x>
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 270(1512):313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.

- Huertas B, Chanchari M. 2011. Agua, cultura y territorialidad en el pueblo Shawi del río Sillay. eBook. Editorial Terra Nuova, Lima - Perú. 153 pp.
- Kobelt W. 1911-1914. Die Gattung Ampullaria. Neue Folge. In *Abbildungen nach der Natur mit Beschreibungen*. Pp. 1-236, pls. 22-79, in: H. KÜSTER, *Systematisches Conchylien-Cabinet von Martini und Chemnitz*. Neue Folge. Ersten Bandes zwanzigste Abtheilung. Baur & Raspe, Nürnberg.
- Llanos M, Ttito JL, Ruiz W, Yraja P. 2018. Manual de Procesamiento de la Carne de Churo. Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) del Ministerio de la Producción. Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios (UNAMAD), Madre de Dios, Perú, 12 pp.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:14511452 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>.
- Lombardo U, Szabo K, Capriles JM, May J-H, Amelung W, Huttenberger R, Lehndorff E, Plotzki A, Veit H. 2013. Early and Middle Holocene Hunter-Gatherer Occupations in Western Amazonia: The Hidden Shell Middens. *PLoS ONE*. 8(8):e72746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072746>.
- López R. 2001. Enlatado de caracol acuático amazónico *Pomacea maculata* "churo", en salmuera. Tesis para optar el título de Ingeniero en Ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú.
- Manno N, Estraver WZ, Tafur CM, Torres CL, Schwarzingler C, List M, Schoefberger W, Coico FRM, Leon JM, Battisti A, et al. 2018. Edible Insects and Other Chitin-Bearing Foods in Ethnic Peru: Accessibility, Nutritional Acceptance, and Food-Security Implications. *etbi*. 38(3):424-447. <https://doi.org/10.2993/0278-0771-38.3.424>
- Marin A, J. Serna J, Robles C, Ramirez B, Reyes-Flores LE, Zelaya-Mazmela E, Sotil G, Alfaro R. 2018. A glimpse into the genetic diversity of the Peruvian seafood sector: Unveiling species substitution, mislabeling and trade of threatened species. *PLoS ONE* 13(11): e0206596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206596>
- Massemin D, Lamy D, Pointier J-P, Gargominy O. 2009. Coquillages et escargots de Guyane. Seashells and snails from French Guiana. Biotope, Mèze (Collection Parthénope), Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 456 p.
- Mayta LR. 1978. Estudio sobre la biología del "churo" *Pomacea maculata*, (Ampullariidae Gastropoda, Perry) en el laboratorio. *Anales Científicos*. UNA, XVI (1-4): 11-14. Lima: UNA.
- MINAM. 2014. AMAZONÍA. Guía Ilustrada de Flora y Fauna. Ministerio del Ambiente. Lima, Perú.
- Padilla Pérez P, García Vásquez A, Cortez Solís J, Delgado Vásquez C, Mori Pinedo L, Ismiño Orbe R, Montreuil Frías V, Guerra Flores H. 2000. Cultivo y procesamiento del churo. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. [accessed 2020 Apr 12]. <http://repositorio.iiap.gob.pe/handle/IIAP/211>
- Pain T. 1960. *Pomacea* (Ampullariidae) of the Amazon River system. *Journal of Conchology*, 24(12): 421-432.
- Perez KE, Garcia Gamboa V, Schneider CM, Burks RL. 2017. Resaca supports range expansion of invasive apple snails (*Pomacea maculata* Perry, 1810, Caenogastropoda: Ampullariidae) to the Rio Grande Valley, Texas. *Check List* 13(3):2134. <https://doi.org/10.15560/13.3.2134>
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7):1253-1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramírez R, Paredes C, Arenas J. 2003. Moluscos del Perú. *Revista de Biología Tropical*, 51 Supplement 3: Malacología Latinoamericana: 225-284.
- Rawlings TA, Hayes KA, Cowie RH, Collins TM. 2007. The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the continental United States. *BMC Evolutionary Biology* 2007, 7:97 <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-97>.
- Reeve LA. 1856. Monograph of the genus *Ampullaria*. *Conchologia Iconica: or, illustrations of the shells of molluscous animals*. Vol. X. London, Lovell Reeve: Pls. 1-28.
- Rios RD, Alava Huaman NJ. 2012. Evaluación técnica - económica de los niveles de cultivo del "churo amazónico", *Pomacea* sp. (Ampullariidae, Gasteropoda, Perry, 1810), en la región Loreto. Tesis título profesional de Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela de Formación Profesional de Acuicultura. Yurimaguas - Perú.
- Sánchez Pinedo V, Torres Ramirez M, Valderrama Lijarza LL. (2008). Estructura de costos en la crianza de churos para exportación. Tesis para optar el Título de Contador Público, Universidad Nacional de Ucayali, Pucallpa, Perú.
- Sowerby GB. 1909a. Notes on the family Ampullariidae, with list of species, varieties, and synonyms, also descriptions of four new species. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 8: 345-362.
- Sowerby GB. 1909b. Notes on certain types of *Ampullaria* in the Paris and Geneva museums. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 8: 363-364.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28(10):2731-9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121> PMID: 21546353.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*. 22(22):4673-80. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tillier S. 1980. Gastéropodes terrestres et fluviatiles de Guyane Française. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. Nouvelle Série. Série A, Zoologie, 118: 1-189.
- Tran CT, Hayes KA, Cowie RH. 2008. Lack of mitochondrial DNA diversity in invasive apple snails (Ampullariidae) in Hawaii. *Malacologia* 50(1-2): 351-357. <https://doi.org/10.4002/0076-2997-50.1-2.351>.
- Vetter LM, Aliaga RR. 2012. La cocina en las comunidades campesinas del Perú. Ministerio de Cultura, Ministerio de Agricultura. Qhapaqñan, INIA. Lima. ISBN: 978-612-4126-07-9.
- Wallace LJ, Boilard SMAL, Eagle SHC, Spall JL, Shokralla S, Hajibabaei M. 2012. DNA barcodes for everyday life: Routine authentication of Natural Health Products. *Food Research International* 49: 446-452.

- Wong LL, Peatman E, Lu J, Kucuktas H, He S, Zhou C, Na-nakorn U, Liu Z. 2011. DNA Barcoding of Catfish: Species Authentication and Phylogenetic Assessment. *PLoS ONE* 6(3): e17812. doi:10.1371/journal.pone.0017812.
- Yang Q-Q, Liu S, He C, Yu X. 2018. Distribution and the origin of invasive apple snails, *Pomacea canaliculata* and *P. maculata* (Gastropoda: Ampullariidae) in China. *Scientific Reports* (2018) 8:1185. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19000-7>.
- Yoshida K, Matsukura K, Cazzaniga NJ, Wada T. 2014. Tolerance to low temperature and desiccation in two invasive apple snails, *Pomacea canaliculata* and *P. maculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae), collected in their original distribution area (Northern And Central Argentina). *Journal of Molluscan Studies* 80: 62–66. doi:10.1093/mollus/eyt042.
- Zavaleta C, Berrang-Ford L, Ford J, Llanos-Cuentas A, Cárcamo C, Ross NA, Lancha G, Sherman M, Harper SL, Group the IH and A to CCR. 2018. Multiple non-climatic drivers of food insecurity reinforce climate change maladaptation trajectories among Peruvian Indigenous Shawi in the Amazon. *PLOS ONE*. 13(10):e0205714. doi:10.1371/journal.pone.0205714.
- Zocchi DM. 2017. *El Arca del Gusto en Perú. Productos, Saberes e Historias del Patrimonio Gastronómico*. Slow Food® Editore. Perú. ISBN: 978-88-8499-504-9.

#### **Agradecimientos / Acknowledgments:**

Nuestro agradecimiento a Fátima Rivera, Thalía Silvestre, María Flórez y Sandra Justino por su invaluable apoyo en el laboratorio. A los señores Rolan Chujutalli, Juan José Lomas y Urdaes Marapara por su apoyo de campo. A Jonathan Ablett del Natural History Museum, UK (NHMUK), y Harriet Wood del Museum of Wales, UK (NMW.Z.), por las fotografías del material tipo.

#### **Conflicto de intereses / Competing interests:**

Los autores no incurrir en conflictos de intereses.

#### **Rol de los autores / Authors Roles:**

RR diseñó el estudio, realizó trabajo de campo, interpretación de los datos y redacción del artículo. MS y JM realizaron los trabajos de campo y de laboratorio. AA manejó la información morfológica. JR, VJ y CC contribuyeron con el análisis de datos. HT y BS contribuyeron con la conservación y manejo del material vivo. Todos contribuyeron con la redacción del artículo.

#### **Fuentes de financiamiento / Funding:**

El presente es un trabajo del Grupo de Investigación "Evolución Molecular de la Biotas en el Perú", subvencionado por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Códigos B17101011, B18100781).

#### **Aspectos éticos / legales; Ethics / legals:**

Los autores declaran no haber incurrido en aspectos antiéticos. El material biológico fue comercial y no se violó ningún aspecto legal.