



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ILPs y STRs  
HETERÓLOGOS EN *Engraulis ringens*

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista

Biotecnólogo

Bach. DIANA ELIZABETH ROJAS MÁLAGA

Lima - Perú

2010

# ACTA SUSTENTACION



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ILPs y STRs  
HETERÓLOGOS EN *Engraulis ringens*

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista

Biotecnólogo

Bach. DIANA ELIZABETH ROJAS MÁLAGA

Asesor interno: Blgo. ROGER QUIROZ BAZÁN

Asesor externo: PhD. RICARDO FUJITA ALARCÓN

Lima - Perú

2010

Dedico esta tesis a las personas que confiaron en mí  
y me alentaron a dar cada día un paso más.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial de mi vida.

A mi familia, María del Carmen Málaga de Los Santos, Erasmo Rojas Berrospi, Claudia Rojas Málaga, Moisés Málaga Baldárrago y Olinda De Los Santos Herrera, por su cariño y su ejemplo.

A mis maestros, Roger Quiroz Bazán, Ricardo Fujita Alarcón, Daniel Oré Chávez, Oscar Acosta y María Luisa Guevara, por compartir generosamente sus conocimientos;

Y a mis colegas y amigos del CGBM, Erika Castillo Carrión, Verónica Mendoza Reinoso, Solange Paredes Moscoso, Mayra Silva Valle y Claudio Villegas Llerena, por brindarme su amistad y apoyo moral.

## ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µL	Microlitros
a.n.	Alelo nulo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AMOVA	Análisis de varianza molecular
AR.	Riqueza alélica
ARN	Ácido ribonucleico
CaM	Calmodulina
CGBM	Centro de Genética y Biología Molecular
Ck-7	Intrón 7 del gen de la creatina quinasa
cm.	centímetros
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
Ee10	Engraulis encrasicolus 10
Ee2	Engraulis encrasicolus 2
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
EPIC	Exon Primed Intron Crossing
Etc.	Etcétera
FAO	Food and Agriculture Organization
FINCyT	Programa de Ciencia y Tecnología
Gh-5	Intrón 5 del gen de la hormona del crecimiento
He	Heterocigosidad esperada
Ho	Heterocigosidad observada
ILP	Intron length polymorphism

IMARPE	Instituto del Mar del Perú
ITS	Internal transcribed spacer
M	Molar
mg	miligramos
mL.	Mililitro
Mlc-3	Intrón 3 del gen de la cadena ligera de la miosina
mM	Milimolar
mm.	milímetros
N	Número de individuos
Na.	Número de alelos
ng	Nanogramos
P(an)	Probabilidad de existencia de alelo nulo
pb	Pares de bases
PIN	Proyecto de Interés Nacional
pmol	picomol
q.s.p	Cantidad por completar
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RAPD	Random Amplification of polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
STR	Short Tandem Repeat
Ta(°C)	Temperatura de hibridación
TE	Tris:EDTA
U	Unidades
UPS	Unidades prácticas de salinidad
USMP	Universidad San Martín de Porres
UV	Ultravioleta

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	19
II. MARCO TEÓRICO	21
II.1. La anchoveta	21
II.1.1. Posición taxonómica de la anchoveta	21
II.1.2. Características de la especie	21
II.1.3. Patrones de distribución	22
II.1.4. Aspectos biológicos	23
II.2. Marcadores moleculares	23
II.2.1. Ventajas de los marcadores moleculares sobre otro tipo de marcadores	24
II.2.2. Clasificación	24
II.2.3. Características	25
II.3. Marcadores microsatélites	26
II.3.1. Características	26
II.3.2. Clasificación	27
II.3.3. Limitaciones	28
II.3.4. Alelos nulos, homoplasias y microsatélites	31



II.3.4.1. Alelos nulos	31
II.3.4.2. Homoplasia	31
II.3.5. Amplificación cruzada	32
II.4. Marcadores intrónicos	33
II.4.1. Técnica Exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR	34
II.4.2. Evaluación de polimorfismos y estudios poblacionales	35
II.5. Análisis estadísticos de los resultados	35
II.6. Cálculo de frecuencias alélicas	36
II.7. Equilibrio Hardy-Weinberg	36
II.8. Pruebas para calcular la desviación del Equilibrio Hardy-Weinberg	38
II.9. Heterocigosis	38
II.9.1. Heterocigosidad Observada ( $H_o$ )	39
II.9.2. Heterocigosidad esperada o Diversidad genética ( $H_e$ )	39
II.10. Índices de Fijación o Estadísticos F	40
II.11. Avances en el estudio de la estructura poblacional de la anchoveta peruana	40
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	42
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	44
IV.1. Material biológico	44
IV.2. Metodología	46

IV.2.1. Extracción de ácidos nucleicos y visualización	46
IV.2.2. Amplificación de los marcadores ILPs y STRs mediante PCR	46
IV.2.3. Visualización de amplicones	51
IV.2.4. Estimación de los niveles de variabilidad genética	51
IV.2.4.1. Diversidad genética	51
IV.2.4.2. Índices de Fijación o Estadísticos F	52
IV.2.4.3. Equilibrio Hardy-Weinberg	52
IV.2.4.4 Variación genética interpoblacional de <i>E. ringens</i>	52
IV.2.4.5. Incidencia de alelos nulos	52
V. RESULTADOS	53
V.1. Extracción de ácidos nucleicos (ADN)	53
V.2. Estandarización de la técnica de PCR para la amplificación de los ILPs y STRs en anchoveta peruana.	54
V.3. Amplificación, genotipaje y estimación de los niveles de variabilidad genética de la población de anchoveta peruana utilizando marcadores ILPs y STRs	58
V.3.1. ILPs	58
V.3.1.1 Intrón 3 de la cadena ligera de la miosina (Mlc-3)	58
V.3.1.2. Intrón 7 de la creatina quinasa (Ck-7)	67
V.3.1.3. Ee10 ( <i>Engraulis encrasicolus</i> 10)	75

VI. DISCUSIÓN	88
VII. CONCLUSIONES	94
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
IX. ANEXOS	102

## LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
Tabla 1. Tipo de microsatelites	28
Tabla 2. Localidades, año y número de muestras de <i>E. ringens</i> analizadas en la presente tesis.	44
Tabla 3. Características de los marcadores empleados en el presente trabajo.	48
Tabla 4. Detalles de resultados generales reportados en la Tabla 4. Detalles de resultados generales reportados en la literatura utilizando los marcadores empleados en el presente trabajo.	49
TABLA 5. Condiciones probadas para la amplificación de marcadores ILPs y STRs en anchoveta Peruana.	50
Tabla 6. Condiciones finales para la amplificación de marcadores ILPs y STRs en anchoveta peruana	57
Tabla 7. Genotipos encontrados por cala en la anchoveta Peruana usando el marcador Mlc-3	61
Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en anchoveta peruana	62
Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc -3 en la cala "c" (anchoveta Peruana).	62
Tabla 10. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en la cala "i" (anchoveta Peruana)	63
Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en la cala "82" (anchoveta Peruana)	63
Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en la cala "103" (anchoveta Peruana)	63

Tabla 13. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en la cala “124” (anchoveta Peruana)	64
Tabla 14. Estimadores de nivel de variabilidad genética basados en el análisis con Mlc-3	66
Tabla 15. Genotipos encontrados en la anchoveta Peruana usando el marcador Ck-7.	69
Tabla 16. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ck-7 en anchoveta peruana	70
Tabla 17. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ck-7 en la cala “c” (anchoveta Peruana).	70
Tabla 18. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ck-7 en la cala “i” (anchoveta Peruana).	71
Tabla 19. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ck-7 en la cala “3p” (anchoveta Peruana).	71
Tabla 20. Estimadores de nivel de variabilidad genética basados en el análisis con Ck-7.	72
Tabla 21. Valores de Fst entre las diferentes calas analizadas.	73
Tabla 22. Análisis de varianza molecular entre los stock centro y sur en E. ringens.	74
Tabla 23. Genotipos encontrados en la anchoveta Peruana usando el marcador Ee-10.	78
Tabla 24. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la cala “82” (anchoveta Peruana).	80
Tabla 25. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la cala “c” (anchoveta Peruana).	80

Tabla 26. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la cala “i” (anchoveta Peruana).	81
Tabla 27. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la cala “8c” (anchoveta Peruana).	81
Tabla 28. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la cala “3p” (anchoveta Peruana).	82
Tabla 29. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la cala “103” (anchoveta Peruana).	82
Tabla 30. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la cala “124” (anchoveta Peruana).	83
Tabla 31. Estimadores de variabilidad genética basados en la amplificación del STR Ee10.	85
Tabla 32. Posibilidad de alelos nulos en las calas analizadas de anchoveta peruana.	86

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Stock pesqueros de <i>Engraulis ringens</i>	22
Figura 2. Representación gráfica de una secuencia microsatélite trinucleótido (CCA)	26
Figura 3. Gel de poliacrilamida (6%) mostrando variación en el número de STRs y la presencia de “bandas tartamudas”.	29
Figura 4. Diagrama que muestra el polimorfismo de longitud de los microsatélites.	30
Figura 5. Estrategia de amplificación cruzada.	33
Figura 6. Localidades de muestreo de la anchoveta peruana analizadas en el presente estudio.	45
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de ADN extraído de diferentes tejidos de anchoveta Peruana usando el buffer TNES-Urea.	53
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de ADN extraído de tejido muscular de anchoveta Peruana usando el buffer TNES-Urea.	53
Figura 9. Amplicones a 55°C annealing de ILPs, 2.5mM MgCl <sub>2</sub> , Buffer KCl.. Las flechas indican el amplicón esperado.	54
Figura 10. Amplicones a 55°C annealing de ILPs, 2.5mM MgCl <sub>2</sub> , Buffer (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .	55
Figura 11. Amplicones de marcadores ILPs. Reacción estandarizada.	55
Figura 12. STR Ee10. Amplicones a 54 y 60°C annealing de ILPs, diferentes concentraciones de MgCl <sub>2</sub> . Gel de agarosa.	56
Figura 13. STR Ee10. Amplicones a 54 y 60°C annealing de ILPs, diferentes concentraciones de MgCl <sub>2</sub> . Gel de acrilamida.	56
Figura 14. Amplicones de marcador ILP Mlc-3 en anchoveta Peruana. Gel	58

Agarosa.

Figura 15. Electroforesis vertical en gel de acrilamida 5% denaturante de amplicones Mlc-3 en anchoveta Peruana.	59
Figura 16. Electroforesis vertical en gel de acrilamida 5% denaturante de amplicones Mlc-3 en anchoveta Peruana.	59
Figura 17. Alelos encontrados en la población analizada (n=128) del marcador Mlc-3 en anchoveta Peruana.	60
Figura 18. Distribución de frecuencias alélicas del marcador Mlc-3 en la anchoveta peruana a lo largo del litoral peruano.	64
Figura 19. Electroforesis horizontal en gel de agarosa 1.5% (100V, 40 min) del marcador Ck-7 amplificado en anchoveta peruana.	67
Figura 20. Electroforesis vertical en geles de acrilamida 5% denaturante (800V, 12 horas) del marcador Ck-7 amplificado en anchoveta peruana	68
Figura 21. Distribución de la frecuencia alélica del ILP Ck-7 en la anchoveta peruana a lo largo del litoral peruano.	71
Figura 22. Electroforesis horizontal en geles de agarosa 1.5% (100V, 30min) del marcador STR Ee10 amplificado en anchoveta peruana.	75
Figura 23. Electroforesis vertical en geles de acrilamida 5% (500V, 2 horas 30min) del marcador STR Ee10 en anchoveta peruana. Gel: 1mm de grosor.	75
Figura 24. Electroforesis vertical en geles de acrilamida 5% (500V, 2 horas 30min) del marcador STR Ee10 en anchoveta peruana. Gel: 1mm de grosor.	76
Figura 25. Electroforesis vertical en geles de acrilamida 5% (500V, 2 horas 30min) del marcador STR Ee10 en anchoveta peruana. Gel: 0.4mm de grosor	77
Fig 23. Distribución de la frecuencia alélica del STR Ee10 en la anchoveta peruana a lo largo del litoral peruano.	84



## RESUMEN

A pesar de la importancia económica de *Engraulis ringens* en nuestro país, existe una falta de información acerca de la variabilidad y estructura genética de esta especie, debido a que no existen marcadores moleculares específicos.

Se evaluó la utilidad de dos microsatélites heterólogos: Ee10 y Ee2, ambos reportados en la anchoveta europea *E. encrasicolus*; y de tres marcadores intrónicos (ILPs): intrón 3 de la cadena ligera de la miosina Mlc-3, intrón 7 de la creatina quinasa Ck-7 y el intrón 5 de la hormona de crecimiento Gh-5), para estudios genéticos en *E. ringens*. Sólo Ee2 y Gh-5 no amplificaron en esta especie. Los resultados exhibieron 10 genotipos, 10 alelos y una heterocigosidad observada de 0.243 para Mlc-3 y 12 genotipos, 9 alelos y una heterocigosidad observada de 0.611 para Ck-7. Se encontraron altas frecuencias de alelos nulos ( $P_{an}= 0.2005-0.7420$ ) para el loci microsatélite Ee10, a través de las poblaciones analizadas, lo que explicaría el significativo déficit de heterocigotos encontrados en los 168 individuos analizados. Se discuten las frecuencias observadas para cada gen, así como los valores de las comparaciones pareadas de  $F_{st}$  entre todas las poblaciones bajo estudio. Los resultados muestran que el marcador Ck-7 puede ser utilizado en futuros estudios poblacionales.

Palabras clave: *Engraulis ringens*, marcador intrónico, marcador microsatélite, amplificación cruzada, EPIC-PCR, estudios genéticos.

## ABSTRACT

Despite *Engraulis ringens* economic importance in our country, there is a lack of information about the variability and genetic structure of this species, because there are no specific molecular markers.

Two heterologous microsatellites were evaluated: Ee10 and Ee10, both reported in the European anchovy *E. encrasiculos*; and three intronic markers (ILPs): Myosin light chain intron 3 Mlc-3, Creatin kinase intron 7 Ck-7 and Growth hormone intron 5 Gh-5, for genetic studies in *E. ringens*. Ee2 and Gh-5 did not amplify in this species. The results exhibited 10 genotypes, 10 alleles and an observed heterozygosity of 0.243 for Mlc-3 and 12 genotypes, 9 alleles and an observed heterozygosity of 0.611 for Ck-7. High frequencies of null alleles were found over microsatellite loci Ee10 across populations ( $P_{an} = 0.2005-0.7420$ ), which would explain the significant heterozygote deficiencies found in the 168 individuals analyzed. The genotypic frequencies are discussed for each gene, as well as the pairwise population comparisons between all the populations under study. The results show that the marker Ck-7 can be used in future population studies.

Keywords: *Engraulis ringens*, intronic marker, microsatellite marker, cross amplification, EPIC-PCR, genetic studies.

## **I. INTRODUCCIÓN**

---

La anchoveta peruana es una de las especies hidrobiológicas más abundantes en el Océano Pacífico Sur, es una gran generadora de divisas y fuente de alimentación para nuestro país. Sin embargo, no se han realizado estudios en los que se reporte el número de unidades poblacionales, índices de diversidad genética, etc. a lo largo de nuestro litoral, y esto debido a la falta de marcadores genéticos para su estudio. Dicha información es de suma importancia para un manejo adecuado del recurso; nuestra industria crece y en el presente es la segunda pesquería más grande del mundo, luego de China. Si la información sobre la estructura genética de las poblaciones no está incorporada en las prácticas de gestión, la erosión de la variabilidad genética puede pasar desapercibida, y la capacidad de las especies para adaptarse a los cambios ambientales podría perderse.

En este contexto los marcadores moleculares son herramientas útiles. Por lo tanto la creación de información genética de la anchoveta por medio de técnicas moleculares es importante para adecuar estrategias de manejo según su abundancia.

Actualmente los microsatélites son uno de los marcadores genéticos más usados en la ecología molecular. Una estrategia para obtener loci microsatélites es construir una librería genómica. Aunque clonar loci microsatélites es relativamente simple, el desarrollo de estos requiere de experiencia en el campo de la biología molecular, así como tiempo y recursos. Una estrategia alternativa es probar cebadores descritos para loci microsatélites en especies cercanamente relacionadas. Esta estrategia de amplificación cruzada es efectiva sólo si las regiones flanqueantes de los cebadores están conservadas entre especies.

De igual manera se propone el uso de intrones debido a que estos acumulan rápidamente mutaciones y suelen mostrar una alta variabilidad genética, incluyendo polimorfismo de

longitud. Al respecto, varios trabajos han demostrado que la técnica Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC) Polymerase Chain Reaction (PCR), permite utilizar el polimorfismo en longitud de los intrones (ILPs) como un marcador genético en el estudio de poblaciones de varios vertebrados e invertebrados. De esta manera, se utilizó la variación generada por mutaciones grandes (inserción o delección), como la medida de polimorfismo en la longitud de los fragmentos intrónicos.

Es así que la presente tesis tiene como objetivo la evaluación de marcadores genéticos heterólogos en esta especie de importancia económica para su posterior uso en estudios genéticos como la caracterización de su la variabilidad genética, la identificación de unidades poblacionales, trazabilidad, identificación de especie, etc. Se analizó la utilidad de 3 marcadores ILPs y 2 STRs mediante la técnica EPIC-PCR y amplificación cruzada respectivamente.

La presente investigación se realizó bajo la asesoría del Blgo. Roger Quiroz Bazán, en el Laboratorio de Artes y Métodos de Pesca de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y del PhD. Ricardo Fujita Alarcón, en el Centro de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Martín de Porres, y forma parte del proyecto FINCyT-2008 PIN 115: *“Plataforma Tecnológica para evaluar la biodiversidad de recursos marinos: Producción de marcadores genéticos y determinación genético-poblacional de 4 especies peruanas de importancia económica: Anchoqueta (*Engraulis ringens*), Merluza (*Merluccius gayi*), Concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) y Pota (*Dosidicus gigas*)”* financiado por el Programa de Ciencia y Tecnología (FINCyT).

## II. MARCO TEORICO

---

La anchoveta peruana (*Engraulis ringens*), es una de las especies hidrobiológicas más abundantes en el Océano Pacífico Sur. En Perú, se destina usualmente a la elaboración de harina y aceite. Existe actualmente un interés comercial para el consumo humano directo de esta especie.

### II.1 La Anchoveta

Nombre Científico: *Engraulis ringens*

Nombre Común: Anchoveta.

Nombre en Inglés: Anchovy

Nombre FAO: Anchoveta peruana

#### II.1.1 Posición taxonómica de la anchoveta

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Clupeiformes

Familia: Engraulidae

Género: *Engraulis*

Especie: *E. ringens*

#### II.1.2 Características de la especie

La anchoveta es una especie pelágica de talla pequeña, en su etapa adulta alcanza una longitud que oscila entre 12 y 16 centímetros. Su cuerpo es alargado poco comprimido, cabeza larga, el labio superior se prolonga en un hocico y sus ojos son muy grandes. Su

color varía de azul oscuro a verdoso en la parte dorsal y es plateada en el vientre. Vive en aguas moderadamente frías, con rangos que oscilan entre 16° y 23°C en verano y de 14° a 18°C en invierno. La salinidad puede variar entre 34,5 y 35,1 UPS. La anchoveta tiene hábitos altamente gregarios formando enormes y extensos cardúmenes que en periodos de alta disponibilidad, facilita que sus capturas sean de gran magnitud.

### II.1.3 Patrones de distribución y abundancia

Se encuentra distribuida desde Punta Aguja, en Perú (5°50S) hasta Lota, en Chile (37°04 S.L.). Existen dos grandes stocks (Pauly, D y I. Tsukayama, 1987): Uno en el área norte-centro del Perú (Punta Pariñas-San Juan), y otro en el sur Peruano y norte Chileno (Fig. 1).

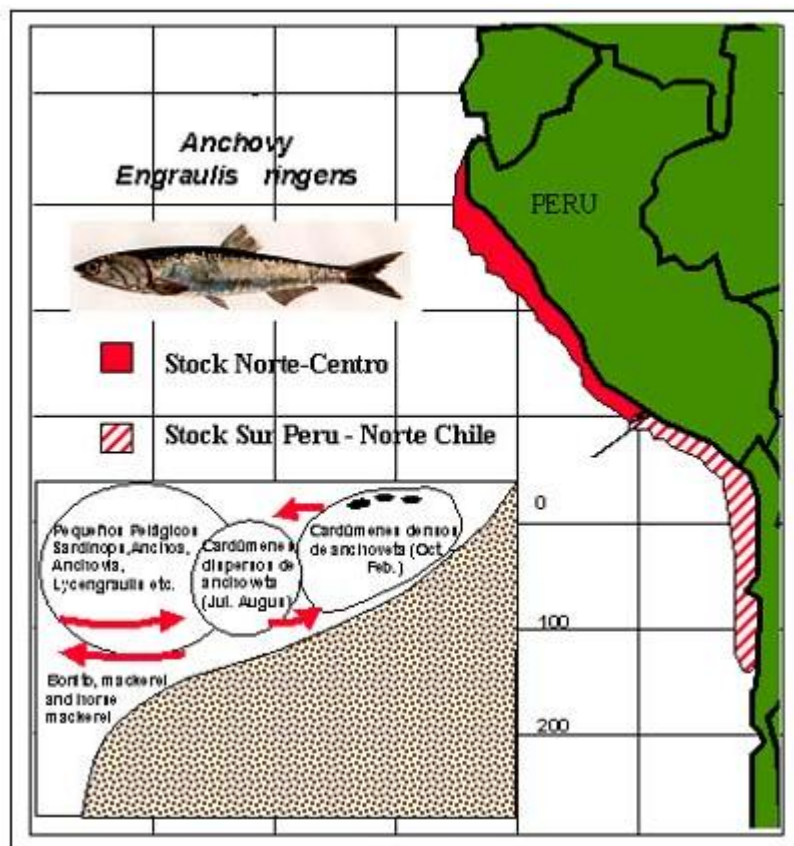


Figura 1. Stocks pesqueros de *E. ringens*.  
Fuente: [www.fao.org](http://www.fao.org)

En los periodos normales es capturada en la franja costera, dentro de las 60 millas náuticas y a profundidades menores de 100 metros. Su distribución vertical esta en relación con las condiciones ambientales.

#### **II.1.4 Aspectos biológicos**

La anchoveta es una especie de crecimiento rápido, su ingreso a la pesquería se da a una talla entre 8 a 9cm de longitud total (5 a 6 meses de edad), principalmente entre diciembre y abril, siendo los grupos de edad de uno y dos años los que constituyen mayormente las capturas. La anchoveta se reproduce todo el año, pero especialmente entre julio y setiembre y en menor proporción durante los meses de febrero y marzo. Tiene sexos separados, alcanza su madurez sexual a los 12 cm y se reproduce mediante la producción de huevos por parte de las hembras, que son fertilizados por el macho en el agua y el embrión se desarrolla fuera del cuerpo de la hembra. Esta especie es planctófaga por excelencia, es decir que se alimenta exclusivamente de plancton (fitoplancton y zooplancton). Durante eventos El Niño, la anchoveta se alimenta mayormente de copépodos y eufausidos; disminuyendo el consumo de fitoplancton en su dieta.

#### **II.2 Marcadores Moleculares**

Con la finalidad de identificar o describir unidades poblacionales de los diversos recursos hidrobiológicos se ha recurrido al uso de marcadores moleculares (Ferrada et al. 2002), marcadores biológicos y morfometría corporal y fauna parasitaria.

Un marcador molecular es un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma cuya herencia puede rastrearse. Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del ADN sin función conocida.

### **II.2.1 Ventajas de los Marcadores Moleculares sobre otro tipo de marcadores**

Los marcadores genéticos son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como la evolución, la ecología, y los estudios de biodiversidad. Entre estos marcadores tenemos: alozimas, ADN mitocondrial y ADN nuclear. Además nos permiten conocer como se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN.

Los marcadores morfológicos cuentan con una serie de desventajas en relación a los marcadores moleculares. A pesar de que son fácilmente disponibles y requiere de un equipo sencillo para su análisis, están sujetos a influencias ambientales, son limitados y en su mayoría pueden utilizarse solamente cuando la especie bajo estudio se encuentra entera o en fase adulta.

De la misma manera, las alozimas, marcadores proteicos, son marcadores universales y fueron las únicas usadas en décadas pasadas antes del desarrollado de las técnicas basadas en el ADN. Una de las principales limitantes ha sido siempre la necesidad de muestras de tejido congeladas que son difíciles de mantener en cadena de frío si el sitio de muestro es remoto del laboratorio. Otra desventaja puede ser el bajo grado de polimorfismo.

### **II.2.2 Clasificación**

Los marcadores moleculares tienen enorme importancia en la investigación genética actual. Estos se pueden clasificar de la siguiente manera (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997):



- Técnicas basadas en la hibridación: Incluye principalmente los RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) donde las sondas son hibridadas a membranas que contienen ADN fragmentado por enzimas de digestión.
- Técnicas basadas en PCR que usan cebadores arbitrarios o amplifican multi-locus: Tienen las características de no necesitar mayor información de la secuencia del genoma que se está investigando. Se pueden mencionar a los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) en el cual los cebadores son escogidos arbitrariamente. En los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism), el ADN es digerido con dos enzimas de restricción, adaptadores son ligados y los cebadores están formados por una parte común comprendida a las bases selectivas.
- Técnicas basadas en PCR de secuencia específica: En las cuales un requisito necesario es el conocimiento de la secuencia de las zonas flanqueantes para la obtención de cebadores. Dentro de esta categoría cabe mencionar a los CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), donde el polimorfismo se debe a los sitios de restricción en la región amplificada, a los microsatélites y marcadores intrónicos, si los cebadores han sido diseñados de las regiones flanqueantes.

### **II.2.3 Características**

Un marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad (Cheng y Crittenden, 1994):

- a. Buena distribución a lo largo del genoma.
- b. Alto grado de polimorfismo (para evitar los problemas de homoplasia).

- c. Ser selectivamente neutros para tener una divergencia genética en relación con el reloj molecular.
- d. Deben ser codominantes para la cuenta directa de los genotipos diploides.
- e. Ser heredados de una forma mendeliana.

Desde un punto de vista práctico:

- a. La técnica para analizar el marcador debe ser rápida y práctica.
- b. Debe poder repetirse con fiabilidad en otros laboratorios.

### II.3 Marcadores microsatélites

También denominados STRs (*short tandem repeats*) (Hancock, 1999).

#### II.3.1 Características

Los microsatélites son secuencias de ADN constituidas por repeticiones en tándem de unidades de 2-6 nucleótidos (pe (TA)<sub>n</sub>) (Fig. 2). La variación en el número de repeticiones es lo que constituye los múltiples alelos, transformándolos en marcadores muy polimórficos (Tautz 1986, Gibbs y col. 1997). Parece ser que éstos se generan por un fenómeno de deslizamiento sobre la secuencia repetida durante la replicación de ADN (Schlötterer y Tautz 1992).

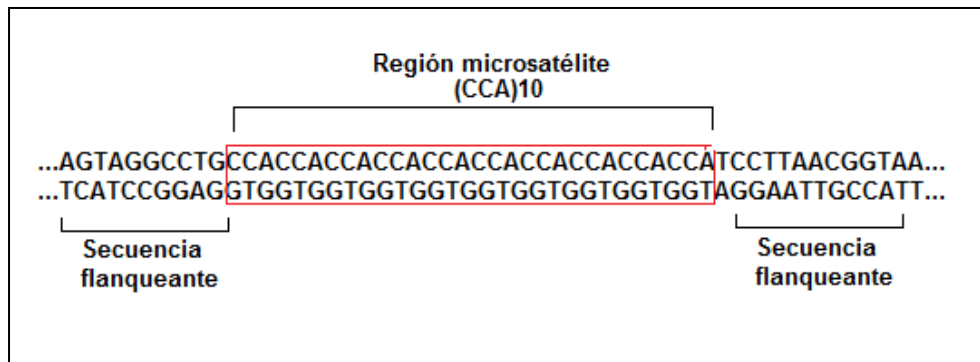


Figura 2. Representación gráfica de una secuencia microsatélite trinucleótido (CCA)

Su análisis está basado en la amplificación por PCR, de modo que se realiza de forma fácil, rápida, a bajo costo y la cantidad de ADN necesaria para su realización es mínima. (Cheng y col. 1995, Luikart y England 1999).

Los microsatélites pueden analizarse empleando geles de poliacrilamida y tinción de nitrato de plata o bromuro de etidio, mediante autorradiografía o, lo más habitual, mediante sistemas automatizados de electroforesis con marcaje fluorescente.

Dado que el ADN adyacente al microsatélite tiene mayor probabilidad de ser conservado, los cebadores derivados de microsatélites se pueden usar a menudo con muchas variedades e incluso con otras especies. La detección de estos marcadores se automatiza fácilmente, son muy polimórficos y tienen buena resolución analítica. Todo esto los convierte en una alternativa preferida como marcadores.

Sin embargo todavía se desconoce el significado actual de estas secuencias, aunque la hipótesis más aceptada apunta a que están relacionados con el empaquetamiento y condensación del ADN en los cromosomas eucariotas.

### **II.3.2 Clasificación**

Chambers y MacAvoy (2000) proponen que los términos puro (o perfecto), compuesto y complejo se utilice para especificar que uno, dos o más tipos de motivos, respectivamente, se encuentran presentes a lo largo de un locus microsatélite dado, y que el término interrumpido (o imperfecto) como un descriptor jerárquico adicional que implica una o más unidades no repetitivas en el interior de los microsatélites.

Tabla 1. Tipo de microsatélites

Tipo de Microsatélite	Ejemplo
STR puro	(CAT) <sub>6</sub>
STR interrumpido puro	(CAT) <sub>5</sub> TG (CAT) <sub>3</sub>
STR compuesto	(AAT) <sub>4</sub> (AT) <sub>2</sub>
STR interrumpido compuesto	(CAT) <sub>3</sub> TG (CAT) <sub>5</sub> GA (TTA) <sub>6</sub>
STR complejo	(CAT) <sub>2</sub> TG (GA) <sub>12</sub> (CAT) <sub>5</sub> GC (TTA) <sub>4+3</sub>

### II.3.3 Limitaciones

Una de las limitaciones con menor frecuencia o efecto, se darían en el caso de mutaciones, ocurridas en el sitio de apareamiento de los cebadores, y tendrían como resultado alelos nulos. Otra limitación es la presencia de “bandas tartamudas” (Fig. 3). Estas últimas se encuentran frecuentemente asociadas con la amplificación de ADN repetitivo como es el caso de los microsatélites. Las “bandas tartamudas” son productos de la amplificación por PCR que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original. La ocurrencia de estos artefactos dificulta la lectura de los geles, e inclusive, repetidamente son confundidos como alelos, complicando el análisis genotípico. Sin embargo estas consideraciones no han desalentado a muchos investigadores quienes han convertido a los microsatélites en una herramienta muy popular (Chambers y MacAvoy 2000). Una vez que las secuencias de los cebadores son diseñadas y publicadas, el análisis de los loci microsatélites es práctico para cualquier laboratorio capaz de realizar las técnicas de PCR y electroforesis.

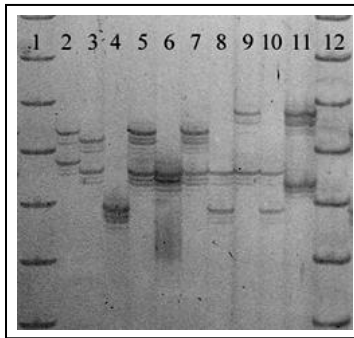


Figura 3. Gel de poliacrilamida (6%) mostrando variación en el número de STRs y la presencia de “bandas tartamudas”. Carril 1 y 12 contienen un marcador de peso molecular de 10pb.

Fuente: [www.st-andrews.ac.uk/~merg/px/PAGE3.jpg](http://www.st-andrews.ac.uk/~merg/px/PAGE3.jpg)

Como ya se mencionó, el elevado polimorfismo que presentan estos marcadores y la posibilidad de identificar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales (Fig. 4).

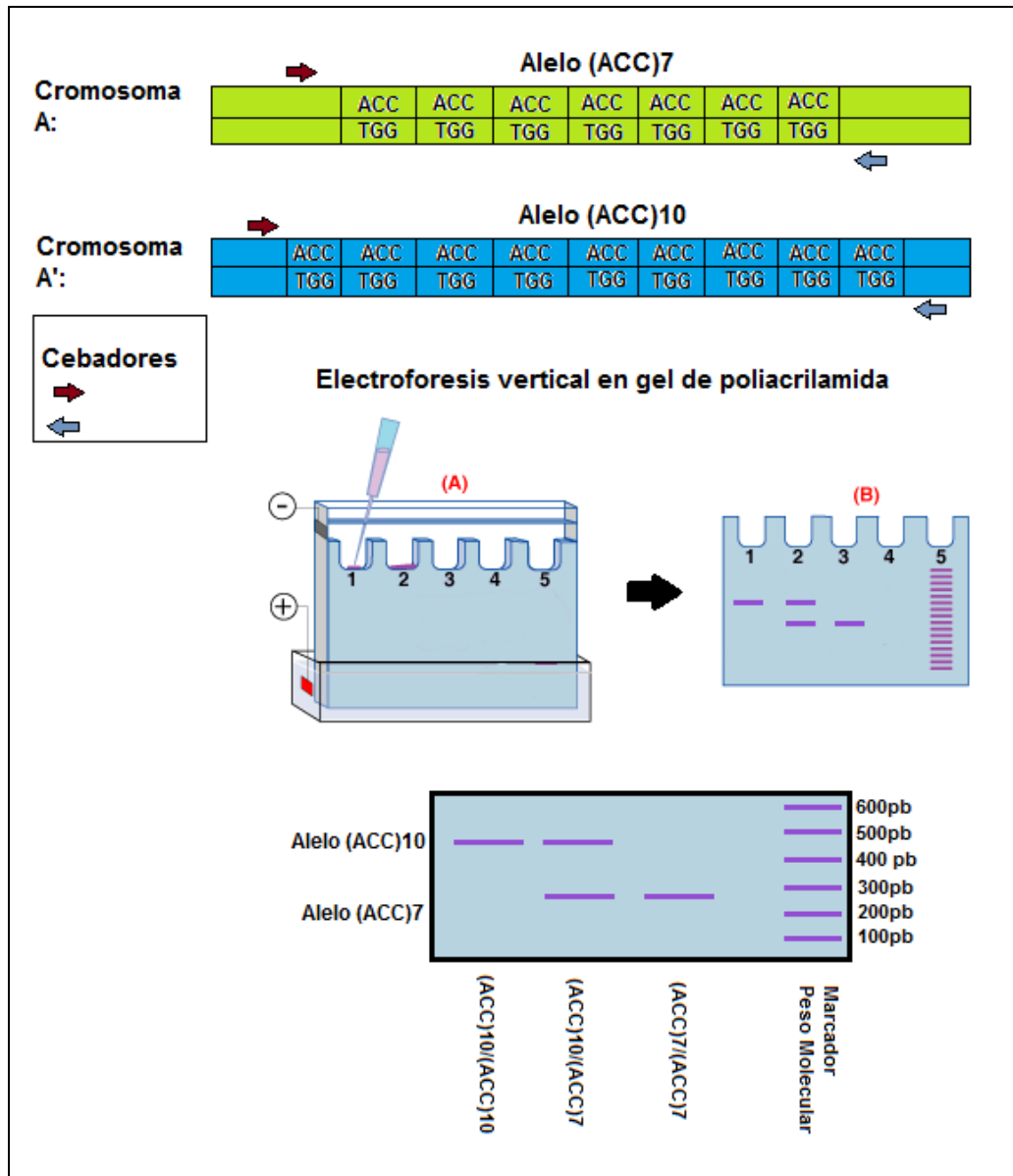


Figura 4. Diagrama que muestra el polimorfismo de longitud de los microsatélites. En un individuo diploide, el cromosoma A contiene el alelo (ACC)<sub>7</sub>, mientras que el cromosoma A' en el locus homólogo presenta el alelo (ACC)<sub>10</sub>. Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando cebadores diseñados en las regiones flanqueantes, los alelos son amplificados, para luego ser separados mediante una corrida electroforética. El diagrama muestra el patrón de bandas que determinan tanto los homocigotos como el heterocigoto para los mencionados alelos.

### **II.3.4 Alelos Nulos, homoplasia y microsatélites**

Algunos factores pueden disminuir el poder y la sensibilidad de los microsatélites como marcadores de elección, o pueden ser fuente de error que disminuya su utilidad en los estudios genéticos. Los dos factores principales son los alelos nulos y la homoplasia.

#### **II.3.4.1 Alelos nulos**

Se habla de alelos nulos cuando un alelo no puede ser amplificado, debido, principalmente, a una mutación en el punto de hibridación del cebador (Callen y col. 1993). Ese alelo no amplifica y el individuo es catalogado como homocigoto.

La existencia de alelos nulos es especialmente difícil de detectar cuando su frecuencia es baja. Otro método para sospechar la presencia de alelos nulos es el cálculo de la deficiencia de heterocigotos para el equilibrio Hardy-Weinberg.

Para solucionar este problema se pueden diseñar cebadores alternativos fuera de la mutación y volver a analizar a los individuos clasificados como homocigotos

#### **II.3.4.2 Homoplasia**

Homoplasia es el hecho de que dos alelos tengan el mismo tamaño pero no debido a que sean idénticos, sino a que lo tomamos como idénticos por tener el mismo tamaño, pero existen diferencias en su estructura, inserciones de una parte y deleciones de otra, cambios de bases o variaciones en la región flanqueante (Primmer y Ellegren 1998).

Éste es un tipo de polimorfismo que se puede detectar únicamente por secuenciación, y nos puede pasar inadvertido cuando analizamos mediante amplificación por PCR y electroforesis para asignar tamaños. Puede ser una fuente de error en estudios poblacionales o de evolución, porque la tasa de mutación de los microsatélites está relacionada de forma compleja con el tamaño y composición del alelo, y, por ejemplo, los

alelos interrumpidos o compuestos conllevan con más frecuencia a casos de homoplasia (Tautz y Schlötterer 1994).

### **II.3.5 Estrategia de amplificación cruzada**

La única limitación significativa de los microsatélites puede ser la inversión inicial de recursos económicos y la experiencia técnica requerida para el clonamiento y secuenciamiento de los loci STR.

En el caso de especies que no cuentan con marcadores especie-específica, como la anchoveta peruana, se puede recurrir a la estrategia de amplificación cruzada usando cebadores heterólogos (por PCR) (Fig. 5). Para el estudio de la estructura y la diversidad genética de poblaciones, existe un éxito significativo en el uso de estos cebadores heterólogos para la PCR en la amplificación de loci microsatélites, eliminando de esta manera la estricta necesidad de desarrollar nuevos conjuntos de cebadores.

La idea se basa en la conservación de secuencias genéticas entre especies con un mismo origen evolutivo por lo que es posible explorar su utilidad entre especies emparentadas. Sin embargo, esta estrategia no es del todo exitosa, existe la probabilidad que los cebadores utilizados no amplifiquen en la especie estudiada, o que no presente el grado de polimorfismo reportado en la especie para la cual fueron diseñados.



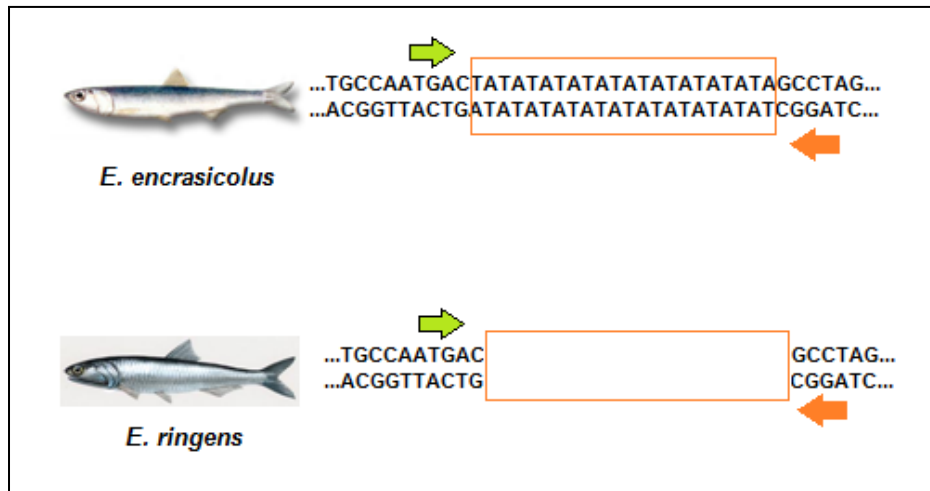


Figura 5. Estrategia de amplificación cruzada. Los cebadores reportados en la anchoveta europea (*E. encrasicolus*) para la amplificación de un marcador microsatélite pueden ser utilizados en la anchoveta peruana (*E. ringens*).

#### II.4. Marcadores intrónicos

Los intrones son generalmente polimórficos y algunas veces hipervariables; son codominantes, selectivamente neutros; son fácilmente amplificados por PCR, su polimorfismo puede ser revelado fácilmente en geles de agarosa o acrilamida; y pueden ser obtenidas grandes cantidades a un bajo costo (Palumbi, S. y Baker C., 1994; Bierne y col., 2000; Chow S., 1998; Chow S. y Hazama K., 1998; He M. y Haymer D.S., 1997).

Estas características del intrón son útiles porque potencialmente provee un número de polimorfismos con sólo un par de cebadores. Esta propiedad de universalidad de los cebadores también cuenta con algunas desventajas: El riesgo de contaminación humana. No es siempre posible evitar la contaminación pero esta es fácilmente detectable debido de los perfiles altamente específicos obtenidos para cada especie y para cada sistema EPIC.

Varios métodos pueden detectar los polimorfismos de intrón, incluyendo el secuenciamiento el análisis por polimorfismo conformacional de cadena monocatenaria (SSCP) (Sunnucks y col., 2000), los cuales son útiles para fragmentos pequeños de ADN (alrededor de 300pb). Mientras que analizar el polimorfismo de longitud del intrón es una manera más rápida, reproducible, de bajo costo y se puede realizar en geles de poliacrilamida.

#### **II.4.1 Técnica Exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR**

Han sido desarrolladas varias formas de evaluar el genoma nuclear a nivel del ADN, y por la incorporación de la PCR, su utilidad está llegando a ser convencional. Una de ellas de reciente aplicabilidad, introducido por Lessa (1992), utiliza como blanco a las secuencias intrónicas flanqueada por exones. Los intrones son secuencias muy variables no codificadores que pueden alcanzar tamaños desde 80 a 1000 nucleótidos o más. A diferencia de los exones, su secuencia nucleotídica parecer ser muy poca conservativa y a veces puede alterarse significativamente sin afectar considerablemente la función del gen (Hassan y col. 2002). De esta manera, las mutaciones que pueden ocurrir, se acumulan rápidamente y a veces exhiben una alta variabilidad genética (mucho más que los exones), incluyendo polimorfismos a nivel de su longitud (Palumbi, 1996; Chow y Takeyama 1998). Por este motivo, la posición de los cebadores que intervienen en la replicación de aquellos fragmentos están diseñados para operar desde secuencias conservadas sobre los exones, a este enfoque se le denomina EPIC-PCR.

De esta manera, se utiliza la variación generada por mutaciones grandes (inserción o delección), como la medida de polimorfismo en la longitud de los fragmentos intrónicos, y no así aquella producida por el efecto de las mutaciones puntuales que pueden ocurrir en ellos.

Las desventajas de la técnica radican en la amplificación simultánea de varios loci, que pueden revelar la presencia de pseudogenes. Esta multiplificación interfiere en la calidad del PCR y dificulta la lectura de los genotipos (Hassan y *col.*, 2002).

#### **II.4.2 Evaluación de polimorfismos y estudios poblacionales:**

Los marcadores basados en ILPs amplificados por EPIC-PCR tienen muchas ventajas en estudio de genética de poblaciones: (i) al usar cebadores de genes heterólogos, el clonamiento y la secuenciación del blanco puede ser evitado, (ii) la amplificación cruzada debería ser más fácil debido a que las secuencias a partir de las cuales se diseñan los cebadores son exones, y estos tienden a ser más conservados entre especies, (iii) los artefactos de PCR como los alelos nulos son menos frecuentes.

Todas las características mencionadas hacen que este tipo de marcadores sean provechosos como marcadores de variación, en poblaciones y sub-poblaciones dentro y entre especies (Lessa 1992, Chow y Takeyama 1998). Varios trabajos han demostrado que la técnica EPIC-PCR, permite utilizar el polimorfismo de los intrones como un marcador genético en el estudio de las poblaciones de varios vertebrados (Palumbi & Baker, 1994; Chow & Takeyama, 1998; Chow y Hazama, 1998; Hasan *et al.*, 2002) e invertebrados (Ohresser *et al.*, 1997; Bierne *et al.*, 2000).

#### **II.5. Análisis estadísticos de los resultados**

Los parámetros estadísticos más empleados para cuantificar la variabilidad genética son: porcentaje de loci polimórficos, el número medio de alelos por locus, la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ).

## **II.6. Cálculo de frecuencias alélicas**

Una población en sentido genético es no sólo un grupo de individuos, sino un grupo reproductivo de forma que la constitución genética de los individuos se transmite de una generación a la siguiente (Falconer y Mackay 1996). Durante dicha transmisión los genotipos de los padres se disocian y un nuevo grupo de genotipos se constituye en la progenie. Los genes transmitidos en la población de esta forma tiene continuidad de generación en generación.

Se puede definir la frecuencia alélica o génica como el cociente resultante de dividir el número de alelos iguales en una población por el número total de alelos. El cálculo de las frecuencias alélicas se hace por recuento directo de los alelos presentes, asumiendo que la observación un solo alelo se corresponde con la condición de homocigosis, por lo tanto que no hay nulos.

## **II.7. Equilibrio Hardy-Weinberg**

Para describir la constitución genética de una población tendríamos que determinar sus genotipos y decir cuántos individuos existen de cada uno de ellos, pero la genética de una población no solo se refiere a la constitución genética de los individuos, sino también a la transmisión de los alelos de una generación a la siguiente. En dicha transmisión los genotipos de los padres se disocian y un nuevo grupo de genotipos se constituye en los hijos con los alelos transmitidos por los gametos, de esta forma los alelos tienen continuidad de generación en generación, pero no los genotipos portadores. La constitución genética de una población referida a los alelos se describe por el conjunto de frecuencias alélicas es decir por la especificación de los alelos presentes en cada *locus* y el número o proporción de los diferentes alelos en cada *locus* (Falconer y Mackay 1996).

El equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) se basa en la ausencia de cualquier fuerza evolutiva que cambie la frecuencia alélica y genotípica en una población, mientras se mantenga un apareamiento aleatorio entre los individuos que la conforman (Hartl y Clark, 1989).

Las desviaciones del EHW pueden producirse debido a varios factores:

- a. Los apareamientos no se producen al azar
- b. Existen subdivisiones dentro de la población (Principio de Wahlund)
- c. Coancestros, antepasados comunes
- d. Selección natural (ventaja de los heterocigotos)
- e. Migración o flujo de genes desde una población externa
- f. Diferencias sexo-específicas en las frecuencias alélicas
- g. Técnica de muestreo incorrecta
- e. Presencia de alelos nulos no detectables experimentalmente

En un estudio sobre variación genética debe determinarse si hay desviaciones significativas del EHW en los *loci* estudiados. Si la proporción de genotipos para un solo *locus* no está en EHW, se puede atribuir a que ha habido selección que ha afectado dicho *locus* o a la existencia de alelos nulos, pero si son varios *loci* independientes los que se desvían significativamente del EHW, este fenómeno puede deberse a que dentro de la población existen subdivisiones, a que existe migración o flujo de genes desde una fuente externa o se están produciendo apareamientos dirigidos (no aleatorios) (Bjorklund 2005).

La diferencia entre la heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada calculada a partir de las frecuencias alélicas bajo la asunción de equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) puede usarse como un método muy básico para detectar desequilibrios en la estructura de una población. No obstante, un método mucho más exacto es comparar la distribución

de genotipos observados con la distribución esperada si la población estuviera en HWE. Cualquier desviación significativa indicará que la población está subdividida, que existe una consanguinidad significativa o que existe un flujo de genes de otra población. Estas circunstancias pueden ser estudiadas usando tests exactos o procedimientos de proporción de verosimilitud. Estos análisis son necesarios debido al gran número de alelos de los microsatélites y al elevado número de posibles genotipos.

### **II.8. Pruebas para calcular la desviación del Equilibrio Hardy Weinberg**

Una forma clásica de comprobar la existencia de desviaciones del equilibrio HW consiste en la comparación de los genotipos observados con los esperados dentro de una muestra. Este sistema es adecuado para polimorfismos que se caracterizan por tener pocos alelos, como es el caso de las proteínas. Pero en el caso de los microsatélites, que poseen gran número de alelos, el número de genotipos es tan elevado que algunas frecuencias genotípicas son cero, sobre todo cuando las frecuencias alélicas son muy bajas. Este fenómeno es una de las limitaciones de la prueba  $\chi^2$  (chi-cuadrado) para probar el equilibrio y aunque la base para medir el equilibrio sigue siendo la prueba de  $\chi^2$ , se han desarrollado algunos algoritmos que tratan de ser más precisos cuando se utilizan genotipos multilocus muy grandes (Wellek 2004). En estas circunstancias se utilizan tests exactos o procedimientos de proporción de verosimilitud mediante aplicaciones informáticas que realizan la importante cantidad de cálculos que las probabilidades exactas requieren.

### **II.9. Heterocigosis**

Se acepta generalmente que un locus es polimórfico cuando el alelo más común tiene una frecuencia inferior a 0.95. Una medida de la variación genética es la proporción de loci polimórficos, o simplemente polimorfismo, en una población. No obstante, dado que no

siempre se utiliza el mismo criterio de polimorfismo, una mejor valoración de la variación genética es la heterocigosidad de la población medida como la frecuencia media de individuos heterocigotos por locus. Los términos heterocigosidad y diversidad genética suelen usarse indiscriminadamente en la bibliografía. Generalmente se usa el término heterocigosidad para referirse a la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), y el de diversidad genética para referirse a la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ).

### II.9.1. Heterocigosidad Observada ( $H_o$ )

Es la proporción de individuos heterocigotos observada en una muestra de la población. Si se calcula directamente a partir de los genotipos encontrados en la población para todos los loci, se trata de la heterocigosidad media observada. La  $H_o$  se calcula por recuento directo.

### II.9.2. Heterocigosidad Esperada o Diversidad Genética ( $H_e$ )

La  $H_e$  desde el punto de vista matemático, es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes (Crow y Kimura 1970). En una población en equilibrio HW, la frecuencia de heterocigotos viene dada por la ecuación  $2pq$ . Se calcula como (Nei 1973):

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

$x_i$ : frecuencia de alelo  $i$  y  $k$ : número de alelos

Este estadístico es equivalente a la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) cuando las poblaciones están en EHW.

## **II.10. Índices de Fijación o Estadísticos F**

La teoría de los índices de fijación o estadísticos F fue concebida inicialmente por Sewall Wright y posteriormente desarrollada por otros autores (Chakraborty y Danker-Hopfe 1991). Wright propone medir las desviaciones de frecuencias genotípicas en poblaciones subdivididas por medio de tres parámetros:  $F_{is}$ ,  $F_{it}$  y  $F_{st}$ .

El índice de fijación  $F_{is}$  (Wright, 1951) corresponde a la correlación existente en la unión de dos gametos al azar en relación a la subpoblación, cuyos valores explican las variaciones de la heterocigosidad debido a apareamientos no aleatorios en la subpoblación y a posibles efectos selectivos. El valor de  $F_{is}$  mide el déficit total de heterocigotos presentes al interior de una población. El coeficiente de correlación de este índice varía entre -1 (población compuesta por heterocigotos) y 1 (población compuesta de homocigotos).

El cálculo del estadístico  $F_{st}$  permite determinar las diferencias genética entre localidades, en donde los valores de  $F_{st}=0$  indican que no hay diferenciación genética entre ambas localidades, mientras que valores significativamente diferentes a cero son un indicativo de estructura genética.

## **II.11. Avances en el estudio de la estructura poblacional de anchoveta**

Según Imarpe, Pauly, D y I. Tsukayama (1987), determinaron que en litoral peruano existen dos áreas de pesca desde el punto de vista pesquero en relación a la concentración del recurso y con los afloramientos, una en la zona “Norte-Centro” y otra en una zona “Sur”, esta última con menor. De la misma manera, los resultados publicados por Mendo (1991) utilizando isoenzimas apoyan la hipótesis tradicional de la existencia de dos stocks genéticos distintos a lo largo de la costa peruana.



El único aporte de información obtenido hasta la fecha en cuanto al análisis basado en ADN sobre el recurso anchoveta se ha desarrollado en Chile, por Ferrada y col. 2002, , en el cual se realizó un estudio poblacional de este recurso hidrobiológico mediante el análisis de variabilidad de 2 genes nucleares, el intrón 4/5 del gen de Calmodulina (CaM) por amplificación por PCR y la región ITS (Internal Transcribed Spacers) del ADNr, por PCR y digestión en 139 ejemplares de *E. ringens* provenientes de las costas de Iquique (20°13'S; 70°09'W) y Talcahuano (36°41'S; 73°06'W). Los resultados de esta investigación confirman la existencia de un solo stock, desde el punto de vista genético en el mar chileno.

Por lo descrito anteriormente, existe una clara necesidad de realizar este tipo de estudio en el recurso anchoveta (*E. ringens*) en nuestro país para poder contar con marcadores genéticos que generen información que nos ayude a realizar una gestión adecuada de este engraulido.

### III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

---

#### III.1 Hipótesis

##### III.1.1 Hipótesis nula.

- Los marcadores ILPs y STRs obtenidos por amplificación cruzada son informativos para el estudio de la diversidad genética de *E. ringens*.

##### III.1.2 Hipótesis alternativa

- Los marcadores ILPs y STRs obtenidos por amplificación cruzada no son informativos para el estudio de la diversidad genética de *E. ringens*.

#### III.2 Objetivos

##### III.2.1 Objetivo General

- Evaluar la utilidad de los marcadores ILPs y STRs para estudios de diversidad genética y estructura poblacional del recurso anchoveta (*E. ringens*) en el litoral peruano.

##### III.2.2 Objetivos Específicos

- Extraer ADN de buena calidad, mediante el método TNES-urea usando diferente tipos de tejido, para las reacciones de amplificación por PCR de los ILPs y STRs.
- Estandarizar la amplificación de amplificación por PCR de los marcadores ILPs y STRs en la anchoveta (*E. ringens*), utilizando cebadores reportados previamente en la literatura.
- Caracterizar molecular de los loci ILPs y STRs en la anchoveta (*E. ringens*).

- Determinar los estimadores de nivel de variabilidad genética.

#### IV. MATERIALES Y METODOS

---

##### IV. 1. Material biológico

La colecta de individuos y la obtención del material biológico se realizó a bordo de cruceros de investigación del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), con la excepción de la cala “c” que se colectó en el Terminal Pesquero del Callao. Se colectó muestras de tejido hepático, gonadal, branquial y muscular con escamas de la especie en estudio de forma aleatoria en cada cala de pesca, las cuales fueron conservadas en alcohol 96% para la extracción de ADN. Se tomaron datos morfológicos de igual manera.

Tabla 2. Localidades, año y número de muestras de *E. ringens* analizadas en la presente tesis.

Cala	N° Individuos	Lugar de Colecta	Fecha de		Stock
			Colecta	Estación	
3P	43	08°31.30 S 79°30.41 S Salaverry	Diciembre 2009	Verano	Norte
82	20	12°37.1 S 76°43 O Callao	Marzo 2007	Verano	Centro
C	39	30 millas paralelas al Callao	Marzo 2009	Verano	
I	29	10°48.6 / 77°57.9 Barranca-Supe	Agosto 2008	Invierno	
8C	34	11°23.70 S 77°32.44 O Huacho	Diciembre 2009	Verano	
103	20	15°11.4 S 75°25 O Pisco	Marzo 2007	Verano	Sur
124	20	17°15.2 S 72°02 O Ilo	Marzo 2007	Verano	

El muestreo de individuos fue llevado al azar de entre los cientos de individuos atrapados en la red. Por las dificultades técnicas y económicas de procesar un gran número de muestras, se usó un número de 20-40 individuos por zona de colecta, los puntos de colecta se pueden observar en la Figura N°6.

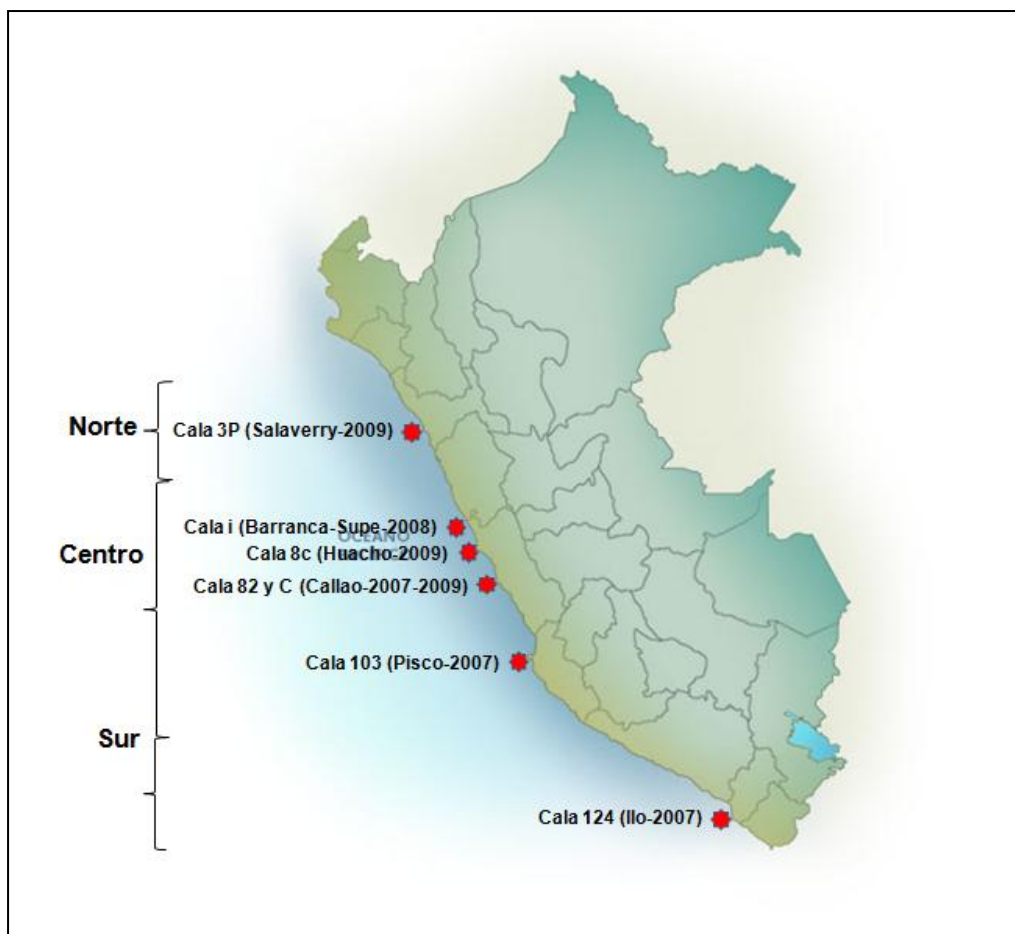


Figura 6. Localidades de muestreo de la anchoveta peruana analizadas en el presente estudio.

## **IV.2. METODOLOGÍA**

### **IV.2.1 Extracción de ácidos nucleicos y visualización:**

La extracción de ADN se realizó usando el protocolo de Buffer TNES-urea. Se extrajo 50mg de cada tejido, este fue previamente hidratado con 2 lavados de TE 20:1. En un tubo de 1.5mL se agregó el tejido (aprox. 50mg) más 600uL de buffer TNES-urea (10mM de Tris-HCl pH 8.0, 125mM de NaCl, 10mM de EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, 4M de urea) y 10uL de proteinasa K (20mg/ml) incubándolo a 55°C overnight. Pasado este tiempo de incubación se retiraron las muestras de la estufa y fueron centrifugadas a 12 000 rpm durante 10 minutos. En un tubo nuevo de 1.5mL se agregó 200uL del lisado centrifugado. Para la primera precipitación de los ácidos nucleicos se utilizó 80uL de acetato de amonio (10M), se agitó por inversión, seguidamente se agregó 1000uL de etanol absoluto frío agitando nuevamente por inversión. Las muestras luego fueron colocadas a -20°C por 1 hora, pasado este tiempo se retiraron y se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante fue descartado y el pellet se puso a secar a temperatura ambiente, cuando este secó fue resuspendido en 100uL de TE 10:1. Una segunda precipitación fue hecha con 5uL de NaCl (5M) y etanol absoluto frío siguiendo los posteriores de la primera precipitación. Para la resuspensión de los pellets se les agregó 200uL de TE 10:1, agitando suavemente los tubos para lograr la completa disolución de los pellets.

Unos 5uL de la solución fueron cargados en un gel 1.5% de agarosa y se corrió a 100V por espacio de una hora, observándose los ácidos nucleicos después de una tinción con bromuro de etidio por 20 minutos.

### **IV.2.2. Amplificación de los marcadores ILPs y STRs mediante PCR**

La amplificación de los marcadores se realizó siguiendo las condiciones reportadas. Se modificaron las concentraciones de cloruro de magnesio y la temperatura de hibridación. Estas pruebas fueron realizadas con 3-4 individuos. Estandarizada las condiciones de

amplificación, se procedió a amplificar los marcadores en el resto de la población para determinar la cantidad de alelos y heterocigosidad de los marcadores obtenidos. La reacción para la amplificación del marcador ILP Mlc-3 se encontraba estandarizada en el CGBM de la USMP por la Bach. en Ingeniería Biotecnológica Solange Paredes.

Los marcadores moleculares utilizados en la presente tesis fueron seleccionados de la literatura científica; en la siguiente tabla se detallan las características:

Tabla 3. Características de los marcadores empleados en el presente trabajo.

Tipo de Marcador	Gen	Intrón	Abreviación	Cebador	Secuencia del Cebador (5'-3')	Referencia
ILPs	Creatina kinasa	Intron 7	Ck-7	CK6F CK7R	AAGAGGGTCTTTGACAGGTTCTGC TTCTCCTGGATCAGACGCTCCACC	Hassan et al. 2002. Seventeen new exon-primed intron-crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish.
	Hormona del Crecimiento	Intron 5	Gh-5	Gh5F Gh6R	AGGCCAATCAGGACGGAGC TGCCACTGTCAGATAAGTCTCC	
	Cadena ligera de la miosina	Intron 3	Mlc-3	Mlc-3-F Mlc-3-R	AGTAATGACGTCGCAGATGTTCT CGACAGGTTCACTCTCGAGGAG	Touriya et al. 2003. Primers for EPIC amplification of intron sequences for fish and other vertebrate population genetic studies.
Locus		Motivo	Cebador	Secuencia del Cebador (5'-3')	Referencia	
STRs	Ee2	(CA) <sub>4</sub> GA(CA) <sub>12</sub>	Ee2-F Ee2-R	TCGCTAGGACGCTTTACGAC CCGGAGGTTTCAGTGTTTCATT	Landi et al. 2005. Isolation of polymorphic microsatellite loci from the European anchovy, <i>E. encrasicolus</i> .	
	Ee10	[(GT) <sub>9</sub> CT] <sub>2</sub> [(GT) <sub>2</sub> CT] <sub>3</sub>	Ee10-F Ee10-R	GGTGGATGAAGTGGCAATCT CTGGGGTGGCATAACTGAAG		



Tabla 4. Detalles de resultados generales reportados en la literatura utilizando los marcadores empleados en el presente trabajo

Intron	Especie	Individuos	N° de loci	Ta (°C)	Polimorfismo	N° alelos	He	Fis	Tamaño (pb)
Ck-7	<i>Siganus rivulatus</i> (Siganidae)	30	0	54	-	-	-	-	-
	<i>Siganus luridus</i> (Siganidae)	30	0	54	-	-	-	-	-
	<i>Thunnus obesus</i> (Scombridae)	100	1	45	Si	3	-	-	350
	<i>Lates niloticus</i> (Centropomidae)	30	1	52	Si	-	-	-	-
	<i>Chaetodon citrinellus</i> (Chaetodontidae)	50	Multilocus	54	-	-	-	-	-
	<i>Chaetodon quadrimaculatus</i> (=)	50	Multilocus	54	-	-	-	-	-
	<i>Forcipiger flavissimus</i> (=)	50	Multilocus	54	-	-	-	-	-
Gh-5	<i>Siganus rivulatus</i>	137	1	52	No	-	-	-	350
	<i>Siganus luridus</i>	126	1	52	Si	4	0.34	n.s.	350
	<i>Thunnus obesus</i>	20	1	52	Si	2	-	-	-
	<i>Lates niloticus</i>	30	Multilocus	52	Si	-	-	-	-
	<i>Chaetodon citrinellus</i>	198	1	54	No	-	-	-	300
	<i>Chaetodon quadrimaculatus</i>	233	1	54	No	-	-	-	300
	<i>Forcipiger flavissimus</i>	234	1	54	-	-	-	-	-
	<i>Dascyllus aruanus</i>	250	1	54	-	-	-	-	-
	<i>Pomacentrus pavo</i>	167	1	54	Si	2	0.31	n.s.	300
	<i>Plectroglyphidodon dickii</i>	79	2	54	No	-	-	-	300
Mlc-3	<i>Sardina pilchardus</i>	3	1	54	Si	-	-	-	720
	<i>Sardinops melanosticus</i>	3	1		-	-	-	-	
	<i>Engraulis encrasicolus</i>	3	1		Si	-	-	-	460
	<i>Salmo marmorata</i>	2	1		No	-	-	-	100
<b>STR</b>	<b>Nombre de la especie</b>	<b>Ta(°C)/MgCl2 (mM)</b>	<b>Número de alelos</b>	<b>He/Ho</b>	<b>Tamaño (pb)</b>				
Ee2	<i>Engraulis encrasicolus</i> (anchoveta Europea)	56/1.5mM	25	0.88/0.58	210-284				
Ee10		54/1.5mM	25	0.88/0.89	176-272				

Para la amplificación se utilizó un termociclador BioRad DNA Engine ® Thermal Cycler con capacidad de 96 pocillos. Se utilizaron Kits de PCR de la marca Fermentas.

Para la amplificación de los STRs se utilizó la técnica de amplificación cruzada con *E. encrasicolus* (anchoveta europea), inicialmente con las condiciones reportadas por Landi y col. (2005) y modificándolas con la finalidad de aumentar la astringencia de la reacción.

Para la amplificación de los intrones se utilizó la estrategia de EPIC-PCR en la que se utiliza cebadores universales, se probaron diferentes temperaturas de annealing así como concentraciones de cloruro de magnesio.

Las condiciones probadas se encuentran en la siguiente tabla.

TABLA 5. Condiciones probadas para la amplificación de marcadores ILPs y STRs en anchoveta Peruana.

Reactivo	Conc. Madre	Ck-7/Gh-5		Ee10/Ee2	
		Volumen (uL)	Conc. Final	Volumen (uL)	Conc. Final
H2O	-	q.s.p	q.s.p	16.4	q.s.p
Buffer	10X	1	1X (KCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2.5	1X (KCl)
dNTPs	10mM	0.5	0.5mM	0.5	0.5mM
MgCl <sub>2</sub>	25mM	0.6,0.8, 1	1.5,2,2.5mM	1.5,2,2.5	1.5,2,2.5mM
CebadorF	10pmol/uL	0.3, 0.2	0.3, 0.2pmol	1.25	0.5pmol
CebadorR	10pmol/uL	0.3, 0.2	0.3, 0.2pmol	1.25	0.5pmol
Taq	5U/UI	0.1	0.05U	0.1	0.05U
ADN	30-50ng	1	3-5ng	1	3-5ng
Volumen Rx Final		10uL		25uL	
Programa de PCR		4°C 3 min 95°C 3 min 94°C 12 seg 50,55,60°C 12 seg 72°C 20 seg 72°C 5 min 4°C 2min		4°C 3 min 94°C 3min 94°C 30seg 54, 60°C 60seg 72°C 30seg 72°C 3 min 4°C 2min	
		} 35 ciclos		} 35ciclos	

q.s.p: cantidad por completar

### **IV.2.3 Visualización de los amplicones**

Para la visualización de los amplicones se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2% corridos a 100V por 45 minutos. Se cargó 8uL de la reacción con 1uL de buffer loading. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio por 15 minutos, visualizados, y registrados en fotografía.

Una vez estandarizada la reacción de amplificación para cada marcador, estos fueron amplificados en un número mayor de individuos y corridos en geles de acrilamida denaturantes 5-6% para proceder a realizar la lectura de alelos. Los marcadores ILPs fueron corridos a 800V por 12 horas en geles de acrilamida (20cmx40cmx1mm) denaturantes al 5%. Los STRs fueron corridos a 500V por 2-3horas en geles denaturantes al 6% de 20cmx20cmx1mm y 20cmx20cmx0.4mm. Los geles fueron teñidos usando nitrato de plata.

Se procedió a leer los alelos de cada marcador en las poblaciones analizadas de la anchoveta peruana.

### **IV.2.4 Estimación de los niveles de variabilidad genética**

#### **IV.2.4.1 Diversidad genética**

La variación poblacional de la especie se evaluó mediante los estimadores de diversidad genética expresados por el número de alelos por locus ( $N_a$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ), el índice de fijación ( $F_{is}$ ), riqueza alélica ( $AR$ ) por locus y población, Estos fueron calculados con los programas Fstat versión 2.9.3.2 (Jerome Goudet, 2002) y Arlequín versión 3.11 (Laurent Excoffier, 2005). Los gráficos de las frecuencias alélicas por población fueron realizadas en la hoja de datos EXCEL.

#### **IV.2.4.2. Índices de Fijación o Estadísticos F**

El valor de Fis fue calculado usando el programa Arlequin v. 3.11. De igual manera, se estimó la estructura genética a partir del índice de fijación Fst de manera pareada entre localidades usando el mismo programa.

#### **IV.2.4.3. Equilibrio Hardy-Weinberg**

Este fundamento de la genética poblacional fue analizado mediante una prueba exacta análoga a la prueba de Fisher en el programa ARLEQUIN v.3.11.

#### **IV.2.4.4. Variación genética interpoblacional de *E. ringens***

Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) mediante el programa ARLEQUIN v.3, en donde se agruparon las poblaciones pertenecientes al stock norte (cala "3p"), las del stock centro (cala "8c", "c", "i", "82" y "103") y la del sur (cala "124").

#### **IV.2.4.5. Incidencia de alelos nulos**

La probabilidad de existencia de alelos nulos se estimó mediante el programa CERVUS versión 3.0.3 (Tristan Marshall, 2006), este programa estima la frecuencias de posibles alelos nulos a partir de un algoritmo propuesto por Summers y Amos (1997) que tiene en cuenta las diferencias entre las frecuencias observadas y esperadas de los homocigotos.

## V. RESULTADOS

### V.1. Extracción de ácidos nucleicos (ADN)

El protocolo TNES-urea permitió obtener un ADN íntegro a partir de muestras de tejido muscular (Fig. 7 y 8), sin signos de degradación o fragmentación y con una baja extracción de contaminantes (Proteínas y ARN). En las muestras de tejido muscular se extrajo un promedio de 50ng de ADN por microlitro (ul). Los ADNs fueron almacenadas a 4°C luego de preparar las diluciones de trabajo de 1:3 con TE 10:1.

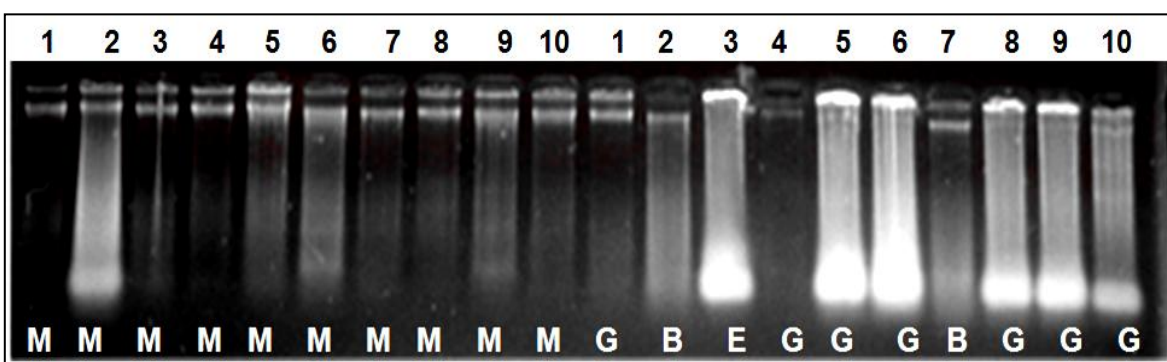


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de ADN extraído de diferentes tejidos de anchoveta Peruana usando el buffer TNES-Urea. 5uL de ADN. 100V por 1 hora. M: músculo, G: gónada, E: escama, B: branquias.

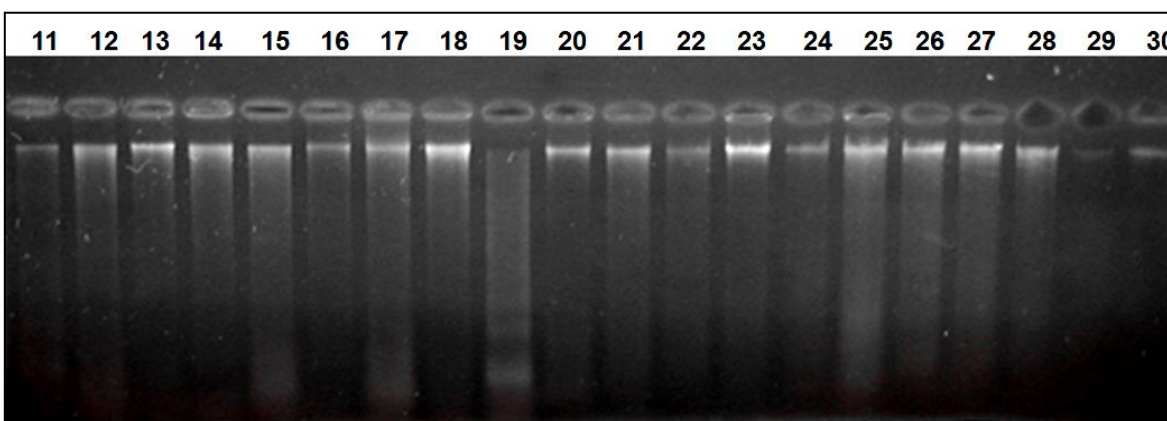


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de ADN extraído de tejido muscular de anchoveta Peruana usando el buffer TNES-Urea. 5uL de ADN. 100V por 1 hora.

## V.2. Estandarización de la técnica de PCR para la amplificación de los ILPs y STRs en anchoveta Peruana.

A fin de determinar la concentración óptima de reactivos para la obtención de una amplificación adecuada del producto, fue necesario realizar varias PCR. Se inició con las concentraciones de reactivos propuestos por los autores que reportaron los marcadores ILPs y STRs. Debido a que la amplificación no se logró, en algunos casos, bajo estas condiciones, fue necesario modificar las temperaturas y los tiempos en el termociclador, así como la realización de varias concentraciones de MgCl<sub>2</sub>. Las distintas condiciones ensayadas en cuanto a concentraciones de reactivos se aprecian en la Tabla N°5 y algunos resultados en las Figuras N°9, 10, 11, 12 y 13.

Las variaciones con respecto al protocolo de amplificación fueron dirigidas a cambios en la temperatura de hibridación de los cebadores con el fin de obtener el acoplamiento adecuado a la secuencia diana, así como la óptima polimerización del ADN.

De los 2 ILPs amplificados, sólo el Gh-5 no amplificó bajo las condiciones probadas. Se estableció el perfil de amplificación teniendo en cuenta la nitidez de la banda y la ausencia de productos inespecíficos.

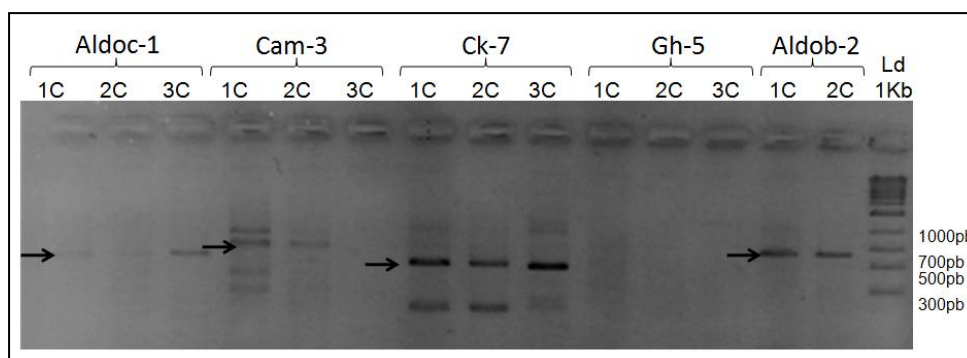


Figura 9. Amplicones a 55°C annealing de ILPs, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, Buffer KCl. Gel agarosa 1.5% 100V por 45 minutos. Ladder DNA marker 1Kb. Los demás marcadores no corresponden a esta investigación. Las flechas indican el amplicón esperado.

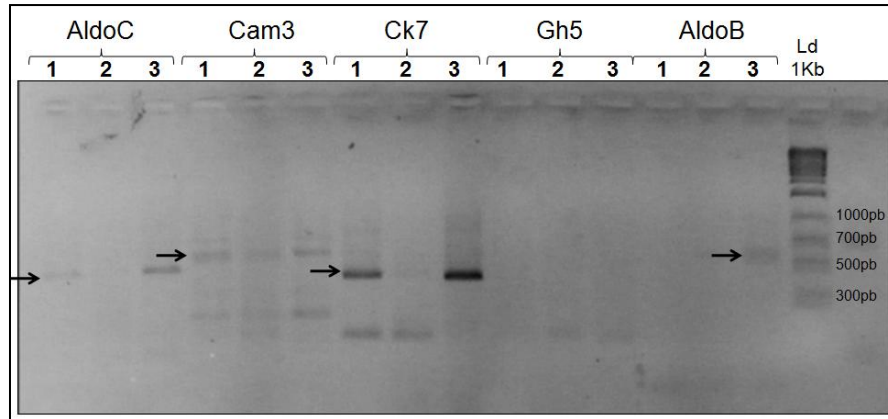


Figura 10. Amplicones a 55°C annealing de ILPs, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, Buffer (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Gel agarosa 1.5% 100V por 1 hora. Ladder DNA marker 1Kb. Los demás marcadores no corresponden a esta investigación. Las flechas indican el amplicón esperado.

Las condiciones finales escogidas para la amplificación del marcador ILP Ck-7 se encuentran en la Tabla N°6, al igual que la condición usada para la amplificación del marcador ILP Mlc-3 que ya se encontraba estandarizada en el CGBM de la USMP. Los productos obtenidos luego de la modificación de las condiciones de amplificación pueden ser observados en la Figura N°11. Los productos observados para el marcador Ck-7 y Mlc-3 se encuentran alrededor de los 500pb.

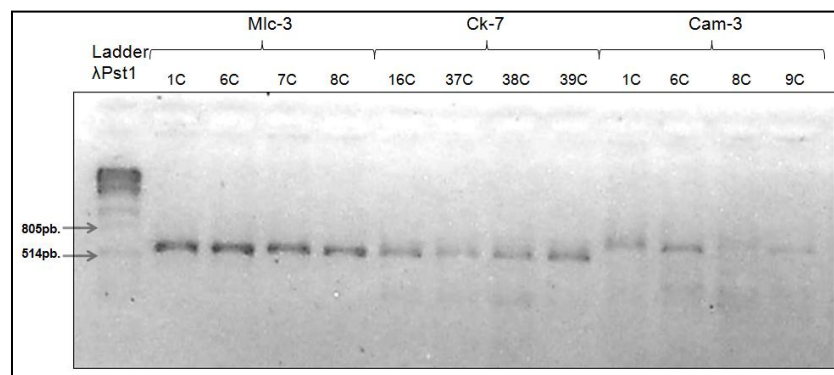


Figura 11. Amplicones de marcadores ILPs. Reacción estandarizada. Gel agarosa 1.5% 100V por 45 min. Ladder λPst1. El marcador Cam-3 no corresponde a esta investigación.

En el caso de los marcadores STRs Ee10 y Ee2, este último no amplificó bajo ninguna de las condiciones probadas en este trabajo. El marcador Ee10 amplificó bajo todas las condiciones ensayadas.

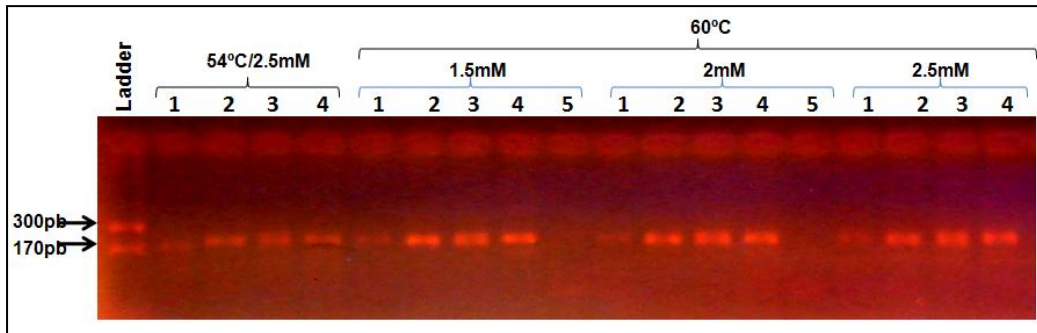


Figura 12. STR Ee10. Amplicones a 54 y 60°C annealing de ILPs, diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>. Gel agarosa 2% 100V por 45 minutos. El carril 5 de cada prueba constituye el control negativo.

Los amplicones fueron corridos en un gel de acrilamida 6% denaturante para detectar la presencia de bandas inespecíficas, en la Figura N°13 se puede observar que no existe diferencias en cuanto a la calidad del producto entre las condiciones probadas, razón por la cual se optó por elegir una condición intermedia de concentración de cloruro de magnesio (2mM) y la temperatura de annealing más alta (60°C) para asegurar una alta astringencia de la reacción.

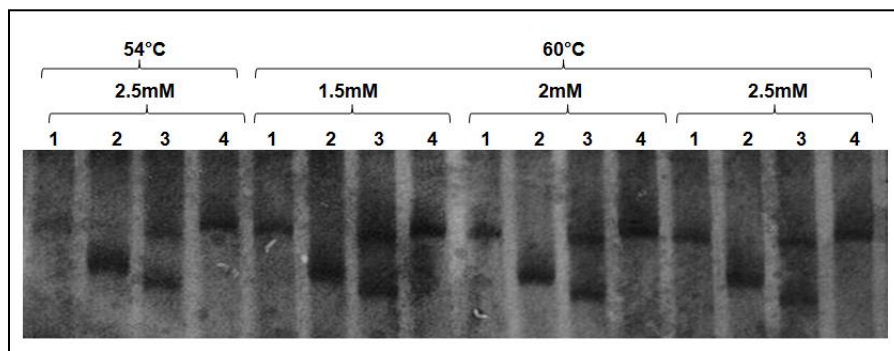


Figura 13. STR Ee10. Amplicones a 54 y 60°C annealing de ILPs, diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>. Gel de Acrilamida 5% denaturante, 500V por 2 horas.



Tabla 6. Condiciones finales para la amplificación de marcadores ILPs y STRs en anchoveta peruana

Reactivo	Conc. Madre	Mlc-3		Ck-7		Ee10	
		Volumen (uL)	Conc. Final	Volumen (uL)	Conc. Final	Volumen (uL)	Conc. Final
H2O	-	6	q.s.p	17.425	q.s.p	16.4	q.s.p
Buffer	10X	1	1X (KCl)	2.5	1X (KCl)	2.5	1X (KCl)
dNTPs	10mM	0.5	0.5mM	1.875	0.75mM	0.5	0.2mM
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1	2.5mM	1.5	1.5mM	2	2mM
CebadorF	10pmol/uL	0.2	0.2pmol	0.3	0.3pmol	1.25	0.5pmol
CebadorR	10pmol/uL	0.2	0.2pmol	0.3	0.3pmol	1.25	0.5pmol
Taq	5U/UI	0.1	0.05U	0.1	0.02U	0.1	0.05U
ADN	30-50ng	1	3-5ng	1	3-5ng	1	3-5ng
Volumen Rx Final		10uL		25uL		25uL	
PROGRAMA DE PCR		95°C 3 min 94°C 12 seg } 58°C 12 seg } 35 ciclos 72°C 20 seg } 72°C 5 min		94°C 3min 94°C 12seg } 50°C 12seg } 35ciclos 72°C 20seg } 72°C 5 min		94°C 3min 94°C 30seg } 60°C 60seg } 35ciclos 72°C 30seg } 72°C 3min	
Longitud de producto		~500pb		~500pb		~200-300pb	

### V.3. Amplificación, genotipaje y estimación de los niveles de variabilidad genética de la población de anchoveta peruana utilizando marcadores ILPs y STRs

#### V.3.1 ILPs

##### V.3.1.1 Intrón 3 de la cadena ligera de la miosina (Mlc-3)

Un total de 60 individuos (correspondientes a la cala “82”, “103” y “124”) fueron genotipados en el año 2008 por la Bach. en Ingeniería Biotecnológica Solange Paredes M. en el CGBM-USMP. Para la presente investigación se amplificaron y genotiparon 64 individuos más (correspondientes a las calas “c” e “i”) (Fig. 14).

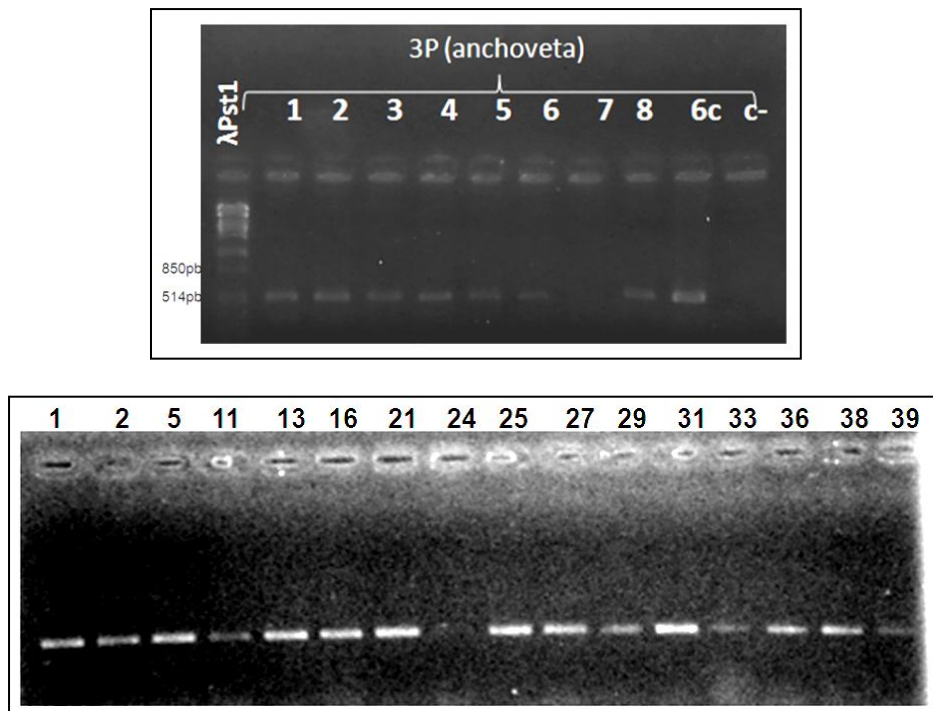


Figura 14. Amplicones de marcador ILP Mlc-3 en anchoveta Peruana. Gel Agarosa 1.5% 100V/1 hora

Los amplicones fueron corridos en gels de acrilamida 5% denaturante. Se realizaron varias corridas en gels largos (20 x 40cm) debido al tamaño del producto, esto para separar al máximo los alelos y la lectura de estos sea lo más exacta posible. En las

Figuras N°15, 16 y 17 se pueden observar algunos geles utilizados para la asignación de los alelos.

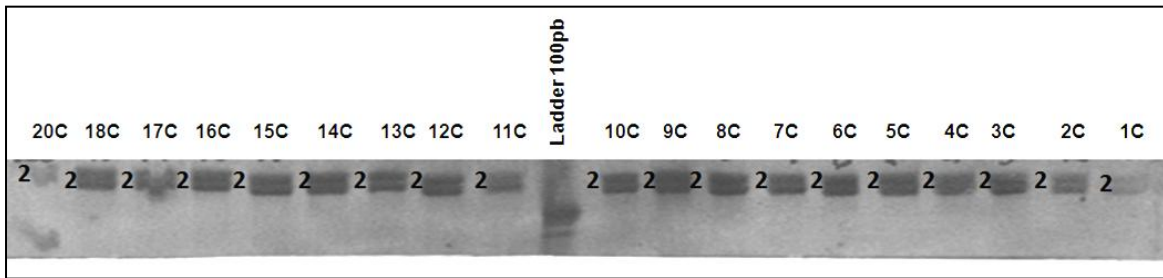


Figura 15. Electroforesis vertical en gel de acrilamida 5% denaturante de amplicones Mlc-3 en anchoveta Peruana, 800V /12 horas.

En la Fig. 15 podemos observar que de los 19 individuos amplificados y corridos en geles de acrilamida, 18 de estos son homocigotos (del 1c al 18c).

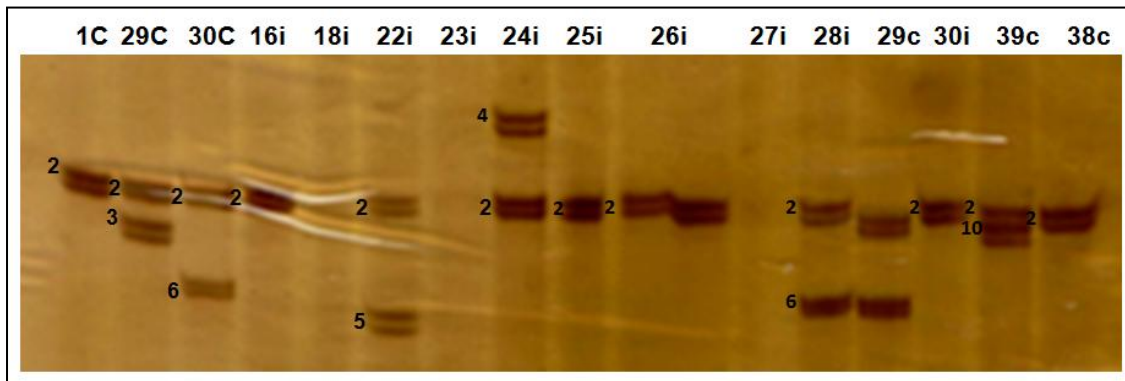


Figura 16. Electroforesis vertical en gel de acrilamida 5% denaturante de amplicones Mlc-3 en anchoveta Peruana, 800V /12 horas.

En la Fig. 16 podemos observar otros alelos encontrados para el ILP Mlc-3.

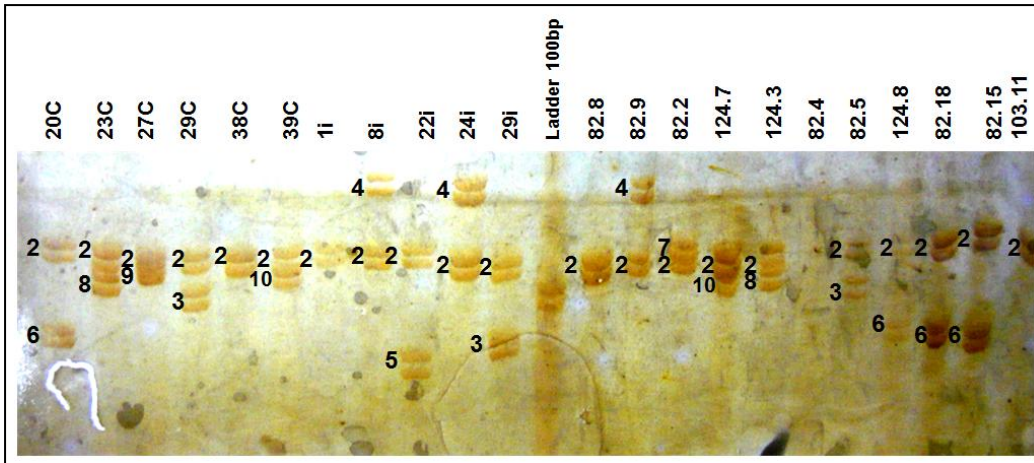


Figura 17. Alelos encontrados en la población analizada (n=128) del marcador Mlc-3 en anchoveta Peruana.

En la Fig. 17 podemos observar todos los alelos encontrados para el marcador Mlc-3, con excepción del alelo 1 que constituye un producto de 300pb (no salió en la fotografía).

Tabla 7. Genotipos encontrados por cala en la anchoveta Peruana usando el marcador Mlc-3

<b>Cala "C" Callao (2009)</b>							
<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>
1	22	11	22	21	22	31	22
2	22	12	22	22	22	32	22
3	22	13	22	23	28	33	22
4	22	14	22	24	22	34	22
5	22	15	22	25	22	35	26
6	22	16	22	26	22	36	22
7	22	17	22	27	29	37	22
8	22	18	22	28	22	38	22
9	22	19	--	29	23	39	210
10	22	20	26	30	26		

<b>Cala "i" Barranca-Supe (2008)</b>							
<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>
1	22	8	24	15	--	22	25
2	22	9	22	16	22	23	24
3	26	10	22	17	22	24	24
4	22	11	22	18	--	25	22
5	22	12	22	19	22	26	22
6	22	13	22	20	22	27	--
7	22	14	22	21	22	28	26
						29	23
						30	22

<b>Cala 82 Callao (2007)</b>				<b>Cala 103 Pisco (2007)</b>			
<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>
1	22	11	22	1	22	11	21
2	27	12	22	2	22	12	22
3	22	13	22	3	22	13	22
4	28	14	22	4	22	14	22
5	23	15	25	5	22	15	22
6	22	16	22	6	22	16	22
7	22	17	22	7	22	17	22
8	22	18	26	8	22	18	22
9	24	19	22	9	22	19	22
10	22	20	22	10	22	20	22

<b>Cala 124 Ilo (2007)</b>							
<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>
1	22	6	22	11	26	16	22
2	22	7	210	12	22	17	26
3	28	8	26	13	22	18	22
4	22	9	22	14	24	19	NA
5	22	10	22	15	25	20	26

NA: no amplificó.

Los genotipos y alelos encontrados en toda la población (124 individuos) y en las cinco calas se resumen en las siguientes tablas. Estos datos fueron ordenados para crear el input file usado en los programa Fstat y Arlequín.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en anchoveta peruana

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0202	95	0.77
genotipo 2	0206	10	0.08
genotipo 3	0208	3	0.02
genotipo 4	0209	1	0.01
genotipo 5	0203	3	0.02
genotipo 6	0210	2	0.02
genotipo 7	0204	5	0.04
genotipo 8	0205	3	0.02
genotipo 9	0207	1	0.01
genotipo 10	0201	1	0.01
		124	1.00

Alelo	Frecuencia
1	0.004
2	0.883
3	0.012
4	0.020
5	0.012
6	0.040
7	0.004
8	0.012
9	0.004
10	0.008
TOTAL	1

El genotipo más frecuente para el marcador Mlc-3 en la población, sin considerar calas, es el genotipo 1 (homocigoto para el alelo 2), de los 124 individuos analizados el 77% cuenta con este genotipo. Los heterocigotos están constituidos por un alelo 2 y otro. Lo que indica que este alelo está presente de una manera predominante en la población.

Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc -3 en la cala "c"  
(anchoveta Peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0202	31	0.82
genotipo 2	0206	3	0.08
genotipo 3	0208	1	0.03
genotipo 4	0209	1	0.03
genotipo 5	0203	1	0.03
genotipo 6	0210	1	0.03
	TOTAL	38	1

Alelo	Frecuencia
2	0.908
3	0.013
6	0.039
8	0.013
9	0.013
10	0.013
TOTAL	1

Tabla 10. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en la cala “1”

(anchoveta Peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0202	14	0.70
genotipo 2	0206	1	0.05
genotipo 3	0208	1	0.05
genotipo 5	0203	1	0.05
genotipo 7	0204	1	0.05
genotipo 8	0205	1	0.05
genotipo 9	0207	1	0.05
	TOTAL	20	1

Alelo	Frecuencia
2	0.870
3	0.019
4	0.056
5	0.019
6	0.037
TOTAL	1

Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en la cala “82”

(anchoveta Peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0202	20	0.74
genotipo 2	0206	2	0.07
genotipo 5	0203	1	0.04
genotipo 7	0204	3	0.11
genotipo 8	0205	1	0.04
	TOTAL	27	1

Alelo	Frecuencia
2	0.850
3	0.025
4	0.025
5	0.025
6	0.025
7	0.025
8	0.025
TOTAL	1

Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en la cala “103”

(anchoveta Peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0202	19	0.95
genotipo 10	0201	1	0.05
	TOTAL	20	1

Alelo	Frecuencia
1	0.025
2	0.975
TOTAL	1

Tabla 13. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en la cala "124"  
(anchoveta Peruana)

<b>Genotipo</b>	<b>Alelos</b>	<b>Individuos</b>	<b>Frecuencia Genotípica</b>
genotipo 1	0202	11	0.58
genotipo 2	0206	4	0.21
genotipo 3	0208	1	0.05
genotipo 6	0210	1	0.05
genotipo 7	0204	1	0.05
genotipo 8	0205	1	0.05
	TOTAL	19	1

<b>Alelo</b>	<b>Frecuencia</b>
2	0.789
4	0.026
5	0.026
6	0.105
8	0.026
10	0.026
TOTAL	1



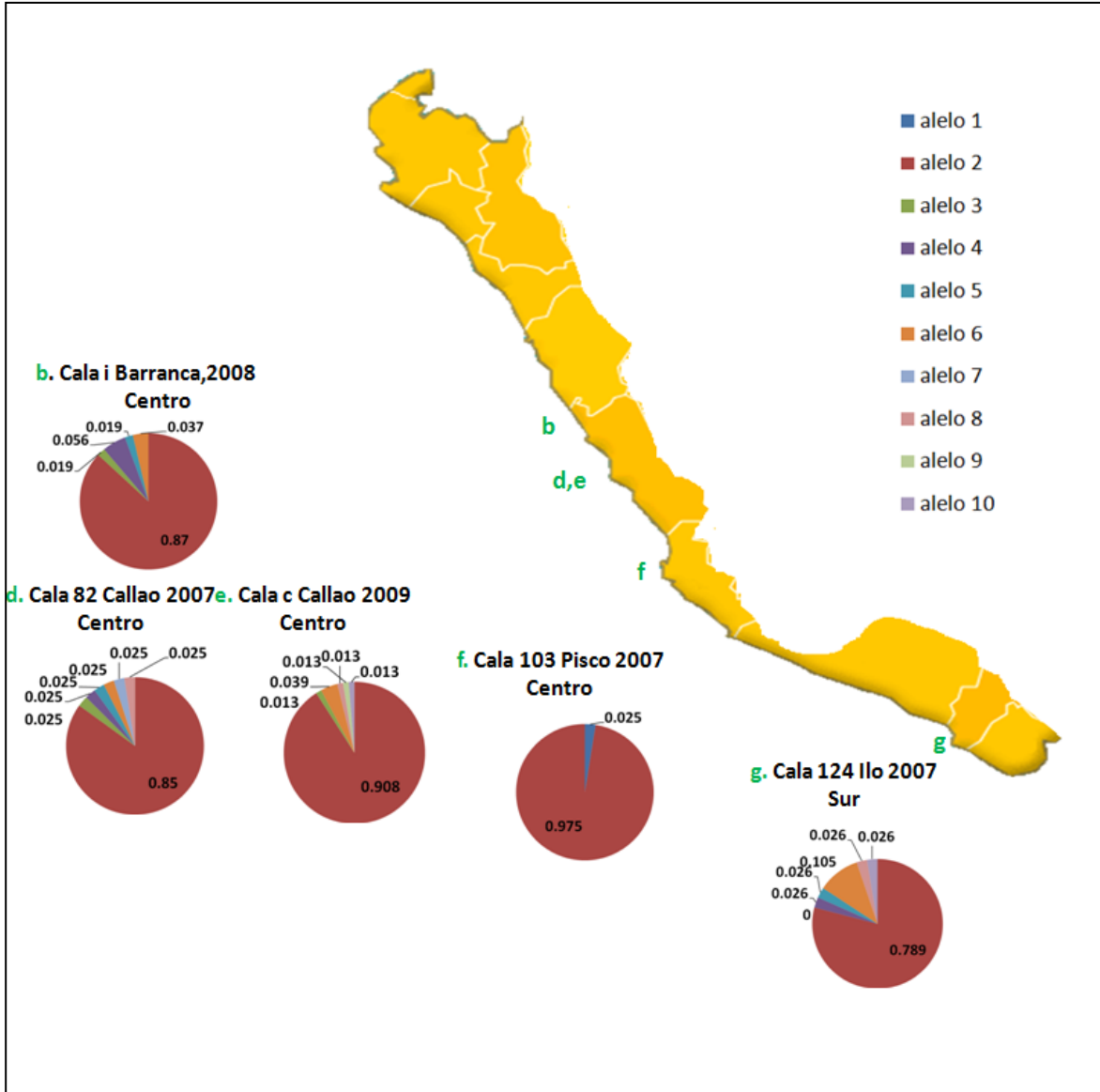


Figura 18. Distribución de frecuencias alélicas del marcador Mlc-3 en anchoveta peruana a lo largo del litoral peruano.

En la siguiente tabla se muestran los datos de la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), Fis, y riqueza alélica de las 5 calas evaluadas de anchoveta peruana.

Tabla 14. Estimadores de nivel de variabilidad genética basados en el análisis con Mlc-3

<b>Cala</b>	<b>(Ho)</b>	<b>(He)</b>	<b>Valor P</b>	<b>Fis</b>	<b>Genotipos</b>	<b>Alelos</b>	<b>Riqueza alélica</b>
c	0.18421	0.17579	1.00	-0.049	6	6	3.880
l	0.25926	0.24179	1.00	-0.074	5	5	4.301
82	0.3000	0.28077	1.00	-0.070	7	7	6.700
103	0.05000	0.05000	1.00	0.000	2	2	1.950
124	0.42105	0.37269	1.00	-0.134	6	6	6.00
TOTAL	124 individuos				10	10	4.310

El promedio de la heterocigosidad observada en el litoral peruano es de 0.243. El marcador ILP Mlc-3 mostró un bajo grado de polimorfismo de longitud. Se encontraron 10 genotipos y 10 alelos en los 124 individuos evaluados. El alelo 2 se encontró en todas las calas analizadas con una fuerte frecuencia (0.975-0.789), los alelos 9, 7 y 1 se encontraron exclusivamente en las calas “c”, “82” y “103” respectivamente, los demás alelos se compartieron en todas las calas analizadas. El genotipo predominante fue el 1 (homocigoto para el alelo 2) en la población.

Los valores de Fis se encuentran cercanos a 0, y el valor P de las Ho y He es de 1, evidenciando que cada población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg.

### V.3.1.2 Intrón 7 de la Creatina Quinasa (Ck-7)

Se amplificaron un total de 98 individuos con el ILP Ck-7.

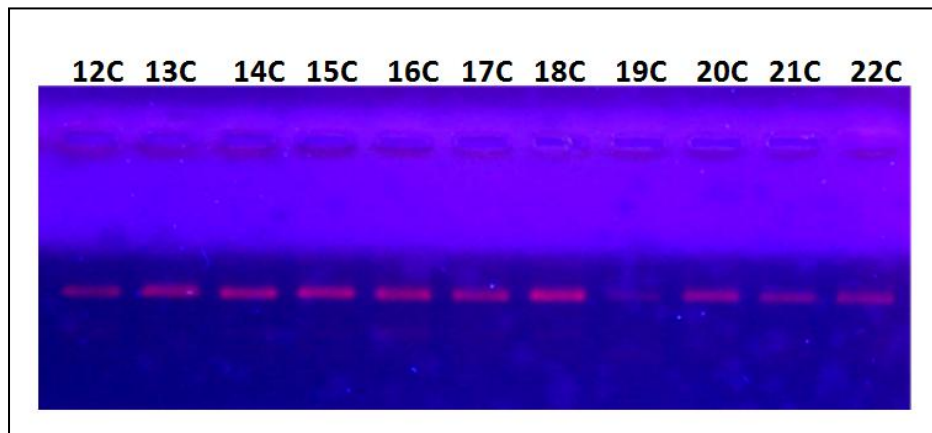


Figura 19. Electroforesis horizontal en gel de agarosa 1.5% (100V, 40 min) del marcador Ck-7 amplificado en anchoveta peruana.

Los amplicones fueron corridos en geles de acrilamida 5% denaturante. Se realizaron varias corridas en geles largos (20 x 40cm) debido al tamaño del producto, esto para separar al máximo los alelos y la lectura de estos sea lo más exacta posible. En las Figuras N° se pueden observar algunos geles utilizados para la asignación de los alelos.

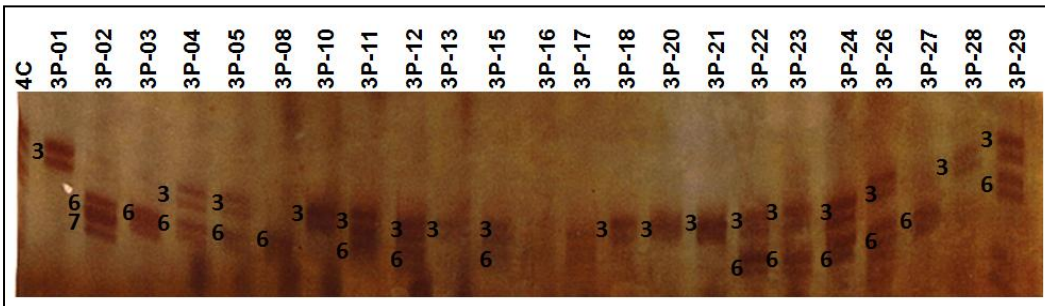
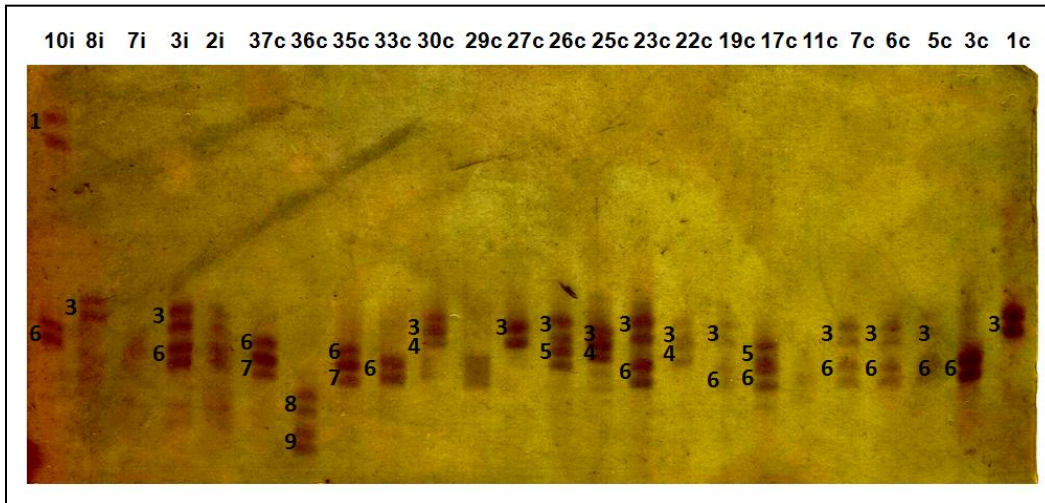
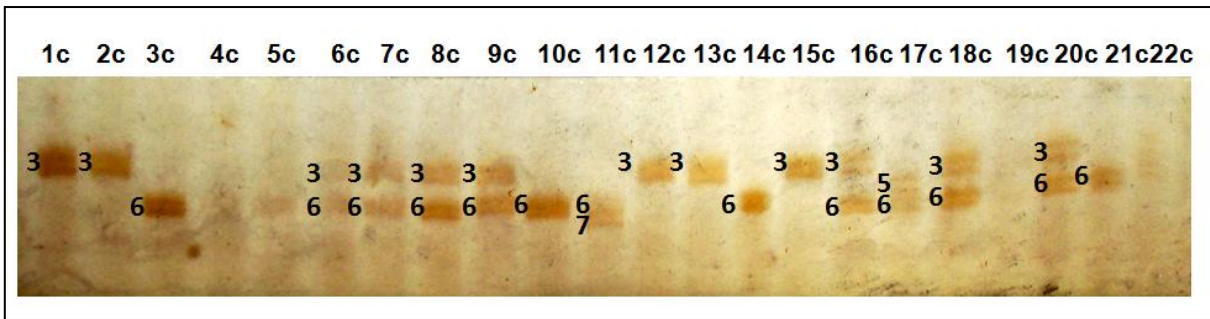


Figura 20. Electroforesis vertical en geles de acrilamida 5% denaturante (800V, 12 horas) del marcador Ck-7 amplificado en anchoveta peruana

Tabla 15. Genotipos encontrados en la anchoveta Peruana usando el marcador Ck-7

<b>Cala "C" Callao-2009</b>							
<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>
1	33	11	67	21	66	31	36
2	33	12	33	22	35	32	36
3	66	13	33	23	36	33	66
4	36	14	66	24	36	34	36
5	36	15	33	25	34	35	67
6	36	16	36	26	35	36	89
7	36	17	56	27	33	37	67
8	36	18	36	28	38	38	36
9	36	19	36	29	66	39	36
10	66	20	33	30	34		
<b>Cala "i" Barranca-Supe-2008</b>							
<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>
1	36	8	33	15	-	22	33
2	68	9	33	16	16	23	-
3	36	10	16	17	33	24	36
4	36	11	66	18	33	25	66
5	36	12	67	19	67	26	67
6	34	13	26	20	33	27	36
7	67	14	36	21	-	28	66
						29	67
						30	89
<b>Cala "3P" Salaverry-2009</b>							
<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>
1	33	11	36	21	33	31	33
2	67	12	36	22	36	32	33
3	66	13	33	23	36	33	36
4	36	14	--	24	36	34	33
5	36	15	36	25	--	35	--
6	--	16	--	26	36	36	66
7	--	17	36	27	66	37	33
8	66	18	33	28	33	38	36
9	--	19	--	29	36	39	36
10	33	20	33	30	33	40	36

Tabla 16. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ck-7 en anchoveta peruana

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0303	25	0.26
genotipo 2	0606	13	0.13
genotipo 3	0306	38	0.39
genotipo 4	0607	9	0.09
genotipo 5	0506	1	0.01
genotipo 6	0305	2	0.02
genotipo 7	0304	3	0.03
genotipo 8	0308	1	0.01
genotipo 9	0809	2	0.02
genotipo 10	0608	1	0.01
genotipo 11	0106	2	0.02
genotipo 12	0206	1	0.01
TOTAL		98	1.00

Alelo	Frecuencia
1	0.010
2	0.005
3	0.480
4	0.015
5	0.015
6	0.398
7	0.046
8	0.020
9	0.010
TOTAL	1.00

El genotipo más frecuente para el marcador Ck-7 en la población, sin considerar calas, es el genotipo 1 (homocigoto para el alelo 3), 3 (heterocigoto para 3 y 6) y el 2 (homocigoto para el alelo 6), de los 98 individuos analizados el 26%, 39% y 13% cuentan con este genotipo respectivamente.

Tabla 17. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ck-7 en la cala "c"

(anchoveta Peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0303	7	0.18
genotipo 2	0606	6	0.15
genotipo 3	0306	16	0.41
genotipo 4	0607	3	0.08
genotipo 5	0506	1	0.03
genotipo 6	0305	2	0.05
genotipo 7	0304	2	0.05
genotipo 8	0308	1	0.03
genotipo 9	0809	1	0.03
	TOTAL	39	1.00

Alelo	Frecuencia
3	0.449
4	0.026
5	0.038
6	0.410
7	0.038
8	0.026
9	0.013
TOTAL	1

Tabla 18. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ck-7 en la cala "i"  
(anchoveta Peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0303	6	0.22
genotipo 2	0606	3	0.11
genotipo 3	0306	7	0.26
genotipo 4	0607	5	0.19
genotipo 7	0304	1	0.04
genotipo 9	0809	1	0.04
genotipo 10	0608	1	0.04
genotipo 11	0106	2	0.07
genotipo 12	0206	1	0.04
	TOTAL	27	1

Alelo	Frecuencia
1	0.037
2	0.019
3	0.370
4	0.019
6	0.407
7	0.016
TOTAL	1

Tabla 19. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ck-7 en la cala "3p"  
(anchoveta Peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0303	12	0.38
genotipo 2	0606	4	0.13
genotipo 3	0306	15	0.47
genotipo 4	0607	1	0.03
	TOTAL	32	1

Alelo	Frecuencia
3	0.609
6	0.375
7	0.016
TOTAL	1

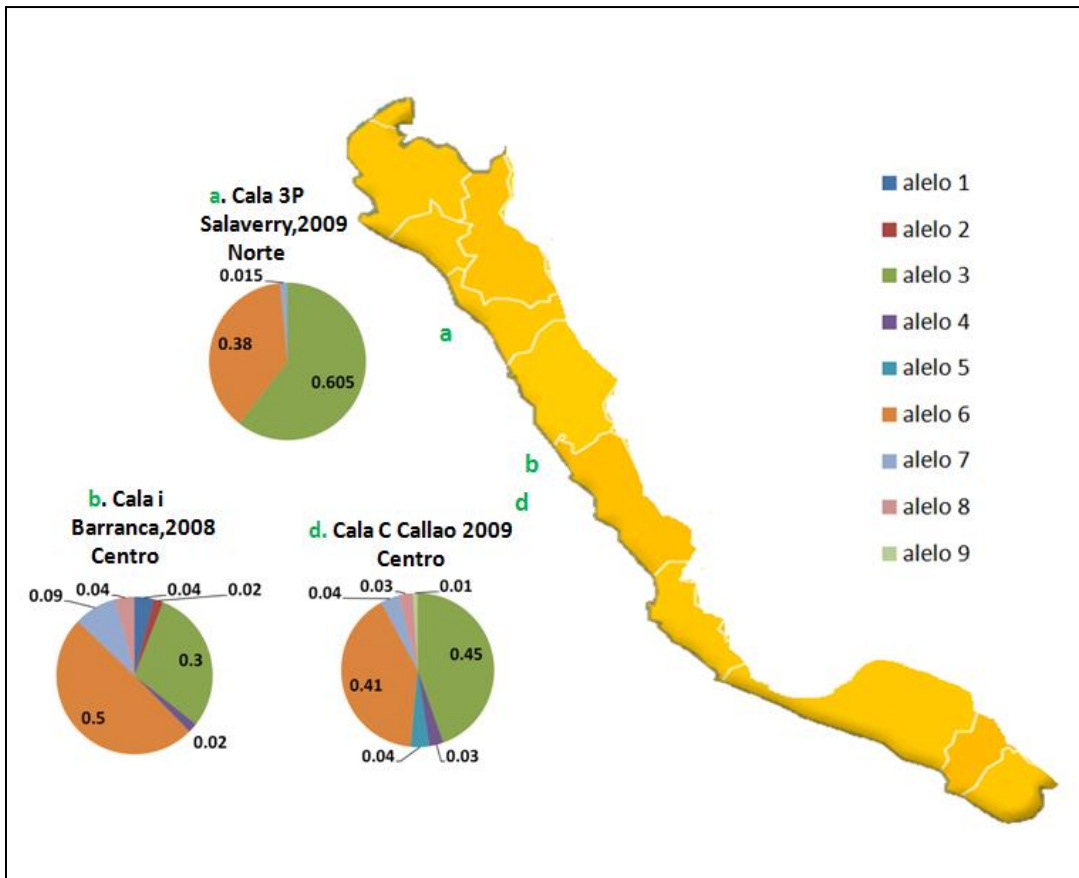


Figura 21. Distribución de la frecuencia alélica del ILP Ck-7 en la anchoveta peruana a lo largo del litoral peruano.

En la siguiente tabla se muestran los datos de  $H_o$ ,  $H_e$ , Fis, riqueza alélica de las 3 calas evaluadas de anchoveta peruana.

Tabla 20. Estimadores de nivel de variabilidad genética basados en el análisis con Ck-7

Cala	( $H_o$ )	( $H_e$ )	P-valor	Fis	Genotipos	Alelos	Riqueza alélica
c	0.666	0.634	0.185	-0.052	9	7	8.00
i	0.666	0.697	0.09	0.045	9	6	6.455



3p	0.500	0.495	0.495	-0.009	4	3	2.844
TOTAL	98 individuos				12	9	6.148

El promedio de la heterocigosidad observada en el litoral peruana es de 0.611. El marcador ILP Ck-7 mostró un grado de polimorfismo de longitud mayor en comparación al marcador Mlc-3. Se encontraron 12 genotipos y 9 alelos en los 98 individuos evaluados. El alelo 3 y 6 se encontraron en todas las calas analizadas con una frecuencia de 0.609-0.370 y 0.410-0.375 respectivamente. Los alelos 1 y 2 sólo se encontraron en la cala i. Los genotipos predominantes en todas las calas fueron el 1 (3/3), 2 (6/6) y 3 (3/6).

Los valores de Fis se encuentran cercanos a cero, y el P-valor de las Ho y He es mayor a 0.05, evidenciando que no la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg.

El valor global de Fst (diferenciación genética entre poblaciones) es 0.0219 con un P-valor de 0.122+-0.0119, lo que indica que las calas analizadas (pertenecientes al stock centro y sur) constituyen una misma población

Tabla 21. Valores de Fst entre las diferentes calas analizadas

	<b>Cala c</b>	<b>Cala i</b>	<b>Cala 3p</b>
<b>Cala c</b>	0.00000		
<b>Cala i</b>	-0.00625	0.00000	
<b>Cala 3p</b>	0.001233	0.03907*	0.00000

\* P-valor <0.05

Los valores de las comparaciones pareadas de Fst entre calas fueron bajos (Tabla N°20). Los P-valores son mayores a 0.05, es decir que no existe diferenciación genética entre las calas analizadas, con excepción del valor P entre las calas “3p” e “i” (0.04653+-0.0021), lo

que evidencia diferencia genética entre estas dos calas, pero esta no es suficiente para que constituyan dos poblaciones diferentes.

Aunque los valores pareados de  $F_{st}$ , no evidenciaron una diferencia genética entre calas, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Tabla N°21) con el fin de determinar la variabilidad dentro y entre agrupaciones. Se realizaron dos agrupaciones siguiendo los siguientes criterios:

- Stock centro (cala “c”, “i”) vs. Stock Norte (“3p”)

Tabla 22. Análisis de varianza molecular entre los stock centro y sur en *E. ringens*

Variación	Varianza	% variación total	Estadístico F	P-valores
Entre grupos (centro y norte)	0.00842	2.72	0.02190	0.09873+-0.00932
Entre poblaciones (“c”, “i” y “3p”)	-0.00163	-0.53	-0.00540	0.54839+-0.01535
Dentro de las poblaciones	0.30311	97.81	0.02716	0.32454+-0.01790

El análisis espacial (entre stock centro y norte) mediante la prueba de AMOVA arrojó que existe una diferencia de 2.72% entre estos grupos pero esta no es significativa, las diferencias entre las poblaciones analizadas es nula y dentro de las poblaciones constituye un 97.81%.

### V.3.1.3 Ee10 (*Engraulis encrasicolus* 10)

Se amplificaron un total de 168 individuos con el STR Ee10.

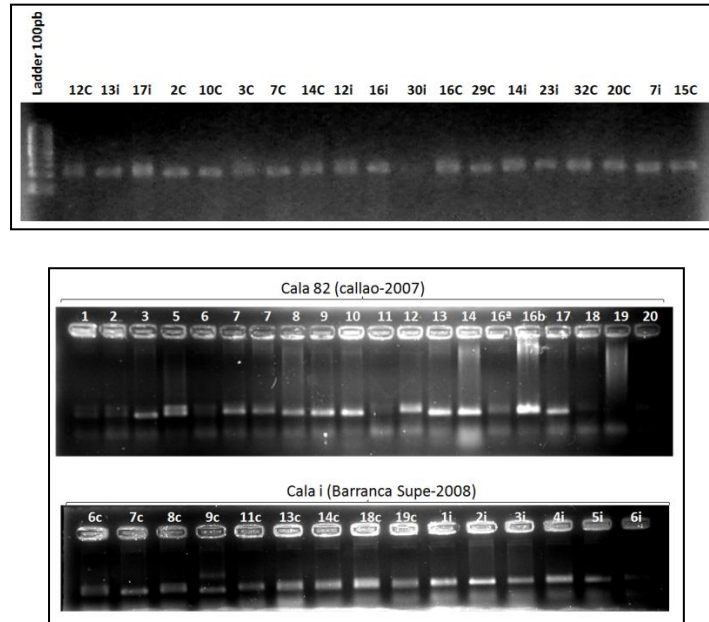


Figura 22. Electroforesis horizontal en geles de agarosa 1.5% (100V, 30min) del marcador STR Ee10 amplificado en anchoveta peruana.

Los amplicones fueron corridos en geles de acrilamida 6% denaturante. Se realizaron varias corridas en geles medianos (20 x 20cm) debido al tamaño del producto. En las Figuras N° se pueden observar algunos geles utilizados para la asignación de los alelos.

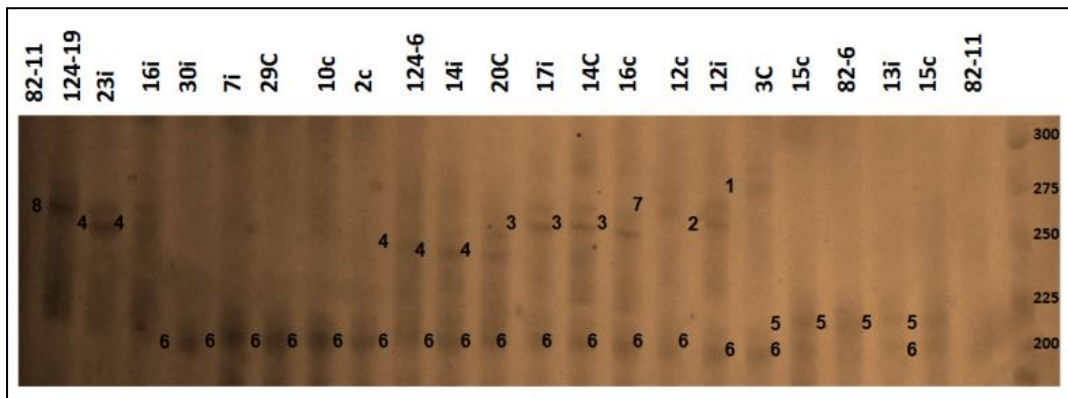


Figura 23. Electroforesis vertical en geles de acrilamida 5% (500V, 2 horas 30min) del marcador STR Ee10 en anchoveta peruana. Gel: 1mm de grosor

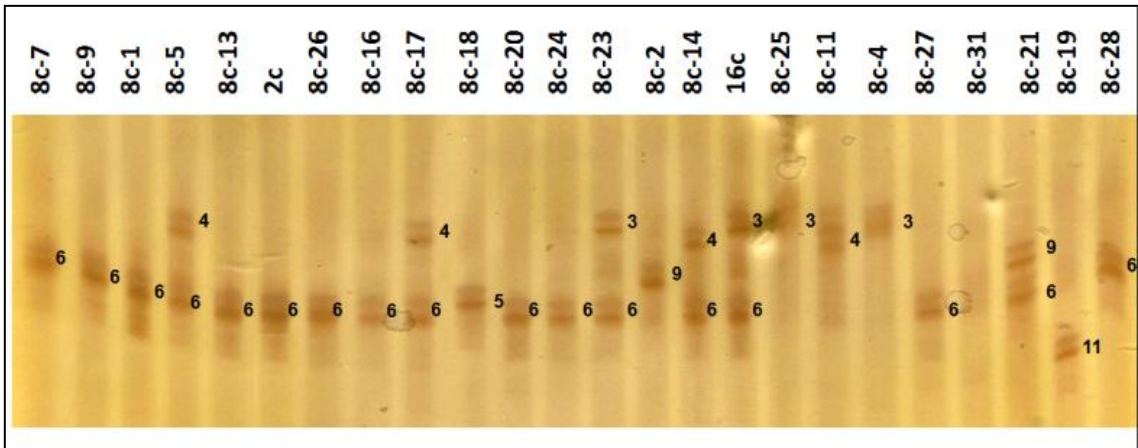
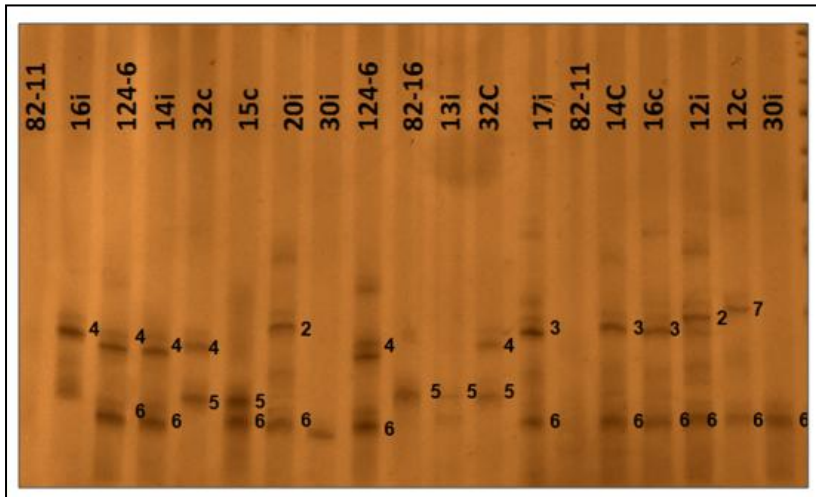
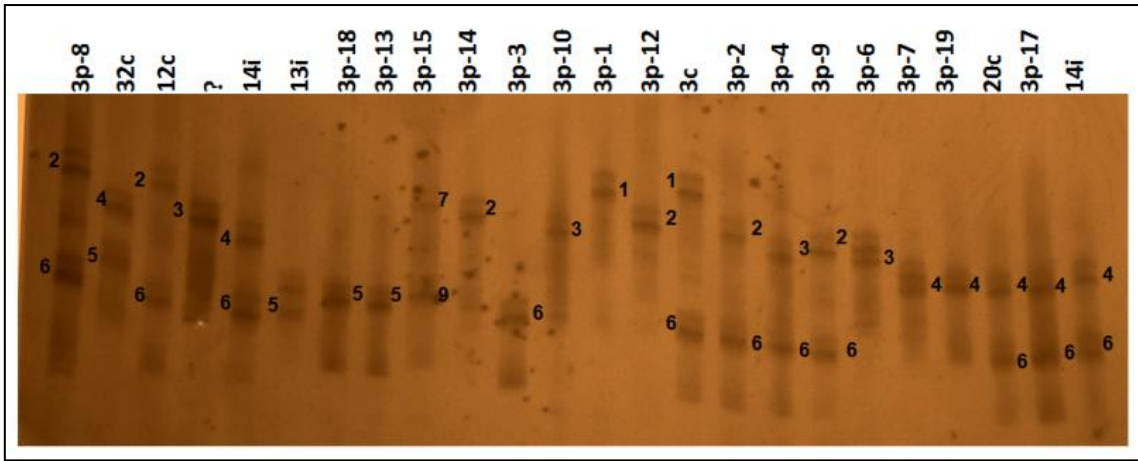


Figura 24. Electroforesis vertical en geles de acrilamida 5% (500V, 2 horas 30min) del marcador STR Ee10 en anchoveta peruana. Gel: 1mm de grosor

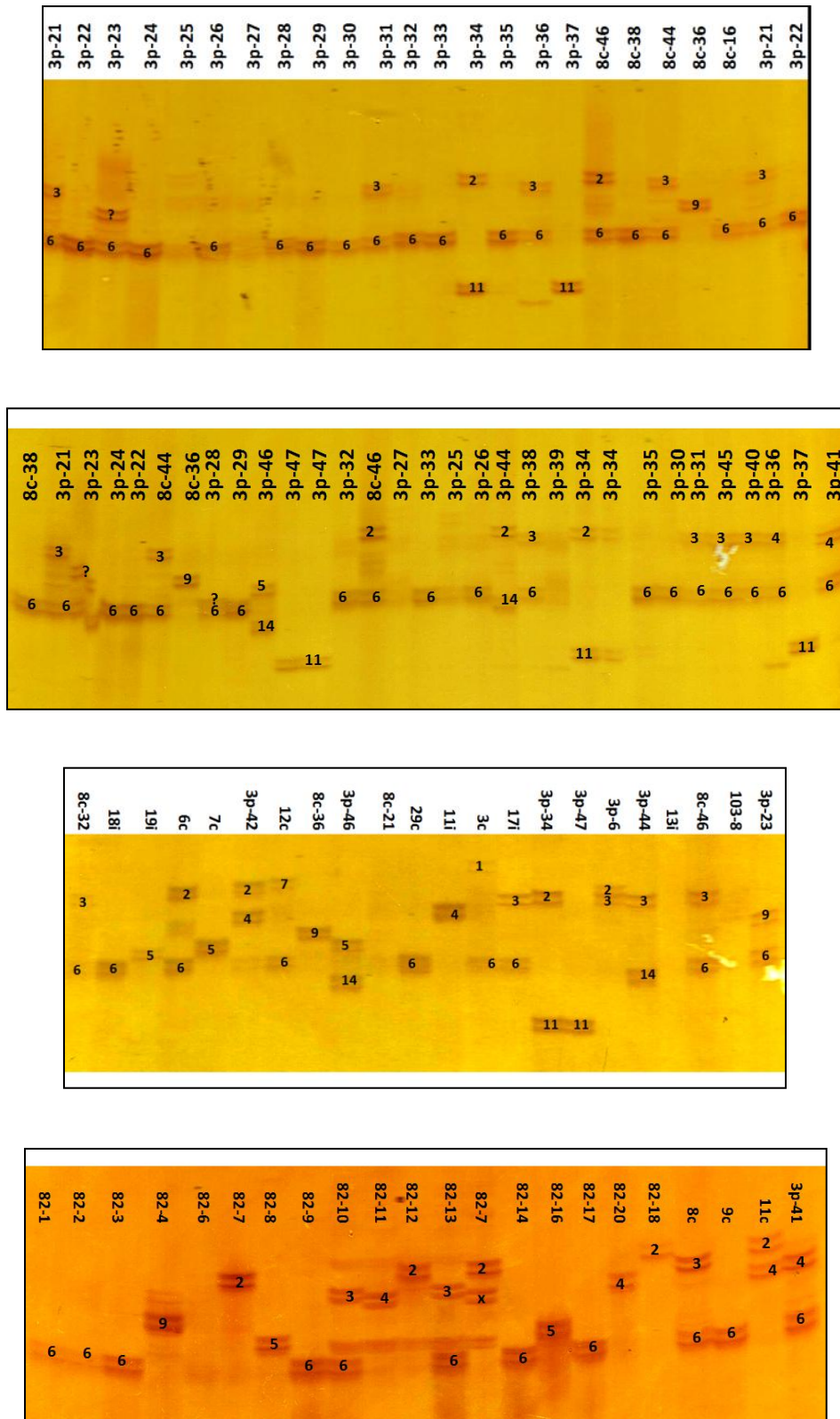


Figura 25. Electroforesis vertical en geles de acrilamida 5% (500V, 2 horas 30min) del marcador STR Ee10 en anchoveta peruana. Gel: 0.4mm de grosor

Tabla 23. Genotipos encontrados en la anchoveta Peruana usando el marcador Ee-10.

<b>Cala "82" Callao- 2007</b>							
<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>
1	66	6	55	11	44	16	55
2	66	7	22	12	22	17	66
3	66	8	55	13	36	18	22
4	99	9	66	14	66	19	--
5	--	10	36	15	55	20	44
<b>Cala "C" Callao- 2009</b>							
<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>
2c	66	9c	66	14c	36	19c	36
3c	16	10c	66	14c	36	20c	46
6c	26	11c	24	15c	56	21c	66
7c	55	12c	76	16c	36	23c	66
8c	36	13c	46	18c	26	29c	66
						32c	45
<b>Cala "i" Barranca Supe- 2008</b>							
<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>
2i	22	7i	66	12i	26	19i	55
4i	22	8i	66	13i	55	20i	26
3i	33	9i	66	14i	46	23i	44
5i	22	10i	46	16i	44	30i	66
6i	77	11i	44	17i	36		
<b>Cala "8C" Huacho- 2009</b>							
<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>
1	66	13	66	23	36	34	66
2	99	14	46	24	66	36	99
4	33	16	66	25	22	38	66
5	46	17	46	26	66	39	22
6	33	18	55	27	66	41	46
7	66	19	1111	28	66	42	46
9	66	20	66	29	66	43	66
12	96	21	96	32	26	44	36
						45	66
						46	36
<b>Cala "3P" Salaverry- 2009</b>							
<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>
1	11	13	55	24	66	36	36
2	26	14	22	25	26	37	1111
3	66	15	75	26	66	38	36
4	36	16	36	28	66	40	36

6	33	17	46	29	66	41	46
7	44	18	55	30	66	42	24
8	26	19	44	31	36	44	314
9	26	20	99	32	66	45	36
10	33	21	36	33	66	46	514
11	66	22	66	34	211	47	1111
12	22	23	96	35	66		

**Cala "103" Pisco- 2007**

<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>
1	66	6	66	11	44	16	
2	126	7	66	12	44	17	33
3	36	8	44	13	?	18	44
4	36	9	0	14	44	19	35
5	66	10	46	15	44	20	36

**Cala "124" Ilo- 2007**

<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Individuo</b>	<b>Genotipo</b>
1	66	6	46	11	77	16	44
2	22	7	45	12	33	17	76
3	-	8	66	13	-	18	714
4	46	9	-	14	-	19	88
5	23	10	66	15	44	20	46

Los genotipos y alelos encontrados en las siete calas se resumen en las siguientes tablas.

Tabla 24. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la cala "82"

(anchoveta Peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0606	6	0.33
genotipo 2	0909	1	0.06
genotipo 3	0505	4	0.22
genotipo 4	0202	3	0.17
genotipo 5	0306	2	0.11
genotipo 6	0404	2	0.11
	TOTAL	18	1

Alelo	Frecuencia
2	0.167
3	0.056
4	0.111
5	0.222
6	0.389
9	0.056
TOTAL	1

Tabla 25. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la cala "c"

(anchoveta Peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0606	6	0.29
genotipo 3	0505	1	0.05
genotipo 5	0306	5	0.24
genotipo 7	0406	2	0.1
genotipo 8	0706	1	0.05
genotipo 9	0106	1	0.05
genotipo 10	0506	1	0.05
genotipo 11	0405	1	0.05
genotipo 12	0204	1	0.05
genotipo 13	0206	2	0.1
	TOTAL	21	1

Alelo	Frecuencia
1	0.024
2	0.071
3	0.119
4	0.095
5	0.095
6	0.571
7	0.024
TOTAL	1



Tabla 26. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la cala "i"

(anchoveta Peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0606	4	0.21
genotipo 3	0505	2	0.11
genotipo 4	0202	3	0.16
genotipo 5	0306	1	0.05
genotipo 6	0404	3	0.16
genotipo 7	0406	2	0.11
genotipo 13	0206	2	0.11
genotipo 14	0303	1	0.05
genotipo 15	0707	1	0.05
	TOTAL	19	1

Alelo	Frecuencia
2	0.211
3	0.079
4	0.211
5	0.105
6	0.342
7	0.053
TOTAL	1

Tabla 27. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la cala "8c"

(anchoveta Peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0606	15	0.44
genotipo 2	0909	2	0.06
genotipo 3	0505	1	0.03
genotipo 4	0202	2	0.06
genotipo 5	0306	3	0.09
genotipo 7	0406	5	0.15
genotipo 13	0206	1	0.03
genotipo 14	0303	2	0.06
genotipo 16	0906	2	0.06
genotipo 17	1111	1	0.03
	TOTAL	34	1

Alelo	Frecuencia
2	0.074
3	0.103
4	0.074
5	0.029
6	0.603
9	0.088
11	0.029
TOTAL	1

Tabla 28. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la cala “3p”

(anchoveta Peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0606	11	0.26
genotipo 2	0909	1	0.02
genotipo 3	0505	2	0.05
genotipo 4	0202	2	0.05
genotipo 5	0306	8	0.19
genotipo 6	0404	2	0.05
genotipo 7	0406	2	0.05
genotipo 9	0101	1	0.02
genotipo 12	0204	1	0.02
genotipo 13	0206	4	0.09
genotipo 14	0303	2	0.05
genotipo 16	0906	1	0.02
genotipo 17	1111	2	0.05
genotipo 18	0705	1	0.02
genotipo 19	0211	1	0.02
genotipo 20	0314	1	0.02
genotipo 21	0514	1	0.02
	TOTAL	43	1

Alelo	Frecuencia
1	0.023
2	0.116
3	0.151
4	0.081
5	0.070
6	0.430
7	0.012
9	0.035
11	0.058
14	0.023
TOTAL	1

Tabla 29. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la cala “103”

(anchoveta Peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0606	4	0.24
genotipo 5	0306	3	0.18
genotipo 6	0404	6	0.35
genotipo 7	0406	1	0.06
genotipo 14	0303	1	0.06
genotipo 22	1206	1	0.06
genotipo 23	0305	1	0.06
	TOTAL	17	1

Alelo	Frecuencia
3	0.176
4	0.382
5	0.029
6	0.382
12	0.029
TOTAL	1

Tabla 30. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la cala “124”

(anchoveta Peruana)

<b>Genotipo</b>	<b>Alelos</b>	<b>Individuos</b>	<b>Frecuencia Genotípica</b>
genotipo 1	0606	3	0.19
genotipo 4	0202	1	0.06
genotipo 6	0404	2	0.13
genotipo 7	0406	3	0.19
genotipo 8	0706	1	0.06
genotipo 11	0405	1	0.06
genotipo 14	0303	1	0.06
genotipo 15	0707	1	0.06
genotipo 24	0808	1	0.06
genotipo 25	0714	1	0.06
genotipo 26	0203	1	0.06
	<b>TOTAL</b>	<b>16</b>	<b>1</b>

<b>Alelo</b>	<b>Frecuencia</b>
2	0.094
3	0.094
4	0.250
5	0.031
6	0.313
7	0.125
8	0.063
14	0.031
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>

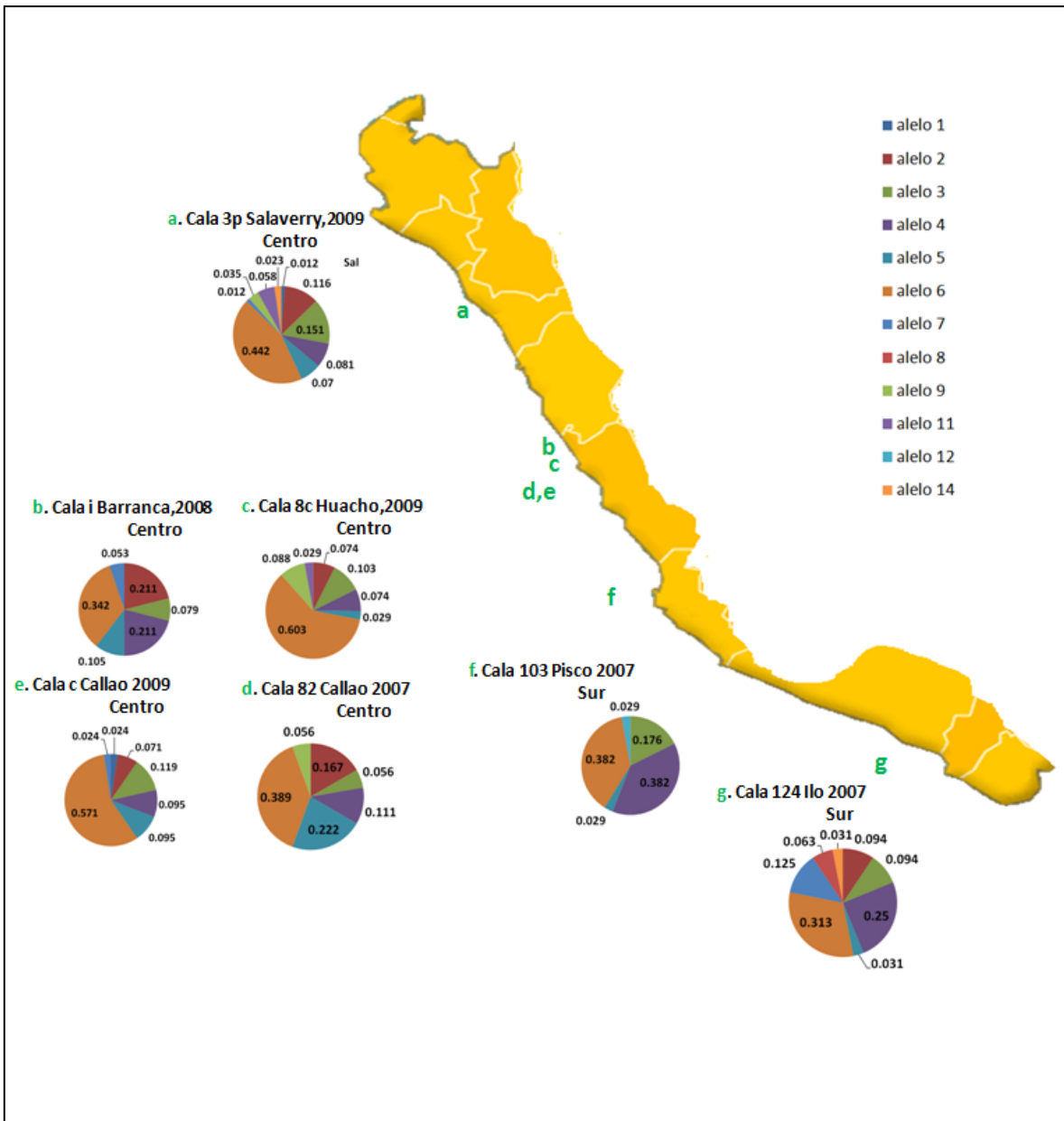


Fig 23. Distribución de la frecuencia alélica del STR Ee10 en la anchoveta peruana a lo largo del litoral peruano.

En la siguiente tabla se muestran los datos de  $H_o$ ,  $H_e$ , Fis Y riqueza alélica de las 7 calas evaluadas de anchoveta peruana.

Tabla 31. Estimadores de variabilidad genética basados en la amplificación del STR Ee10

<b>Cala</b>	<b>(Ho)</b>	<b>(He)</b>	<b>P-valor</b>	<b>Fis</b>	<b>Genotipos</b>	<b>Alelos</b>	<b>Riqueza alélica</b>
82	0.11111	0.77460	0.000	0.860	6	6	5.981
C	0.66667	0.65041	0.635	-0.026	10	7	6.509
i	0.26316	0.79516	0.00002	0.675	9	6	5.976
8c	0.32353	0.61457	0.0000	0.477	10	7	6.348
3p	0.48837	0.76033	0.0000	0.360	17	10	7.924
103	0.35294	0.69519	0.0022	0.500	7	5	4.882
124	0.43750	0.82661	0.00072	0.479	11	8	8.00
<b>TOTAL</b>		168 individuos			26	12	7.342

Al analizar las heterocigosidades se observó que la observada (Ho) fue mucho menor a la esperada (He) en todas las calas analizadas, con excepción de la cala c, presentando una desviación en el equilibrio Hardy-Weinberg (EHW). Los valores de Fis se encuentran cercanos a 1, lo que indica un déficit de heterocigotos. El alelo predominante es el alelo 6, con una frecuencia de 0.603-0.313 en las calas analizadas.

Debido a esta desviación tan significativa en el EHW fue recomendable añadir el elemento “posibilidad de alelos nulos” como una de las posibles causas que se han aceptado en la literatura para justificar este tipo de hallazgo.

Tabla 32. Posibilidad de alelos nulos en las calas analizadas de anchoveta peruana.

Cala	N	<i>P(a.n.)</i>	Alelo	Conteo	Het.	Hom.	Frecuencia	Frec. considerando a.n.
82	18	0.7420	2	6	0	3	0.1667	0.0382
			3	2	2	0	0.0556	0.0253
			4	4	0	2	0.1111	0.0253
			5	8	0	4	0.2222	0.0513
			6	14	2	6	0.3889	0.1054
			9	2	0	1	0.0556	0.0126
Total individuos					2	16		
c	21	-0.0431	1	1	1	0	0.0238	0.0241
			2	3	3	0	0.0714	0.0740
			3	5	5	0	0.1190	0.1269
			4	4	4	0	0.0952	0.1001
			5	4	2	1	0.0952	0.0740
			6	24	12	6	0.5714	0.6199
			7	1	1	0	0.0238	0.0241
Total individuos					14	7		
i	19	0.4800	2	8	2	3	0.2105	0.1070
			3	3	1	1	0.0789	0.0414
			4	8	2	3	0.2105	0.1070
			5	4	0	2	0.1053	0.0414
			6	13	5	4	0.3421	0.2028
			7	2	0	1	0.0526	0.0205
Total individuos					5	14		
8c	34	0.2762	2	5	1	2	0.0735	0.0416
			3	7	3	2	0.1029	0.0704
			4	5	5	0	0.0735	0.0704
			5	2	0	1	0.0294	0.0137
			6	41	11	15	0.6029	0.4581
			9	6	2	2	0.0882	0.0559
			11	2	0	1	0.0294	0.0137
Total individuos					11	23		
3p	43	0.2005	1	1	1	0	0.0116	0.0112
			2	10	6	2	0.1163	0.0937
			3	13	9	2	0.1512	0.1314
			4	7	3	2	0.0814	0.0575
			5	6	2	2	0.0698	0.0457
			6	38	16	11	0.4419	0.3697
			7	1	1	0	0.0116	0.0112
			9	3	1	1	0.0349	0.0226
			11	5	1	2	0.0581	0.0341
			14	2	2	0	0.0233	0.0226
Total individuos					21	22		
103	17	0.3263	3	6	4	1	0.1765	0.1414
			4	13	1	6	0.3824	0.2050
			5	1	1	0	0.0294	0.0266

			6	13	5	4	0.3824	0.2741
			12	1	1	0	0.0294	0.0266
			Total individuos		6	11		
			2	3	1	1	0.0938	0.0590
			3	3	1	1	0.0938	0.0590
			4	8	4	2	0.2500	0.1899
			5	1	1	0	0.0313	0.0291
124	16	0.2888	6	10	4	3	0.3125	0.2260
			7	4	2	1	0.1250	0.0900
			8	2	0	1	0.0625	0.0291
			14	1	1	0	0.013	0.0291
			Total individuos		7	9		

N: número de individuos, P(a.n.): probabilidad de la existencia de alelos nulos, Het.: heterocigoto, Hom.: homocigoto, Frec.: frecuencia, a.n.: alelos nulos.

Todas las calas, con excepción de la cala c, muestran estimados de frecuencias para alelos nulos de 0.2005-0.7420. La “posibilidad de alelos nulos” total fue de 0.3856, sin considerar la cala c (que se encontraba en EHW) y de 0.29 al considerarla.

## **VI. DISCUSIÓN**

---

### Extracción de ácidos nucleicos.

En este trabajo se demostró la efectividad del protocolo de extracción utilizando el buffer TNES-urea. Este es un método simple, reproducible, económico y no contaminante, posible de utilizar para la obtención de ADN a partir de muestras de tejido muscular. Mediante la amplificación de los marcadores ILPs y STRs, se confirmó su utilidad y reproducibilidad en estudios genéticos basados en PCR. Este protocolo de extracción puede substituir protocolos que utilizan elementos químicos contaminantes y peligrosos, como es el caso de protocolos con fenol-cloroformo (Madisen y col. 1987). El ADN extraído a partir de tejido muscular tuvo mejor calidad que el extraído a partir de muestras de gónadas (Figura 7). Esto se debió a la menor presencia de componentes celulares (proteínas, lípidos), permitiendo la obtención de muestras de ADN más puras.

### Tamaño de muestra analizado.

El tamaño de muestra se considera óptimo, si se tiene en cuenta que la posibilidad de encontrar alelos en una frecuencia determinada está condicionada por el número de muestras analizadas y está expresado por la ecuación de Leung y col. (1993):  $N = \ln(1-P) / \ln(1-F)$ , donde N= tamaño de muestra, P= probabilidad de encontrar el alelo y F= frecuencia del alelo. Así, para encontrar alelos en una frecuencia mayor al 0.05 son suficientes 45 individuos. Para la evaluación de los marcadores Mlc-3, Ck-7 y Ee 10 se analizaron 124, 98 y 168 individuos respectivamente. Sin embargo, algunos alelos se encontraron con una frecuencia menor a 0.05 (0.01) (Tabla 8 y 16).



### Estrategia de amplificación cruzada y alelos nulos

La amplificación cruzada es una alternativa cuando no se cuenta con los marcadores moleculares identificados directamente en la especie de trabajo, además de que reduce el tiempo y los costos implicados en el aislamiento de estos. Varios trabajos reportan, además del aislamiento de los microsátélites en una especie específica, la amplificación de éstos en otras especies. Takagi et al. 1997 reportan cinco loci microsátélites aislados en el pez *Pragus major* y probados en otras especies de la familia Sparidae logrando amplificar de uno a cuatro loci.

Los 2 loci microsátélites con los que se trabajó en la presente tesis, fueron reportados para la anchoveta europea. Uno no logró amplificar bajo las condiciones ensayadas (Ee2), lo que indicaría que las regiones flanqueantes a este locus no se encuentran conservadas en la anchoveta peruana. En la anchovete europea este locus registró un total de 25 alelos, 0.58 de heterocigosidad observada y amplicones entre 210-284pb.

El locus Ee10, en la anchoveta europea, registró un total de 25 alelos, 0.89 de heterocigosidad observada y productos entre 176-272pb. En el caso de la anchoveta peruana, en la presente tesis, se identificaron 12 alelos, 0.38 de heterocigosidad observada y productos entre 200 y 300pb. Sin embargo, este locus mostró en la mayoría de las poblaciones analizadas (con excepción de la cala "c") deficiencia de heterocigotos (Tabla 31). Estos resultados concordarían con los reportados por Zarronaindia y col. en el año 2009., donde para cuatro poblaciones de anchoveta europea que estudiaron utilizando siete microsátélites (microsátélites especie-específicos y otros reportados para la anchoveta japonesa *E. japonica*), todos estos loci mostraron un déficit de heterocigotos. Esta deficiencia puede ser explicada por un apareamiento no al azar, el efecto Wahlund (este fenómeno se produce cuando dentro de una población existen subpoblaciones

aisladas) y especialmente por la presencia de alelos nulos, o una combinación de todos estos factores.

Para explicar esta deficiencia de heterocigotos en el trabajo, se podría descartar la selección natural, puesto que si se tratara de esto, el fenómeno se repetiría en todos los loci evaluados (ILPs y STRs).

Otra explicación para la deficiencia de heterocigotos puede deberse también al efecto Wahlund. La fuente clásica de este fenómeno es la inclusión de los individuos en una muestra que se ha originado a partir de poblaciones genéticamente diferenciadas. Los resultados de muchos otros estudios (Spanakis y col., 1989; Bembo y col., 1996; Magoulas y col., 1996, 2006; Borsa, 2002; Borsa y col., 2004) indican que a pesar de la falta general de las barreras de dispersión a lo largo de la costa, las poblaciones de anchoveta pueden estar subdivididas genéticamente. Individuos de estas poblaciones se pueden mezclar en diferentes momentos de sus vidas.

Finalmente, la presencia de alelos nulos podría contribuir al déficit de heterocigotos (DeWoody y Avise, 2000; O'Really y col. 2004). La fuente más común de alelos nulos es el error en el PCR al momento de amplificar algunos alelos. Los cebadores utilizados en el presente estudio fueron diseñados para microsatélites en la anchoveta europea (Landi, 2005), y algunas amplificaciones cruzadas no fueron exitosas. Al calcular la probabilidad de existencia de alelos nulos del marcador Ee10 en la anchoveta peruana, el programa CERVUS arrojó un valor de 0.2005-0.7450 para las calas estudiadas, estos valores no son despreciables (Tabla 32).

#### Técnica de Exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR.

El polimorfismo en la longitud de los intrones ha revelado la existencia de una gran variabilidad en varios estudios de genética de poblaciones. Muchos de estos estudios han

sido restringidos inicialmente a pocos genes (Factor de elongación: EF 1 alfa, en *Penaeus vannamei*) y frecuentemente los intrones polimórficos han sido encontrados de forma ocasional (Bierne y col. 2000). Pa poder realizar la amplificación de los intrones, los cebadores utilizados en la PCR se sitúan en los exones. Una de las ventajas más importantes del uso de los intrones es que los cebadores por lo general son “universales” (France y col. 1999).

Este es uno de los primeros trabajos, realizados mediante esta técnica, en la anchoveta peruana distribuida a lo largo del litoral peruano donde se utilizan herramientas genéticas moleculares.

En el trabajo de Hassan y col. 2002, se diseñaron cebadores de las a partir de regiones conservadas de exones consecutivos de diferentes genes, primero realizaron una búsqueda de las secuencias exónicas publicadas en las bases de datos hasta esa fecha en diferentes especies de peces teleósteos (Tabla 4). De esta manera, estos cebadores fueron diseñados para ser lo más universal posible y puedan amplificar en una amplia gama de peces teleósteos. De este mismo enfoque se valió Touriya y col. 2003.

De los 3 ILPs probados, sólo Gh5 no amplificó bajo las condiciones probadas, esto debido a que las secuencias flanqueantes al intrón (los exones) no estarían tan conservados en la anchoveta peruana.

#### Variabilidad genética en *E. ringens*.

Al comparar el promedio de alelos por locus y de heterocigosidad observada, obtenidos en *E. ringens* con los marcadores ILPs, con los resultados reportados en la literatura (Tabla 4) se puede discutir lo siguiente:

En la anchoveta europea, según Touriya y col. 2003, para el marcador Mlc-3 se reportó, a partir del análisis de tres individuos, amplicones de 460pb, este marcador resultó ser polimorfismo para esta especie. En el presente trabajo, para la anchoveta peruana, se reporta productos con un peso promedio de 500pb, 10 alelos y una heterocigosidad de 0.243. Razón por la cual sólo se procedió a realizar el cálculo de heterocigosidades, observada y esperada, frecuencias alélicas y genotípicas, así como el valor Fis, esto debido al bajo grado de polimorfismo del marcador. El alelo predominante en la población de anchoveta peruana es el alelo 2, al igual que el genotipo 1, homocigoto para el alelo 2, de los 124 individuos analizados el 77% cuenta con este genotipo. Este intrón presenta una baja variabilidad genética, lo cual no lo hace apropiado para futuros análisis de estructura poblacional dentro de las especies. Los valores de heterocigosidad observada fueron variables en las calas del stock centro, desde 0.05 hasta 0.300, mientras que el valor más alto se encontró en la cala "124" correspondiente al stock sur.

Es necesario tener en cuenta que a pesar de que los intrones acumulan rápidamente las mutaciones, los niveles de diversidad genética observados en varios trabajos realizados mediante el análisis con microsatélites son mayores a los que se obtiene con la técnica del EPIC-PCR. Esto puede estar relacionado con la alta tasa de mutación que presenta los microsatélites lo cual conduce a un gran polimorfismo.

En la presente tesis se evaluó el polimorfismo en el tamaño del intrón, no el polimorfismo de secuencia, por lo cual no se descarta que exista un alto grado de polimorfismo si se analiza la secuencia de este.

Según Hassan y col. (2002), para la especie *Thunnus obesus*, atún ojo grande, se utilizaron 100 individuos y sólo se identificaron 3 alelos utilizando el marcador Ck-7 (Tabla 4). En esta tesis se analizaron 98 especímenes de anchoveta peruana y se identificaron 9 alelos y una heterocigosidad esperada de 0.611 mediante la técnica EPIC-PCR (Tabla

20). Las calas correspondientes al stock centro (cala “c” e “i”) mostraron el valor más alto de heterocigosidad observada 0.666, mientras que la cala “3p” (stock norte”) presentó la más baja 0.500. Estos valores de  $H_o$  indican que el marcador Ck-7 es un buen candidato para futuros estudios de genética de poblaciones en anchoveta peruana.

#### Variación interpoblacional en *E. ringens*.

Utilizando el marcador Ck-7 se pueden realizar algunos estudios preliminares en *E. ringens*. El valor de  $F_{st}$  global para *E. ringens* resultó ser bajo (0.02).

El análisis pareado de  $F_{st}$  entre las calas del stock “norte” y “centro” (Tabla 21) que según los datos morfológicos corresponderían a una misma unidad poblacional, ratificaría esta hipótesis. Los resultados demuestran que no existe una estructura genética para la especie en las zonas evaluadas. Esto es apoyado por el análisis de varianza molecular (Tabla 22).

No encontrar una estructura genética geográfica poblacional en esta especie no es un resultado desconcertante, los movimientos gregarios en las poblaciones de peces, especialmente de la anchoveta, toman lugar durante todas las fases de su ciclo de vida. Además, el medio oceánico no posee barreras tangibles como en los ambientes dulceacuícolas o terrestres, y por lo tanto la estructura genética de las poblaciones marinas está condicionada por factores oceanográficos y características propias de las especies para la dispersión (Avice, 1994).

Los resultados de éste estudio sirven de base para futuras aplicaciones de los ILPs en *E. ringens*. Incluir más localidades a lo largo del rango de distribución de la especie y monitorear la diversidad genética con un mayor número de loci, permitirá tener una perspectiva completa y detallada de su estructuración genética.

## VII. CONCLUSIONES

---

- La metodología de extracción de ácidos nucleicos, TNES-urea, ha servido para el aislamiento de ADN de la anchoveta peruana, preliminarmente este protocolo ha servido para extraer ADN de moluscos.
- Se demostró la utilidad de la estrategia de amplificación cruzada y de la técnica EPIC-PCR para poder obtener marcadores moleculares en especies sin data genética previa.
- Utilizando el marcador microsatélite Ee10, reportado para la anchoveta europea, casi todas las calas presentaron desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg (seis de siete), la principal razón en el déficit de heterocigotos se atribuye a la incidencia de alelos nulos.
- El marcador molecular, Ck-7, es prometedor para estudios de genética de poblaciones, basándonos en su valor de heterocigosidad. Mlc-3 mostró bajo nivel de polimorfismo y no constituye un buen candidato para futuros estudios genético poblacionales.

- No se detectó una diferenciación genética entre las localidades muestreadas, indicando que el stock norte y centro de *E. ringens*, está conformado por una sola población.
- Estos resultados son un primer paso para el inicio de estudios que enfoquen y aclaren muchos interrogantes que se plantean no sólo para *E. ringens* (en cuanto a los stock reportados en el litoral peruano), sino también para otros recursos pesqueros de importancia económica para nuestro país.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

---

- AVISE, J.C. Molecular markers, natural history and evolution. 2004. 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates, Inc Publishers, Sunderland, U.S.A. 683p.
- BEMBO, D.G., CARVALHO, G.R., CINGOLANI, N., y PITCHER, T.J. Electrophoretic analysis of stock structure in northern Mediterranean anchovies, *Engraulis encrasicolus*. ICES Journal of Marine Science. 53: 115-128.
- BIERNE, N., LEHNERT, A., BEDIER, E., BONHOMME, F. & MOORE, S. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC-PCR). 2000. Molecular Ecology. 9: 233-235.
- BJÖRKLUND, M. A method for adjusting allele frequencies in the case of microsatellite allele drop out. 2005. Mol. Ecol. Notes. 5:676-679.
- BORSA, P. Allozyme, mitochondrial-DNA, and morphometric variability indicate cryptic species of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). 2002. Biological Journal of the Linnean Society, 75: 261–269.
- BORSA, P., COLLET, A., and DURAND, J. D. Nuclear-DNA markers confirm the presence of two anchovy species in the Mediterranean. 2004. Comptes Rendus Biologies, 327: 1113–1123.
- CALLEN D.F., THOMPSON A.D., SHEN Y. et al. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. 1993. American Journal of Human Genetics, 52: 922-927.
- CHAKRABORTY R., DANKER-HOPFE. Analysis of population structure: a comparative study of different estimator of Wright’s fixation indices. 1991. In: Handbook of statistics. 8:203-254.



- CHAMBERS, G., MACAVOY, E. Microsatellites: consensus and controversy. 2000. Comparative Biochemistry and Physiology Parte B 126pp: 455-476.
- CHENG HH., LEVIN I., VALLEKO R.L., KHATIB H., DODGSON J.B. & CRITTENDEN L.B. Developmente of a genetic map of the chicken with markers of high utility. 1995. Poultru Science 73: 539-546.
- CHOW S., & HAZAMA K. Universal primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. 1998. Mol. Ecol., 7: 1255-1256.
- CHOW, S. & TAKEYAMA, H. Intron length variation observed in the creatine kinase and ribosomal protein genes of the swordfish *Xiphias gladius*. 1008. Fisheries Science, 64: 397-402.
- CHOW, S. Universal primer for calmodulin gene intron in fish. 1998. Fish. Sci. 64:999-1000.
- CROW, J.F. y KIMURA M. An introduction to population genetics theory. 1970. Harper and Row Publishers Inc New York.
- DEWOODY, J.A. y AVISE J.C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. 2000. Journal of Fish Biology. 56:461-473.
- FALCONE, D.S. y MACKAY T.F.C. Introduction to Quantitative Genetics. 1996. 4<sup>th</sup> Ed. Addison Wesley Longman, Harlow, Essex, UK.
- FERRADA, S.; HERNANDEZ, K.; MONTOYA, R. y GALLEGUILLOS, R. Estudio poblacional del recurso anchoveta (*Engraulis ringens* Jenyns 1982) (Clupeiformes, Engraulidae), mediante análisis de ADN. *Gayana (Conceptc.)* [online]. 2002, vol.66, n.2 [citado 2010-09-05], pp. 243-248. Disponible en: <[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-)

65382002000200022&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0717-6538. doi: 10.4067/S0717-65382002000200022

- GIBBS M., DAWSON D., MCCAMLEY C., WARDLE A.F., ARMOUR J.A.L & BURKE T. Chicken microsatellite markers isolated from libraries enriched for simple tandem repeats. 1997. *Animal Genetics* 28: 401-417.
- HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. 1999. In "Microsatellites: Evolution and Applications" (D.B. Goldstein & C. Schlotterer, eds) (Oxford University Press) pp.1-9.
- HART D.L. & CLARK A.G. *Principles of Population Genetics*. 1989. 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- HASSAN, M., LEMAIRE C., FAUVELOT C., & BONHOMME, F. Seventeen new exon-primed intron-crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish. 2002. *Mol. Ecol. Notes*, 2: 334-340.
- HE, M. y HAYMER D.S. Polymorphic intron sequences detected within and between populations of the Oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) 1997. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90:825-831.
- LANDI M., GAROIA F., PICCINETTI C. & TINTI F. Isolation of polymorphic microsatellite loci from the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. 2005. *Molecular Ecology Notes* 5: 266-268.
- LESSA, E. Rapid Surveying of DNA sequence variation in natural populations. 1992. *Mol. Biol. Evol.* 9:323-330.
- LEUNG, H.; NELSON, R.; LEACH, J. Population structure in plant pathogenic fungi and bacteria. 1993. *Advances in Plant Pathology* 10:157-206.
- LUIKART, G. & ENGLAND P.R. Statistical analysis of microsatellite DNA data. 1999. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 253-256.

- MADISEN L., HOAR DI, HOLROYD CD, CRISP M, HODES ME. DNA banking: the effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *Am. J. Med. Gent.* 1987. 27:379-390.
- MAGOULAS, A., CASTILHO, R., CAETANO, S., MARCATO, S., and PATARNELLO. Mitochondrial DNA reveals a mosaic pattern of phylogeographical structure in Atlantic and Mediterranean populations of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). 2006. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 39: 734–746.
- MAGOULAS, A., TSIMENIDES, N., and ZOURUS, E. Mitochondrial DNA phylogeny and reconstruction of the population history of a species: the case of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*). 1996. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 178–190.
- MENDO J. Stock identification of Peruvian anchoveta (*Engraulis ringens*): morphometric, tagging/recapture, electrophoretic and ecological studie. 1991. Ph D. Thesis, Univ. Bremen, Alemania.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided population. 1973. *Proceeding of the National Academy of Science, USA.* 70: 3321-3323.
- O'REALLY, P.T., CANINO, M.F. BAILEY, K.M., y BENTZEN P. Inverse relationship between  $F_{st}$  and microsatellite polymorphism in the marine fish, walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*): implications for resolving weak population structure. 2004. *Molecular Ecology.* 13: 1799-1814.
- O'BRIEN, S.J. Molecular genome mapping lessons and prospects. 1991. *Curr. Opin. Gent. Dev.* 1:105-111.
- OHRESSER, M., BORSA P., & DELSERT C. Intron length polymorphism at the actin gene locus mac-1: a genetic marker for population studies in the marine

mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk and *M. edulis* L. 1997. Mol. Mar. Biol. Biotechnol, 6: 123-130.

- PALUMBI R. 1996. Nucleic Acids II: The polymerase Chain Reaction. In: Hillis, D., C. Moritz & B. Mable, eds.: Molecular Systematics. pp. 205-247.
- PALUMBI, S., & BAKER C. Contrasting population structure from nuclear and mtDNA of humpback whales. 1994. Mol. Biol. Evol., 11:426-435.
- PAULY, D. and I. TSUKAYAMA. The Peruvian anchovy and its upwelling ecosystem: three decades of change. ICLARM Studies and Reviews 15, 351p. Instituto del Perú (IMARPE), Callao, Perú, Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), GmbH, Eschborn, Federal Republic of Germany; and International Center for Living Aquatic Resources Management (ICLARM), Manila, Philippines.
- PRIMMER, C.R., H. ELLEGREN. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. 1998. Mol. Biol. Evol. 15: 997-1008.
- SCHLOTTERER, C., TAUTZ D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. 1992. Nucleic Acids Research 20(2): 211-215.
- SPANAKIS, E., TSIMENIDES, N., y ZOUROS, E. Genetic differences between populations of sardine, *Sardina pilchardus*, and anchovy, *Engraulis encrasicolus*, in the Aegean and Ionian seas. 1989. Journal of Fish Biology. 35: 417-437.
- SUMMERS, K. y AMOS B. Behavioral ecological and molecular genetic analyses of reproductive strategies in the Amazonian dart-poison frog, *Dendrobates ventrimaculatus*. 1997. Behavioral Ecology. 8:260-267.
- SUNNUCKS, P. WILSON A.C.C., BEHEREGARAY L.B. ZENGER K., FRENCH J., y TAYLOR A.C. SSCP is not so difficult the application and utility of single-

stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. 2000. Mol. Ecol. 9:1699-1710.

- TAKAGI, M., N. TANIGUCHI, D. COOK y R.W. DOYLE. 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species. Fisheries Science, 63(2): 199-204.
- TAUTZ, D. & SCHLOTTETER, C. Simple sequences. 1994. Curr. Opin. Genet. Dev. 4:832-837.
- TAUTZ, D., TRICK, M., & DOVER, G. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. 1986. Nature (London) 322: 652-656.
- TOURIYA A., RAMI M., CATTANEO-BERREBI G., IBANEZ C., AUGROS S., BOISSIN E., DAKKAK A. & BERREBI P. Primers for EPIC amplification of intron sequences for fish and other vertebrate population genetic studies. 2003. BioTechniques 35: 676-682.
- WELLEK, S. Test for establishing compatibility of an observed genotype distribution with Hardy-Weinberg equilibrium in the case of a biallelic locus. 2004. Biometrics. 60:694-703.
- WRIGHT, S. The genetic structure of populations. 1951. Annals of Eugenics 15: 323-354.
- ZARRAONAINDIA I., PARDO M.A., IRIONDO M., MANZANO C. y ESTONBA A. Microsatellite variability in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) calls for further investigation of its genetic structure and biogeography. 2009. ICES Journal of Marine Science, Oxford Journals. 66: 2176-2182

## IX. ANEXOS

---

### IX.1. Resumen presentado en el XV Curso de Verão em Genética, 2010. Universidad de Sao Paulo-Facultad de Medicina. Riberão Preto-Brasil.

#### **Análise do polimorfismo de marcadores EPICs em *Engraulis ringens* “anchoveta peruana”**

Diana E. Rojas Málaga<sup>1</sup>, Daniel S. Oré Chávez<sup>1</sup>, Roger W. Quiroz Bazán<sup>2</sup>, Ricardo M. Fujita Alarcón<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Genética y Biología Molecular, Universidad San Martín de Porres

<sup>2</sup> Laboratorio de Artes y Métodos de Pesca, Universidad Nacional Mayor de San Marcos

\* [faig26@hotmail.com](mailto:faig26@hotmail.com)

Um dos recursos explorados no mar peruano é a anchoveta (*Engraulis ringens*) que ocupa um lugar importante na teia alimentar pelágica no sudeste do Pacífico. É relevante gerar informações de estrutura genética da população para a sua gestão adequada e estes dados ainda não existem. Neste contexto os marcadores moleculares são ferramentas úteis. Devido à falta de marcadores para esta espécie, através da estratégia de amplificação cruzada foram avaliados seis marcadores tipo EPICs (exon-primed intron-crossing) tendo como base que as mutações se acumulam rapidamente nos íntrons e, muitas vezes exibem uma alta variabilidade genética, incluindo o polimorfismo de comprimento. Foram amplificados por PCR os marcadores: creatina cinase íntron 7 (*Ck7*), aldolasa B íntron 2 (*AldoB2*), aldolasa C íntron 1 (*AldoC1*), hormônio de crescimento íntron 5 (*Gh5*), a cadeia leve da miosina íntron 3 (*Mlc3*) e calmodulina íntron 3 (*Cam3*), as condições de amplificação foram modificados para otimizar a reação. Para todos os marcadores, exceto *Gh5*, fragmentos de amplificação de 500-600pb foram obtidos. Estes marcadores são aplicáveis na anchoveta, cada um mostrou diferentes graus de polimorfismo, descobrimos que marcadores como *AldoC*, *Cam3*, *Mlc3* ( $H_o=0.20$  e  $H_e=0.889$ ,  $k=6$ ,  $n=65$ ) e *AldoB* ( $H_o=0.20$  e  $H_e=0.66$ ,  $k=3$ ,  $n=10$ ) são pouco polimórficos e outros como *Ck7* ( $H_o=0.61$  e  $H_e=0.756$ ,  $k=6$ ,  $n=20$ ) tem um alto grau de polimorfismo

tornando-se útil para estudos de diversidade genética. Contudo, é necessário analisar um maior número de indivíduos para fornecer dados conclusivos.

Os EPICs mostram diferentes graus de polimorfismo mas estes permanecem baixos, com exceção de *Ck7*. O próximo passo será a caracterização desse locus para estimar os parâmetros genéticos na população da anchoveta peruana. Da mesma forma provaremos outros marcadores como os microsátélites para ter uma perspectiva melhor de nossa população.

## **IX.2. Resumen presentado en el ICBAR, 2010. Lima-Perú**

### **AMPLIFICACIÓN CRUZADA DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN LA ANCHOVETA PERUANA (*Engraulis ringens*)**

D. Rojas<sup>2</sup>, M. Silva<sup>2</sup>, O. Acosta<sup>1</sup>, D. Oré<sup>1</sup>, F. Villamón<sup>3</sup>, A. Kameya<sup>3</sup>, C. Yamashiro<sup>3</sup>, F. Fernández<sup>3</sup>, A. Chipollini<sup>3</sup>, R. Quiroz<sup>2</sup>, R. Fujita<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Genética y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad San Martín de Porres. Av. Alameda del Corregidor 1531 Urb. Los Sirius, Las Viñas, La Molina, Lima 12.

<sup>2</sup> Laboratorio de Artes y Métodos de Pesca, Facultad de Ciencia Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Cal. Calle Germán Amezaga 375, Lima 01.

<sup>3</sup> Instituto del Mar del Perú, IMARPE. Esquina Gamarra y General Valle S/N Chucuito, Callao.

[faig26@hotmail.com](mailto:faig26@hotmail.com)

La anchoveta peruana (*Engraulis ringens*) es una especie de importancia económica para nuestro país que en el presente es la segunda pesquería más grande del mundo, luego de China. Actualmente existe un incremento constante en las capturas, nuestra industria crece sin tener en cuenta el impacto genético en las poblaciones. En este contexto es relevante generar información de su diversidad genética y estructura genética poblacional para una gestión adecuada. Debido a la falta de marcadores para esta especie se evaluó la aplicabilidad y la diversidad alélica de un panel de cinco marcadores microsátélites mediante la estrategia de amplificación cruzada con la anchoveta europea (*Engraulis encrasicolus*) teniendo en cuenta su conservación entre especies que comparten un

mismo origen evolutivo por lo que es posible su uso entre especies emparentadas. De los cinco locus reportados para *E. encrasicolus*, *Ee10*, *Ee92*, *Ee16*, *Ee6* y *Ee2*, sólo los tres primeros amplificaron en *E. ringens*. El valor promedio de heterocigosidad de los marcadores aplicables es de 0.65. Los microsatélites obtenidos en esta investigación podrán ser usados en estudios de diversidad genética, estructura poblacional, análisis de flujo génico y variación intraespecífica en la anchoveta peruana.

Palabras clave: Amplificación interespecífica, engraulidos, marcadores moleculares.

Fuente de financiamiento: Al proyecto de Interés Nacional (PIN 115) Contrato 060 FINCyT-BID 2008 Presidencia del Consejo de Ministros/ Programa de Ciencia y Tecnología.