



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

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

EVALUACION DE MARCADORES NUCLEARES POR EPIC-PCR Y
AMPLIFICACION CRUZADA PARA ESTUDIOS POBLACIONALES
EN *Merluccius gayi peruanus* EN EL MAR PERUANO.

*Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en
Hidrobiología y Pesquería*

Bach. MAYRA ZELENIA SILVA VALLE

Lima –Perú

2010



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

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA CON MENCIÓN EN HIDROBIOLOGÍA Y PESQUERÍA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

Siendo las 18:05 horas del 21 de julio de 2010, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga con mención en **Hidrobiología y Pesquería** de **MAYRA ZELENA SILVA VALLE**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 012-EAPCB-10, la titulando expuso su tesis: **"EVALUACIÓN DE MARCADORES NUCLEARES POR EPIC-PCR Y AMPLIFICACIÓN CRUZADA PARA ESTUDIOS POBLACIONALES EN *Merluccius gayi peruanus* EN EL MAR PERUANO"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: APROBADO SÓLO SUFICIENTE CON MENCIÓN.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga con mención en **Hidrobiología y Pesquería** a **MAYRA ZELENA SILVA VALLE** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 19:17 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 21 de julio de 2010.

Blgo. LUIS HOYOS M.
(PRESIDENTE)

Blgo. ROGER QUIROZ B.
(ASESOR)

Blga. CARMEN YAMASHIRO G.
(MIEMBRO)

Mg. FERNANDO RETUERTO P.
(MIEMBRO)

Autógrafo
4 3/8/10





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

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

EVALUACION DE MARCADORES NUCLEARES POR EPIC-PCR Y
AMPLIFICACION CRUZADA PARA ESTUDIOS POBLACIONALES
EN *Merluccius gayi peruanus* EN EL MAR PERUANO.

*Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en
Hidrobiología y Pesquería*

Bach. MAYRA ZELENIA SILVA VALLE

Asesor:
Blgo. ROGER QUIROZ BAZAN

Lima –Perú

2010



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

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

EVALUACION DE MARCADORES NUCLEARES POR EPIC-PCR Y
AMPLIFICACION CRUZADA PARA ESTUDIOS POBLACIONALES
EN *Merluccius gayi peruanus* EN EL MAR PERUANO.

*Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en
Hidrobiología y Pesquería*

Bach. MAYRA ZELENA SILVA VALLE

Asesor:
PHD. RICARDO MIGUEL FUJITA ALARCON

Lima –Perú

2010

DEDICATORIA

A mis padres Lorgio y Laura

A mis hermanas Denise y Guisella

A Rony

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Santísima Virgen María que me han iluminado siempre y me ha brindado las fuerzas necesarias para seguir cada día.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas que cooperaron con mi desarrollo profesional.

Al proyecto de investigación “Generación de Marcadores Genéticos para el estudio de la Biodiversidad Marina” FINCYT 2008 (PIN 115)

A mi Asesor el Blgo. Roger Quiroz Bazan – UNMSM por toda la cooperación brindada, por depositar su confianza en mí, por sus enseñanzas, por que sabe escuchar, por esa presión que de alguna u otra manera sirvió para que se llevara a cabo la sustentación de esta tesis de manera “ejecutiva”.

A mi Asesor externo el PHD. Ricardo Fujita Alarcon - USMP por todo su apoyo, por su interés en este trabajo, por su paciencia y ayudarme a combinar la eficiencia y la eficacia en cada prueba realizada.

A la Dra. Maria Luisa Guevara - USMP por su cooperación, por sus sugerencias y por su mano amiga que siempre estará.

Al Master Pedro Romero (El Gran Pipo) – UNMSM por su colaboración en el análisis de datos. Por enseñarme el uso de programas y por cumplir sus promesas. Gracias!

Un agradecimiento muy grande a Daniel Ore por brindarme la oportunidad de participar en el proyecto, por orientarme y por enseñarme “a no rendirme ante los obstáculos ellos deben de rendirse ante uno”.

Al Blgo. Oscar Acosta por la técnica enseñada para la lectura de los geles de poliacrilamida y por sus aportes en el desarrollo de la tesis.

Al Bach. En Ingeniería Biotecnológica Claudio Villegas por su apoyo desinteresado, por prestarme atención, por incentivarme que en cada prueba el resultado debe salir cada vez mejor, por sus valiosas sugerencias y sobre todo por su valiosa amistad.

A todas las personas que trabajan en el Instituto de Genética y Biología Molecular de la Facultad de medicina de la Universidad de San Martín de Porres, por brindarme especialmente, sus consejos, su amistad y su lealtad que hacen del laboratorio un bonito ambiente de trabajo, en especial a Solange, Diana, Verónica (¡gracias por esa gran confusión!), Alberto, Erika y Yanina

A Rony por simplemente ser como es, gracias por caminar a mi lado todo este tiempo y mostrarme en una sonrisa que el amor de verdad puede existir.

A mis amigos especialmente a Willy por su paciencia y ánimos en cada correo electrónico o mensaje de texto.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta tesis. A mis padres Lorgio y Laura, por su ejemplo de lucha y honestidad; a “mis feas lindas” mis hermanas; Denise por su tenacidad y superación; a mi hermana Guisella por su paciencia, inteligencia y generosidad a ellas que son un ejemplo de valentía. A mi abuela Laura y a Erika que me apoya con sus oraciones. ¡Por ellos y para ellos!

INDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCION	11
II. MARCO TEORICO	
2.1. SISTEMÁTICA Y BIOLOGÍA DE <i>Merluccius gayi peruanus</i>	
2.2.1.1. Sistemática	13
2.2.1.2. Distribución	14
2.2.1.3. Morfología y Alimentación	17
2.2.1.4. Crecimiento y Reproducción	18
2.2. MARCADORES MOLECULARES	19
2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa	24
2.3. ESTRATEGIAS	
2.3.1. EPIC-PCR	26
2.3.2. AMPLIFICACION CRUZADA	27
III. HIPOTESIS	28
IV. OBJETIVOS	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Revisión de material biológico	30
5.3. Ubicación geográfica de las muestras analizadas	31
5.4. Marcadores Moleculares	
5.4.1. Marcadores intrónicos por EPIC-PCR	33
5.4.2. Marcadores microsatélites por Amplificación cruzada	34
5.5 Corridas electroforéticas	36

5.6. Registro de datos	37
5.5. Análisis de datos	38
VI. RESULTADOS:	
6.1. Caracterización de los marcadores EPICs	41
6.2. Caracterización del marcador microsatélite Mmerhk9b	43
6.3. Características de los marcadores nucleares en <i>Merluccius gayi peruanus</i>	51
6.4. Características del marcador microsatélite Mmerhk9b por amplificación cruzada) en <i>Merluccius gayi peruanus</i>	52
6.5. Frecuencias alélicas	53
6.6. Frecuencias genotípicas	54
6.7. Coeficiente de endogamia poblacional	55
6.8. Coeficiente de diferenciación genética.	56
VII. DISCUSION DE RESULTADOS	59
VIII. CONCLUSIONES	63
IX. BIBLIOGRAFÍA	64
X. ANEXOS	66
10.1. GRAFICAS	
FRECUENCIAS ALÉLICAS	72
FRECUENCIAS GENOTÍPICAS	75
10.2 PROCEDIMIENTOS	
10.2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	76
10.2.2. PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA:	77
10.2.3. ELECTROFORESIS HORIZONTAL	79
10.1.4. PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA	80
10.1.5. ELECTROFORESIS VERTICAL	81
10.1.6. PREPARACION DE MASTER MIX	82
10.1.7. CONDICIONES DE PCR PARA INTRONES	83
10.1.8. CONDICIONES DE PCR PARA MICROSATELITE	84

RESUMEN

La merluza peruana *Merluccius gayi peruanus* es una especie demersal con una gran importancia económica, necesariamente se deben hacer investigaciones de este tipo con la finalidad de conocer mejor al recurso para poder así tener mejores parámetros y facilitar su mejor aprovechamiento. De la merluza peruana, se posee escasa información acerca del componente genético poblacional. Debido a la carencia de esta información, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar genéticamente las poblacionales de *Merluccius gayi peruanus* (periodo mayo, 2002) usando marcadores nucleares intrónicos: AldoC1 (AldolasaC intron 1), CK7 (Creatin Kinasa intron 7), GH5 (Hormona de Crecimiento intron 5) y Microsatélites (Mmer-hk9b). Las estrategias que se emplearon fueron EPIC-PCR y amplificación cruzada. El análisis estadístico realizado en la presente investigación demostró que las poblaciones estudiadas, de merluza constituyen una sola unidad poblacional.

Palabras claves: Optimización, PCR, marcador microsatélite, marcador EPICs, *Merluccius gayi peruanus*.

ABSTRACT

Peruvian hake *Merluccius gayi peruanus* is a demersal species of great economic importance, necessarily must make such research in order to better understand the resource and to have better parameters and facilitate the best use. For the Peruvian hake, it has little information about the population genetic component. Due to the lack of this information, the purpose of this study was to characterize genetically the population of *Merluccius gayi peruanus* (period May, 2002) using intronic nuclear markers: AldoC1 (AldolaseC intron 1), CK7 (Creatine kinase intron 7), GH5 (Growth hormone intron 5) and microsatellites (MMER-hk9b). The strategies used were EPIC-PCR and cross-amplification. The statistical analysis in this investigation showed that the populations studied, as a single hake population structure.

Keywords: Optimization, PCR, microsatellite marker, marker EPICs, *Merluccius gayi peruanus*.

I. INTRODUCCION

En el Perú la merluza peruana *Merluccius gayi peruanus* es una especie demersal que se distribuye principalmente al norte de los 10°LS, desde aguas someras hasta profundidades superiores a los 500 m. La pesquería de la merluza se inicia en el año 1970 con una flota de barcos arrastreros-factoría, y una flota costera de Paita, obteniendo los mayores desembarques en 1978 con 300 mil toneladas. Los principales núcleos de mayor concentración se ubican normalmente entre los 04 y 07L°S, variando de acuerdo a las condiciones ambientales. En los veranos y otoños se produce una dispersión hacia el sur, mientras que en invierno y primavera se concentra hacia el norte. Si se manifiesta El Niño, la dispersión será mayor y, por el contrario, si el caso corresponde a La Niña, la retracción hacia el norte será más marcada.

Actualmente, se desea realizar estudios de poblaciones en merluza peruana *Merluccius gayi peruanus* en aspectos genéticos, sin embargo, basándonos en que no se ha realizado trabajo alguno se recomienda el uso de técnicas moleculares, específicamente los marcadores intrónicos y microsatélites mediante dos estrategias EPIC-PCR y Amplificación cruzada para así poder evaluar la diversidad genética de la especie.

Al tratarse de uno de los principales recursos de exportación de nuestro país que genera grandes ingresos económicos, necesariamente se deben hacer investigaciones de este tipo con la finalidad de conocer mejor al recurso para poder así tener mejores parámetros y programas de extracción que facilite su mejor aprovechamiento

En el caso de nuestra propuesta se basa en obtener resultados favorables que nos permitirán obtener índices de diversidad genética del recurso *Merluccius gayi*

peruanus por medio de mencionados marcadores nucleares, ya que ha presentado fluctuaciones poblacionales entre 1994 y 1998 donde se elevaron los desembarques, y a partir de 1998 hasta la actualidad, las cifras muestran descensos significativos en los niveles de captura, en comparación a los desembarques logrados en la década de 1970. Por este motivo se plantea la necesidad de estudios que nos informen del actual status de la diversidad genética de este recurso, a manera de obtener un mejor panorama de la dinámica poblacional del mismo, para poder establecer mejores parámetros de captura en la pesquería y realizar posibles mapeos genéticos futuros. El uso de los intrones como marcadores del genoma nuclear se fundamenta en que pertenecen a genes estructurales o funcionales los cuales pueden estar sometidos a procesos de selección, además de ser heredados biparentalmente como lo son también los microsatélites y presentan una alta variabilidad genética, la cual nos permitiría detectar si existen diferencias genéticas significativas en la población.

El impacto se daría de forma directa a la pesquería del recurso, y se llega a determinar las condiciones óptimas para la lectura de los marcadores se podría realizar en un futuro estudios de las poblaciones, la identificación de nuevas estaciones temporales, así como también establecer nuevas temporadas de capturas. Además, el tratamiento del recurso en general cambiaría, y tendrían que fijarse nuevas características en cuanto a su pesquería, y así empezar a aprovechar el recurso y poder aumentar de una manera sostenible los niveles de extracción, con la finalidad de tener mayores ingresos económicos.

II. MARCO TEORICO

2.1. SISTEMÁTICA Y BIOLOGÍA DE *Merluccius gayi peruanus* (Ginsburg, 1954)

2.1.1. Sistemática

El genero *Merluccius* (Rafinesque 1810) es el más diverso de la familia Merlucciidae con 12 especies (Cohen et. al. 1990). Ginsburg (1954) reconoció dos especies en *Merluccius gayi*: *Merluccius gayi gayi* (Guichenot 1848) y *Merluccius gayi peruanus* (Ginsburg, 1954) las cuales habitan aguas de Chile y Perú. Estas son consideradas subespecies según el Registro Mundial de Especies Marinas (**World Register of marine species**). Sus nombres genéricos son Huaycuya Merlango, Merluza, Peje palo, Pescada, Pescadilla, Pelada, Chacho.

La siguiente clasificación corresponde al Registro Mundial de Especies Marinas (**World Register of marine species**):

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Superclase: Gnathostomata

Superclase: Pisces

Clase: Actinopterygii

Orden: Gadiformes

Familia: Merlucciidae

Género: *Merluccius*

Especie: *Merluccius gayi*

Subespecie: *Merluccius gayi peruanus* (merluza peruana)



Fig.1 *Merluccius gayi peruanus* (Ginsburg,1954) - IMARPE

2.1.2. Distribución:

Todas las especies de merluza pueden ser encontradas en el cono sur americano: Argentina, Chile y Perú. En Chile, pasa por los mares de Valparaíso hasta el estrecho de Magallanes. En el sector atlántico está estrechamente relacionada con la corriente de Malvinas. La merluza austral también tiene una población en Nueva Zelanda y la merluza negra puede ser encontrada en el océano Índico. Todas las variedades son explotadas como recurso pesquero de los países donde se encuentran, tanto para el consumo interno como para la exportación al resto del mundo.

La merluza peruana *Merluccius gayi peruanus* (Ginsburg,1954) es una especie demersal cuya distribución latitudinal se identifica entre los 00°30' Sur (Ecuador) hasta los 14°00' Sur (Perú). Las mayores abundancias se han identificado en las latitudes 05° 00' S y 07°00' S, coincidentes con las principales áreas de desove. (Espino & Wosnitza-Mendo 1988) y se encuentra principalmente al norte del Perú. Esta se distribuye entre los 6°S y los 14°S (Espino et.al.1995).

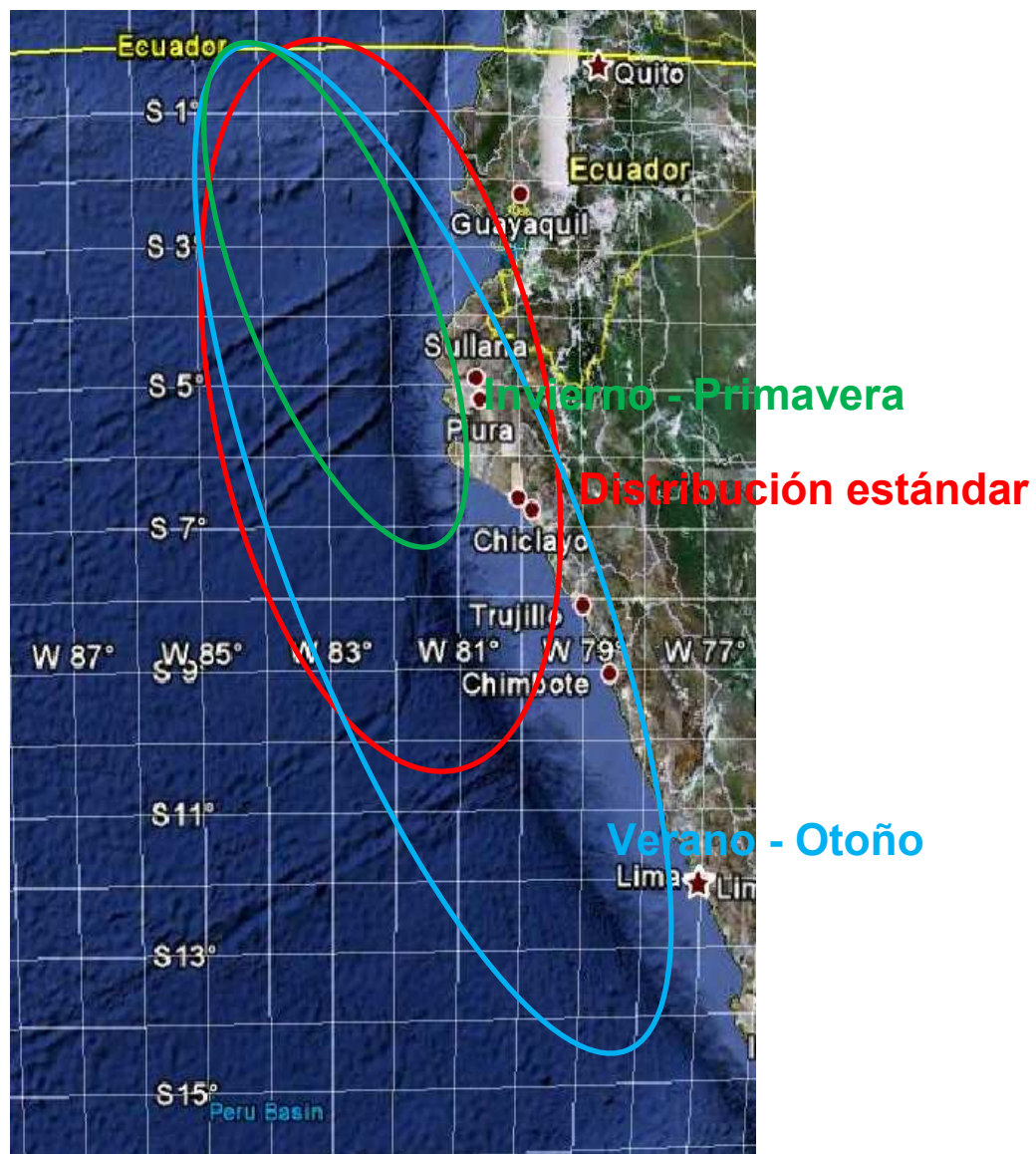


Fig.2 Distribución Geográfica de *Merluccius gayi peruanus* (Ginsburg, 1954). IMARPE

El área habitada por la merluza peruana está determinada por la rama sur de la corriente de Cromwell, que fluye en sentido norte-sur entre 100 y 500 m de profundidad y que se caracteriza tanto por su alta temperatura como por su elevado contenido de oxígeno.

El límite sur de esta corriente se sitúa entre 12° y 14°S en verano-otoño y entre 6° y 8°S en invierno-primavera; no obstante, durante la Oscilación Austral de El Niño (ENSO), dicha corriente puede sobrepasar los 18°S. Esta subespecie soporta una gama de temperaturas de 10° a 22°C y puede tolerar bajas concentraciones de oxígeno.

Presenta una distribución latitudinal por clases de talla: en la zona de mayor concentración (5-7°S) abundan los ejemplares medianos, con una talla media de 40 cm y 4 años de edad; los grandes ejemplares usualmente están al sur de 6°S y se desplazan a zonas más meridionales en cuanto detectan la ENSO. (*FAO Catálogo de Especies para los Fines de la Pesca No 2*)

Cabe mencionar que su distribución y abundancia de la merluza *Merluccius gayi peruanus* (Ginsburg, 1954) ha sido ampliamente estudiada a lo largo de los últimos años los cambios observados en los patrones de distribución, abundancia y estructura poblacional de la merluza peruana los cuales han sido provocados por alteraciones en la dinámica de la extensión Sur de la Corriente de Cromwell. (IMARPE) además que la pesquería en los últimos años ha venido siendo afectada por los cambios ambientales que se han dado sucesivamente durante la década de los 90' (Espino, 2001).

2.1.3. Morfología:

La cabeza es algo deprimida con ojos grandes y boca hendida terminada en punta, la boca esta tapizada de una mucosa negra y provista de dientes irregulares que son pequeños, desiguales y afilados, sobre todo los externos de la mandíbula. Su cuerpo es alargado y generalmente bastante blando, no muy comprimido y cubierto de pequeñas escamas que a veces tienen bordes negros. Aleta dorsal en dos porciones, formadas solamente por radios blandos. Aletas largas, ventrales sub yugulares y caudal truncada; dorso plateado y vientre blanco.

2.1.4. Alimentación:

A nivel mundial, las especies del Género *Merluccius* han sido consideradas como importantes predadores en el ecosistema que habitan. A su vez, el canibalismo es un fenómeno conocido, así como el impacto trófico sobre otras especies, particularmente de importancia pesquera.

Tal es el caso de *M. productus* (Livingston & Bailey, 1985; Livingston et al., 1986), *M. capensis* en Sud África (Macpherson & Roel, 1987; Payne et al., 1987; Punt et al., 1992), *M. hubbsi* en el Océano Atlántico Suroccidental (Angelescu & Prenski, 1987), *M. gayi peruanus* en Perú (Espino & Wosnitza-Mendo, 1989; Castillo et al., 1989), y *M. merluccius* en el Mar Cantábrico (Velasco & Olaso, 1998). (Citado en Cubillos, L. et al., 2007).

La dieta básica de los ejemplares menores de 30 cm la constituyen los crustáceos, Eufausiáceos particularmente; a partir de esta talla, este lugar es ocupado fundamentalmente por la sardina (*Sardinops sagax sagax*) y otros peces (*Ctenosciaena peruviana*, *Engraulis ringens*, *Anchoa nasus* y otros); el consumo de anchoveta peruana (*E. ringens*) se incrementa en los desplazamientos de la merluza hacia el sur, donde hay mayores concentraciones de este recurso; el canibalismo,

practicado por ejemplares de 50 o más cm (a partir de 5 años de edad), representaría el 30% de la mortalidad natural de esta especie. *(FAO Catálogo de Especies para los Fines de la Pesca No 2)*

2.1.5. Crecimiento:

La longitud máxima de los ejemplares de la población peruana, los machos alcanzan 68 cm y las hembras 115 cm. La talla común se encuentra en torno a 50 cm *(FAO Catálogo de Especies para los Fines de la Pesca No 2)*

2.1.6. Reproducción:

Alcanza la primera madurez sexual con una talla de 27,3 cm en machos y 29,9 cm en hembras; la freza es fraccionada y la fecundidad por desove, en hembras con una talla comprendida entre 40 y 70 cm de longitud, se sitúa entre 78 000 y 174 000 ovocitos por hembra. Freza a lo largo de todo el año con un máximo en el invierno austral (agosto-septiembre) y otro, menos importante, en verano. *(FAO Catálogo de Especies para los Fines de la Pesca No 2)*

2.2. MARCADORES MOLECULARES

La pesca industrial ha contribuido considerablemente a la reducción de las poblaciones de peces en aguas marinas (Hauser et al., 2002; Bartron y Scribner, 2004; Ayllon et al., 2006). En Perú, el mar peruano nos brinda una gran riqueza pesquera, siendo uno de los recursos de importancia económica *Merluccius gayi peruanus* (Ginsburg, 1954) que aún no se recupera de su colapso dentro de los vertebrados marinos.

El género *Merluccius* (Rafinesque 1810) es el más diverso de la familia Merlucciidae con 12 especies (Cohen et. al. 1990). Ginsburg (1954) reconoció dos especies en *Merluccius gayi*: *Merluccius gayi gayi* (Guichenot 1848) y *Merluccius gayi peruanus* (Ginsburg, 1954) las cuales habitan aguas de Chile y Perú.

Las hipótesis biogeográficas que explicarían el origen de *Merluccius gayi* se basan en los siguientes autores: Inada (1981), Kabata y Ho (1981), Fernandez (1985), Ho (1990), Stephen y Rosenblatt (1996) mencionan que esta tienen un origen proveniente del océano Atlántico y que migró hacia el Pacífico a través del istmo de Panamá.

Antiguamente, los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general fenotipos de fácil identificación visual, que contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y en la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Sin embargo, la revolución de este plano se inició con el descubrimiento y utilización de los marcadores izoenzimáticos y posteriormente con la llegada de las técnicas modernas de biología molecular las cuales permitieron extraer y purificar el DNA y generar diversos métodos de detección de polimorfismo genético (Stuber; 1992; citado en Nieto, et al. 2005).

Una de estas técnicas fue el desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se volcó a la comprensión de procesos biológicos como en las áreas aplicadas incluyendo estudios genéticos, diagnóstico y mejora (Mullis y Faloona; 1987). Siendo actualmente capaz de amplificar una variedad de genes de un amplio conjunto de taxa dando lugar a una gran cantidad de datos de secuencias de ADN. (Kocher et al., 1989; Palumbi. 1996, citado en France, S.1999). Chile ha venido trabajando con electroforesis de proteínas para detectar parentesco evolutivo en las merluzas de pacifico sur (Galleguillos et.al 1999), y la diferenciación genética en *Merluccius gayi gayi* y *Merluccius gayi peruanus* (Hernandez et.al 2000). En la actualidad se están utilizando las herramientas moleculares con mucha intensidad y las que trabajan con DNA mitocondrial se han ido incrementando. En Chile se ha trabajado con éxito en la genética en *Merluccius gayi gayi* (Galleguillos et.al 2000). Por otra parte, los marcadores genéticos moleculares son instrumentos importantes para el estudio de poblaciones.

El desarrollo de metodologías moleculares ha permitido el análisis del genoma y de las variaciones existentes, tanto en regiones que codifican productos génicos, como en aquellas cuyas funciones aún permanecen desconocidas (Regitano, 2001a).

Los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable. Los marcadores moleculares están incorporados en dos categorías: marcadores tipo I con funciones conocidas cuyas secuencias de nucleótidos se encuentran dentro de los genes (ESTs, intrones, Microsatélites-ESTs), y marcadores tipo II con funciones desconocidas es decir secuencias fuera de los genes (Microsatélites, RAPDs, AP-PCR, DAF, AFLP, Isoenzimas, RFLPS) (O'Brien, 1991; Palumbi et al., 1994; Liu, 2003; Li et al., 2004).

Los marcadores de ADN según su procedencia se clasifican según su procedencia: Marcadores mitocondriales y Marcadores nucleares. El ADN nuclear tiene una herencia biparental en muchos eucariotas, en comparación con el ADN de los organelos (mitocondrias y cloroplastos en las plantas), que usualmente tiene una herencia uniparental.(Sunnucks, 2000).

El uso de los Marcadores Tipo I como los microsatélites e intrones en secuencias ESTs (Expressed sequence tags – etiquetas de secuencias expresadas) son importantes y se utilizan en proyectos para mapeo genético como en el caso del pez bagre de canal, carpa común, carpa silvestre; y el seguimiento de poblaciones tanto en teleósteos como mamíferos. Aunque también se ha usado este método para detectar una rápida variación alélica de los niveles de nucleótidos en mamíferos, aves, insectos, crustáceos. (Hassan et al., 2002).

En las últimas décadas, los análisis por microsatélite emergieron debido a su gran sensibilidad para detectar variaciones genéticas dentro y entre poblaciones. Estos marcadores son sensibles indicadores de la homocigosis resultante de cruzamientos endogámicos y, de esta forma, aplicables a la distinción de pequeñas diferenciaciones poblacionales. Diversos estudios demuestran que este tipo de marcador es ideal para el estudio de la diversidad genética en organismos acuáticos (Yan et al., 2005).

Los microsatélites son conocidos como SSR (Short Sequence Repeat) o STR (Short Tandem Repeat) por sus siglas en inglés, denominados microsatélites en castellano, son secuencias de ADN en las que un fragmento (cuyo tamaño va desde uno hasta seis nucleótidos) se repite de manera consecutiva.

La variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos los cuales se distinguen entre sí por la longitud total del fragmento se emplean como marcadores genéticos para rastrear la herencia familiar o mapear enfermedades en el genoma. (Citado en Nacional Human Genome Research Institute). Generalmente se encuentran en zonas no codificantes del DNA. Son neutros, co-dominantes y poseen una alta tasa de mutación, lo que los hace muy polimórficos. A pesar de esto, la variabilidad que presentan es útil para su uso como marcadores moleculares, con respecto al número de repeticiones, y no de la secuencia repetida.

Los microsatélites presentan ventajas respecto a otros marcadores moleculares, a saber: 1) automatización y elevada reproducción (marcador de PCR), lo que deriva en un bajo costo, 2) codominancia, 3) capacidad para analizar un único locus de posición conocida en el cromosoma y 4) homogénea distribución en el genoma nuclear. (Ornella et. al., 2001) siendo su gran ventaja su alta variación o alto número de alelos, por lo cual son considerados como marcadores muy polimórficos (Van der Werf et al., 1989). El análisis de microsatélites se realiza mediante la amplificación por PCR y la separación de bandas en geles de poliacrilamida.

Por otra parte, un intrón es un fragmento de ADN que está presente en un gen pero que no codifica ningún fragmento de la proteína. Los intrones son eliminados en el proceso de maduración del ARN. Son los exones los fragmentos del gen que codifican aminoácidos de la proteína mientras que los intrones son fragmentos del gen que se encuentran separando los distintos exones y no codifican aminoácidos.

Una de las ventajas más importantes del uso de los intrones es que los cebadores por lo general son “universales” (France et al., 1999). En algunos casos se usó el análisis de ADN para detectar especies distintas de merluza.

Para amplificar intrones, se utilizan primers diseñados en base al flanqueo de exónes en PCR. Este enfoque es conocido como EPIC- PCR (exon primed intron crossing) (Palumbi, 1994, Duda et al., 1999, Bierne et al., 2000). Utilizando ésta técnica, France et al. (1999) realizó un estudio de la variación de intrones en la región nuclear.

Los marcadores codominantes como los microsatélites y las aloenzimas, incluyendo también a las secuencias intrónicas, los heterocigotos pueden ser directamente distinguidos del fenotipo homocigoto dominante (bandas) (Aliaga, 2004). El uso de los intrones como marcadores del genoma nuclear tiende a ser más útil para niveles taxonómicos altos (Richard et al., 2001).

En el presente trabajo se utilizan tanto microsatélites conjuntamente con los intrones debido a la variabilidad que presentan estos ya que acumulan rápidamente mutaciones y una alta variabilidad genética incluyendo un gran polimorfismo en contraste a los exones, constituyéndose en marcadores útiles para el análisis de la estructura poblacional dentro de una especie. De la misma forma, los intrones pueden ser utilizados como marcadores de variación y subdivisión poblacional. El conocimiento de esta estructura poblacional puede proveer una guía valiosa para las estrategias de conservación y manejo de las especies (Hassan et al., 2002).

A nivel genético en el Perú, se ha estudiado la variabilidad genética de la merluza peruana usando variantes polimórficas obtenidas mediante SSCP (Single Strand Conformational Polymorfism) (Oré et al., 2003).

2.2.1. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue introducida por primera vez por Kary Mullis en los años ochenta. Esta técnica es capaz de amplificar una variedad de genes de un amplio conjunto de taxas dando lugar a una gran cantidad de datos de secuencias de ADN (Kocher et al., 1989; Palumbi, S.1996, citado en Aliaga, 2004).

La PCR permite producir un enorme número de copias de una secuencia de ADN específica, normalmente se realiza con un volumen de reacción de 10-100 µL en tubos de PCR que albergan la mezcla (tubos de 0.2-0.5 ml.) que se colocan en el termociclador. Para realizar la técnica se necesitan:

- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), el sustrato para polimerizar nuevo ADN.
- Dos cebadores que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN.
- Iones divalentes. Se suele cloruro de magnesio ($MgCl_2$).
- Una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- ADN polimerasa – Taq polimerasa
- ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.

Ciclos de amplificación:

En la figura 3 se puede observar el esquema general de los ciclos realizado por la PCR que son los siguientes.

- **Desnaturalización:** se separan las dos hebras de las cuales está constituido. Este paso puede realizarse entre 94 - 95 °C.
- **Hibridación:** Alineamiento/Unión del cebador, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 50-65 °C durante 20-40 segundos
- **Extensión:** **Elongación de la cadena**, la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. La temperatura para este paso depende de la ADN polimerasa que usemos. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está en 75-80 °C (comúnmente 72 °C).

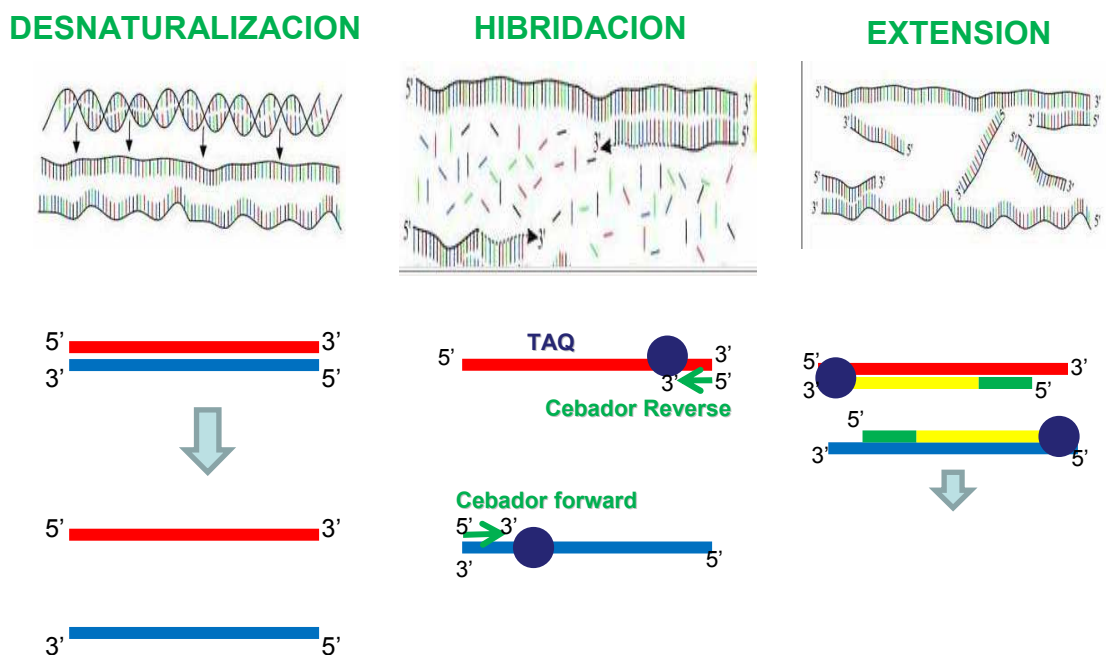


Fig.3 Esquema general de la PCR

2.3. ESTRATEGIAS

2.3.1. EPIC-PCR (EXON PRIMED INTRON CROSSING POLYMERIZATION CHAIN REACTION)

Palumbi y Baker (1994) llamaron EPIC-PCR, exon-primed intron-crossing PCR (France, S. 1999). A la estrategia que amplifica intrones usando cebadores que pueden anclarse a los exones. Se pueden usar los mismo cebadores (cebadores universales) para la amplificación en diferentes especies.

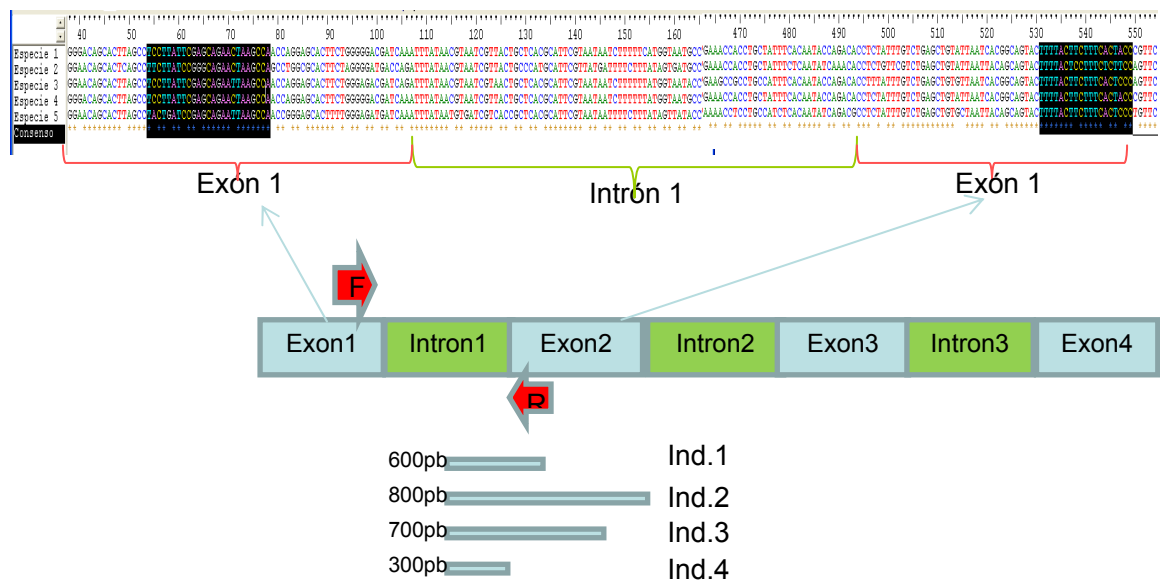


Fig. 4. Representación esquemática de la amplificación por EPIC-PCR.

2.3.2. AMPLIFICACIÓN CRUZADA

Se refiere al uso de cebadores microsatélites de especies genéticamente emparentadas. Basándose en la hipótesis de la corta distancia evolutiva entre géneros que al compartir filogenéticamente el mismo tronco evolutivo han de poseer regiones conservadas.

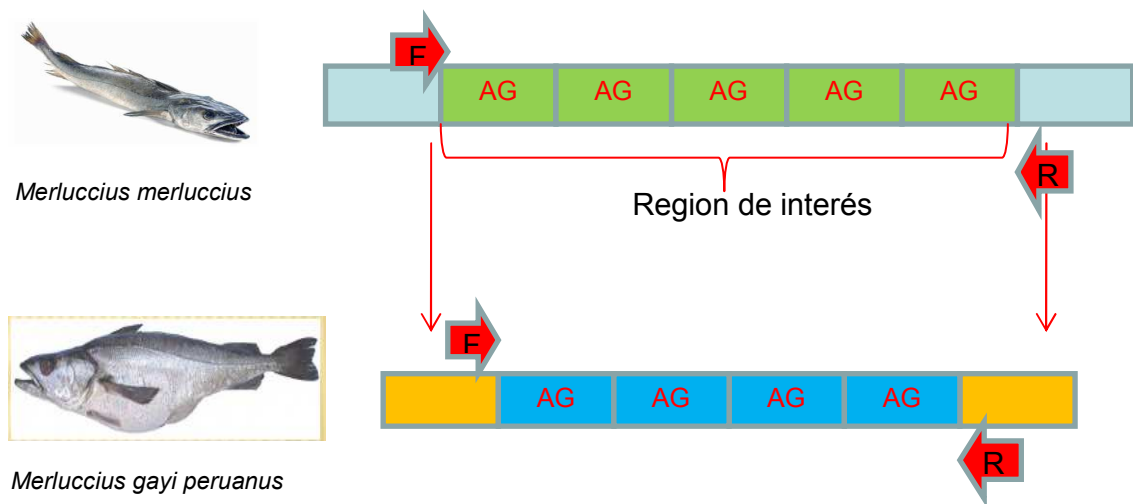


Fig. 5. Representación esquemática de Amplificación Cruzada.

III. HIPOTESIS

- Hipótesis nula:

Los marcadores nucleares (intrones y microsatélites) son útiles para estudios poblacionales de merluza peruana.

- Hipótesis alternativa:

Los marcadores nucleares (intrones y microsatélites) no son útiles para estudios poblacionales de merluza peruana.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar marcadores nucleares (intrones y microsatélites) por EPICs-PCR y por amplificación cruzada para estudios poblacionales en *Merluccius gayi peruanus*.

Objetivos específicos:

- Evaluar la especificidad de las reacciones de amplificación por PCR de los marcadores intronicos en *Merluccius gayi peruanus*.
- Evaluar la especificidad de las reacciones de amplificación por PCR de los marcadores microsatélites en *Merluccius gayi peruanus*.
- Caracterizar genéticamente los loci estudiados.
- Determinar el grado de estructura genético-poblacional

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. COLECTAS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

La obtención del material biológico y la colección de individuos se realizaron a bordo de cruceros de investigación de IMARPE.

Se consideró para este estudio un total de 40 individuos pertenecientes a la especie *Merluccius gayi peruanus*. Las muestras analizadas corresponden al **mes de mayo del año 2002**. Se colectó muestras de tejido hepático de forma aleatoria en cada cala de pesca, las cuales fueron conservadas en alcohol al 96 %.

5.2. ¿CUALES FUERON LOS CRITERIOS REQUERIDOS PARA LA TOMA DE MUESTRAS?

Criterios Geográficos. Se consideró puntos geográficos ubicados en los extremos latitudinales del rango poblacional, basándose en la hipótesis de que encontraremos mayores diferencias genéticas mientras más distantes se hallen los lugares de muestreo, por tal motivo el muestreo considera puntos localizados en el Norte- norte, Norte-sur y otros en la zona media a fin de evidenciar algún tipo de intercambio genético si es que este se produjese.

Criterios Biológicos. El muestreo de individuos fue llevado al azar de entre los cientos de individuos capturados lo cual se considera representativo de ese lance en particular. Se usó principalmente un número de 10 individuos por zona de colecta, ó menos, esto dependiendo de las dificultades de llevar a cabo el muestreo a bordo de la embarcación (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de las muestras analizadas de *Merluccius gayi peruanus*

Codigo	Latitud	Longitud	Fecha	Nºde individuos
L51	5,748	81,225	02/05/2002	10
L16	8.427	79.669	02/05/2002	10
L73	3.549	81.06	02/05/2002	10
L77	3.832	81.016	02/05/2002	10

5.3. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

La figura 3 muestra los lugares de colecta de merluza peruana las cuales se realizaron en el mes de mayo del año 2002. Por otro lado, en la tabla 2 se observa, el código, posición geográfica la cual incluye latitud y longitud, como también el número de individuos colectados por cada lance.



Fig.6 Ubicación geográfica de los lugares de colecta

5.4. MARCADORES MOLECULARES

En esta investigación se utilizaron cebadores de regiones conservadas de exones de diferentes genes, permitiendo la amplificación de 3 intrones. Los cebadores fueron diseñados en base a secuencias exónicas publicadas en diferentes trabajos realizados en muchas especies de peces teleosteos (Hassan, 2002). Para el Microsatélite Los cebadores fueron diseñados en base a secuencias publicadas previamente reportadas en especies genéticamente emparentadas (Moran, 1999).

Tabla 2. Marcadores Moleculares

Marcador	Gen	Cebador	Motivo	Nombre de origen	He		
					Especie	Esperada	Observada
Aldo C (EPIC)	Aldolasa C(Intron 1)	Aldoc1F Aldoc2R	-	Hassan et.al 2002	<i>Signanus rivulatus</i> (Siganidae)	HE= 0,12	No reportada
CK7 (EPIC)	Creatin Kinasa (Intron 7)	CK7F CK7R	-	Hassan et.al 2002	<i>Signanus rivulatus</i> (Siganidae)	No reportada	No reportada
Gh5 (EPIC)	Growth Hormone (Intron 5)	Gh5F Gh6R	-	Hassan et.al 2002	<i>Signanus rivulatus</i> (Siganidae)	No reportada	No reportada
Mmer -hk9b (Microsatelite)	Mmerhk9b	U L	GA	Moran et.al 1999.	<i>Merluccius merluccius</i> (Merlucidae,teleostei)	HE = 0,96	Ho = 0,90

5.4.1. MARCADORES INTRÓNICOS POR EPIC-PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue realizada usando marcadores intrónicos por EPIC-PCR: AldoC1 (*AldolasaC intron 1*), CK7 (Creatin Kinasa intron 7), GH5 (Hormona de Crecimiento intron 5). En la estandarización de la prueba de PCR se realizaron ensayos con 4 individuos; probando una gradiente de concentraciones de Cloruro de Magnesio, las cuales fueron 1mM; 1,5mM; 2,0 mM y 2,5Mm realizando variaciones de la temperatura de hibridación.

Las condiciones de amplificación establecidas para esta prueba tuvieron un volumen final de 25 µl que comprende 0.03U/ml de *taq* polimerasa (Fermentas), 10 X de *Buffer*, 1 mM dNTPs, * mM de MgCl₂, 1 µl de extracto de ADN. *se realizaron ensayos probando una gradiente de concentraciones de Cloruro de Magnesio.

El programa de PCR según Hassan, 2002 fue el siguiente: 95 °C 3 min seguido de 35 ciclos de 94 °C por 12 s, temperatura de hibridación (54 °C - 60 °C) por 12 s y 72 °C por 20 s seguido de una extensión final de 72 °C por 5 s (Tabla 3). Al programa se realizo modificaciones (Tabla 4) como por ejemplo la temperatura de hibridación variara según el marcador.

Tabla 3. Programas de amplificación según Hassan, 2002

Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
95 °C	3 Minutos	
94 °C	12 Segundos	
54 - 60 °C	12 Segundos	35 Ciclos
72 °C	20 Segundos	
72 °C	5 Segundos	

Tabla 4. Programa de amplificación modificado.

Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
4 °C	3 Minutos	
95 °C	3 Minutos	
94 °C	12 Segundos	
54 - 60 °C	12 Segundos	35 Ciclos
72 °C	20 Segundos	
72 °C	5 Segundos	

5.4.2. MARCADOR MICROSATÉLITES POR AMPLIFICACIÓN CRUZADA.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para marcadores microsatélites Mmer-hk9b fue por Amplificación Cruzada se emplearon como cebadores las secuencias publicadas para *Merluccius merluccius* (Moran, 1999). Para determinar las condiciones óptimas de reacción se procedió a realizar ensayos en 6 individuos con distintas concentraciones de dNTPs (0,2Mm y 1Mm) y MgCl₂ (2Mm y 2,5Mm).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 12ul, conteniendo 1XPCR Buffer II NH₄, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM de dNTPs , 0,12 picomoles/UI del cebador seleccionado, 0,03 Unidades de la enzima Taq polimerasa.

El programa de PCR según Moran, 1999 fue el siguiente: 8 °C por 5min con 94 °C por 2 min además de 7 Ciclos de 94 °C por 15 s, temperatura de hibridación de 50 °C por 20 s y 72 °C por 20 s seguido de 23 ciclos de 89 °C por 15 s, temperatura de hibridación de 50 °C por 20 s y 72 °C por 20 s con una extensión final de 2 min con 4 °C. (Tabla 5) Al programa se realizo modificaciones (Tabla 6) como por ejemplo la temperatura de hibridación.

Tabla 5. Programa de amplificación según Moran, 1999.

Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
94 °C	2 Minutos	
94 °C	15 Segundos	
53 °C	20 Segundos	23 Ciclos
72 °C	15 Segundos	
89 °C	15 Segundos	
53 °C	20 Segundos	7 Ciclos
72 °C	15 Segundos	

Tabla 6. Programa de amplificación modificado.

Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
8 °C	5 Minutos	
94 °C	2 Minutos	
94 °C	15 Segundos	
50 °C	20 Segundos	23 Ciclos
72 °C	20 Segundos	
89 °C	15 Segundos	
50 °C	20 Segundos	7 Ciclos
72 °C	20 Segundos	
4 °C	2 Minutos	

5.5. CORRIDAS ELECTROFORÉTICAS

Las migraciones de los productos de amplificación se realizaron en geles de agarosa 2 % en buffer TBE 1X (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico y 83 mM de EDTA) por 30 min, 100V, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en lámpara de UV para verificar la presencia de los mismos.



Fig. 7. Cámara de geles de agarosa

Para los marcadores intrónicos, se realizaron migraciones en geles de poliacrilamida al 6 %, 800 V durante 16 hora 30 min. Por otro lado, para los marcadores microsatélites se realizaron migraciones en geles de poliacrilamida al 6 %, 500 voltios durante 2 horas 30 min.

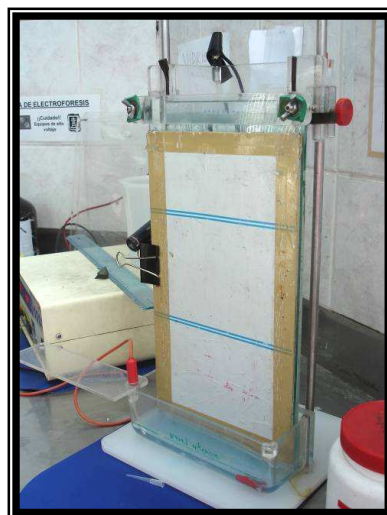


Fig. 8. Geles de Acrilamida denaturantes 20x40



Fig. 9. Geles de Acrilamida denatuentes 20x20

Para determinar el tamaño de los productos de amplificación, se utilizó un producto amplificado de peso molecular aprox. 500 pb (pares de bases) también se empleo el ladder Gene Ruler™ (100pb) y otro producto amplificado de peso molecular de 273 pb (pares de bases).

El revelado de los geles de poliacrilamida se realizó con nitrato de plata.

5.6. REGISTRO DE DATOS

5.6.1. CARACTERIZACION DE GRADO DE POLIMORFISMO EN LOS MARCADORES

Los productos amplificados se corrieron en geles de poliacrilamida en los cuales se realizó la lectura de alelos. Para trabajos futuros en poblaciones se considera como marcador polimórfico útil aquel que presentara varios alelos diferentes en más del 50% de los individuos evaluados.

5.6.2. DETECCION DE HETEROCIGOSIDAD

La merluza peruana es diploide por lo que cada individuo puede tener 2 alelos diferentes (Heterocigoto). En el análisis del gel si se observa una sola banda (los alelos son idénticos) se considera que el individuo es homocigoto para ese marcador. Por otro lado, si observa dos bandas se considera que el individuo es heterocigoto.

5.7. ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis de datos se utilizaron los siguientes paquetes bioinformáticos.

5.7.1. PROGRAMA FSTAT 2.9.3.2 (2001 adaptación de la versión de Goudet, 1995).

Calcula los estadísticos básicos como: El número promedio de alelos por locus (a), riqueza alélica efectiva por locus y por población (r), y diversidad genética de Nei (H). Se calculará el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (índice F_{st}), que representará un indicador de la estructura genética poblacional del recurso. La heterocigosidad permite la medición de la variación genética, es decir medida de individuos heterocigóticos. Se estima calculando la frecuencia de heterocigóticos para cada locus y dividido por el total de loci. Se discutirá si la heterocigosidad observada es a favor o en contra de los homocigotos, y se establecerán cuales serían las posibles causas de lo observado.

5.7.2. PROGRAMA ARLEQUÍN 3.1

Es un programa empleado para el análisis de datos en genética de poblaciones, entre ellos los microsatélites. Tiene implementados una variedad de métodos a nivel intra e inter-población. Se calcula el coeficiente de endogamia poblacional, coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones, análisis de varianza molecular (AMOVA) y la prueba de diferenciación de poblaciones basada entre pares.

- **Coeficiente de endogamia poblacional:**

Wright (1951), definió el índice de fijación F_{is} (i , por individuo, y s , por subpoblación). Este índice mide el déficit total en heterocigotos presentes en el interior de una subpoblación. $F_{is} = (H_s - H_i) / H_s$, donde: H_i es la heterocigosidad promedio observada de un individuo y H_s es la heterocigosidad promedio esperada de la subpoblación.

El coeficiente de correlación de este índice varía entre -1 y $+1$; $F_{is}=0$, cuando las subpoblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg; $F_{is}=1$, la población está únicamente compuesta de homocigotos; $F_{is} = -1$, cuando la población está únicamente compuesta de heterocigotos. (Citado por Aliaga, 2004)

- **Coeficiente de Diferenciación genética entre poblaciones:**

El F_{st} también fue definido por Wright (s, por subpoblación y t, por total), este índice mide la fijación de un alelo diferente por cada subpoblación y mide así el déficit total de heterocigotos en la subpoblación. $F_{st} = (H_t - H_s) / H_t$, donde; H_s es la heterocigosidad promedio esperada de la subpoblación y H_t es la heterocigosidad promedio esperada de la población total. El valor del F_{st} varía entre 0 y 1; para $F_{st} = 0$, las diferentes subpoblaciones se comportan como una sola población; para $F_{st} = 1$, la estructuración es máxima, las subpoblaciones presentan diferentes alelos fijados. (Citado por Aliaga, 2004).

VI. RESULTADOS:

6.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MARCADORES INTRONICOS POR EPIC-PCR

En la estandarización de la prueba de PCR se realizaron ensayos en 4 individuos, probando una gradiente de concentraciones de Cloruro de Magnesio, las cuales fueron 1mM; 1,5mM; 2,0 mM y 2,5mM se trabajo con temperatura de hibridación de 55 °C.

Para AldoC1 (*AldolasaC intron 1*) a una concentración de 2,5 mM de $MgCl_2$ se observó la presencia de bandas en todos los individuos en comparación con las otras concentraciones probadas, a 1 mM de $MgCl_2$ no se observó producto amplificado, y a concentraciones de 1,5 mM y 2 mM solo se observó bandas en tres individuos de los 4 presentes (Fig. 10). Para CK7 (Creatin Kinasa intron 7) a una concentración de 2,5 mM de $MgCl_2$ se observo un producto inespecífico. Sin embargo, para GH5 (Hormona de Crecimiento intron 5) no se observó producto amplificado en ninguna de las condiciones (Fig. 11).

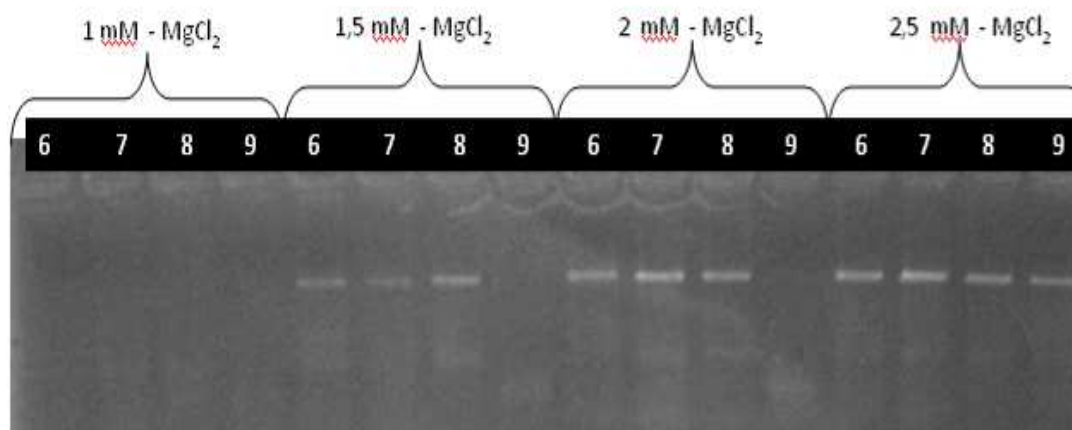
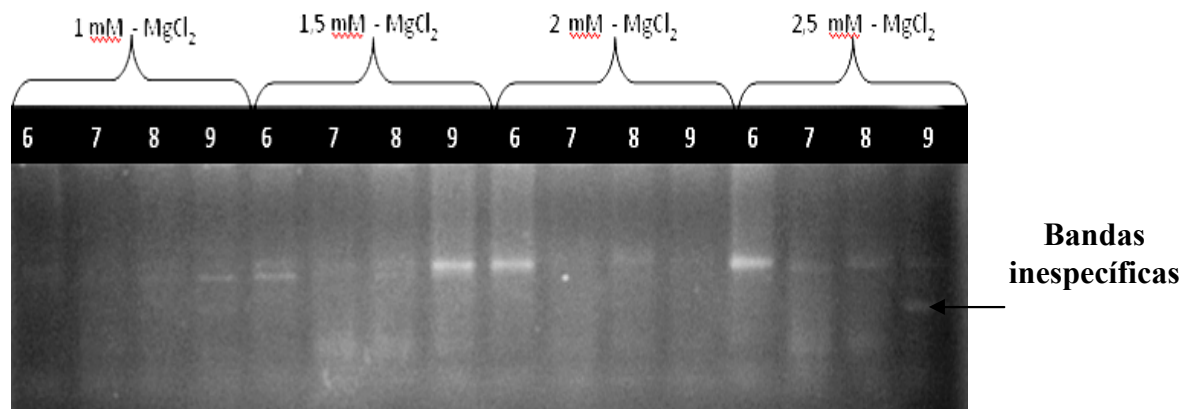


Fig. 10. Amplificación por PCR del marcador AldoC1 (*AldolasaC intron 1*) Gel de agarosa 2%,100v, Temperatura de hibridación de 55 °C. Carriles 1-16: productos de amplificación de la secuencia **AldoC1 (*AldolasaC intron 1*)** a partir de *Merluccius gayi peruanus*.

A.



B.

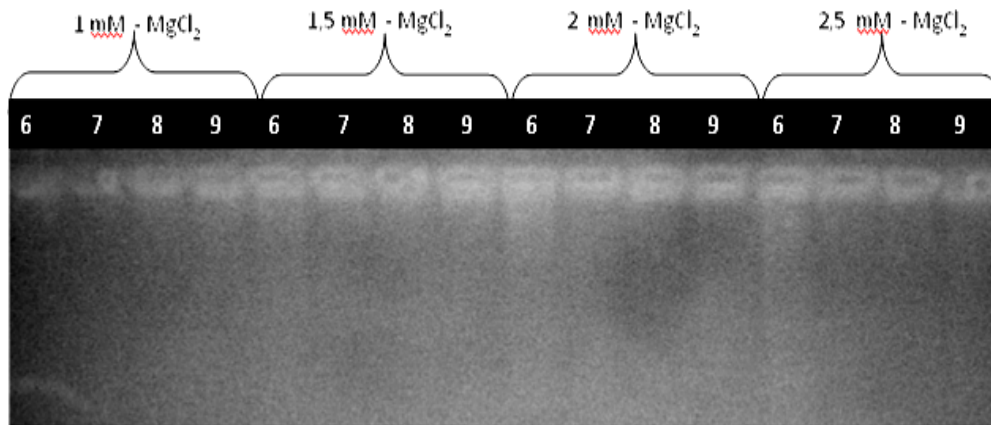


Fig. 11. Amplificación por PCR del marcador CK7 (*Creatin Kinasa intron 7*), GH5 (*Hormona de Crecimiento intron 5*). Comparando 4 concentraciones de $MgCl_2$

A: Gel de agarosa 2%, 100v, Temperatura de hibridación de 55 °C, carriles 1-16: productos de amplificación de la secuencia CK7 (*Creatin Kinasa intron 7*) a partir de *Merluccius gayi peruanus*. **B:** Gel de agarosa 2%, 100v, Temperatura de hibridación de 55 °C. Carriles 1-16: productos de amplificación de la secuencia GH5 (*Hormona de Crecimiento intron 5*) a partir de *Merluccius gayi peruanus*.

Debido a la presencia de artefactos o productos con bandas inespecíficas para CK7 (Creatin Kinasa intron 7) y a la ausencia de ellos como es el caso de GH5 (Hormona de Crecimiento intron 5) se decidió considerarlos como resultados negativos.

En comparación para el marcador AldoC1 (*AldolasaC intron 1*) que bajo condiciones de 55 °C todos sus individuos amplificaron pero con algunas inespecificidades se decidió aumentar la temperatura de hibridación a 60 °C, con la siguiente prueba se obtuvo bandas definidas, sin la presencia de alguna inespecificidad (Fig. 12).

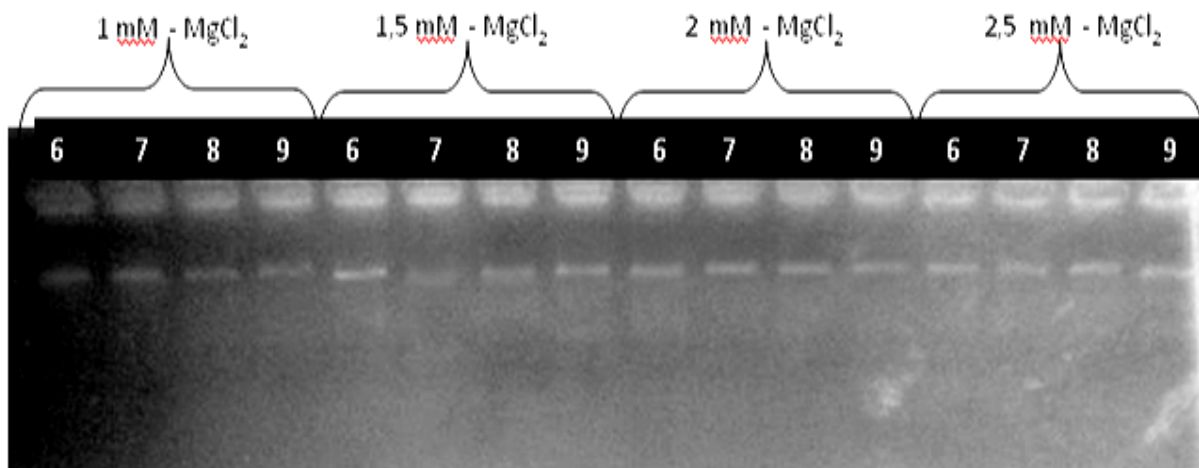


Fig. 12. Amplificación por PCR del marcador AldoC1 (*AldolasaC intron 1*) Comparando 4 concentraciones de MgCl₂. Gel de agarosa 2%, 100v. Temperatura de hibridación de 60 °C. Carriles 1-16: productos de amplificación de la secuencia **AldoC1** (*AldolasaC intron 1*) a partir de *Merluccius gayi peruanus*.

6.1.1. Perfiles del marcador AldoC1 (*AldolasaC intron 1*)

El marcador AldoC1 (*AldolasaC intron 1*) es analizado en geles de poliacrilamida al 6 %, 800 V, durante 16 horas 30 min y luego revelado con la tinción de nitrato de plata. El análisis de los lances 77 y 73 muestran que la mayor parte de individuos presentan el alelo 1 (marcador poco polimórfico) y que son mayoritariamente homocigotos, por consiguiente no se realizó ningún análisis estadístico.



Fig. 13. Amplificación por PCR del marcador AldoC1 (*AldolasaC intron 1*). Gel de poliacrilamida 6%,800v productos de amplificación de la secuencia **AldoC1** (*AldolasaC intron 1*) a partir de *Merluccius gayi peruanus* de los lances 77 y 73. RT8 y RT7 son Controles alelos que se encuentran en orden que se utilizaron como regla para la obtención de alelos nuevos.

6.2. CARACTERIZACIÓN DEL MARCADOR MICROSATÉLITE Mmer-hk9b POR AMPLIFICACION CRUZADA.

Se estandarizó la amplificación del marcador Mmerhk9b con el ADN de 6 individuos; comparando dos concentraciones de cloruro de magnesio de 2 mM y 2.5 mM ; así como 2 concentraciones de dNTPs de 0.2 mM y 1 Mm. Se observó el resultado en geles de agarosa (2 %,100 v,45 min) , obteniéndose mejores resultados en una concentración final de dNTPs de 1 mM y una concentración de cloruro de magnesio de 2.5 mM. (Fig. 14 y Fig.15)

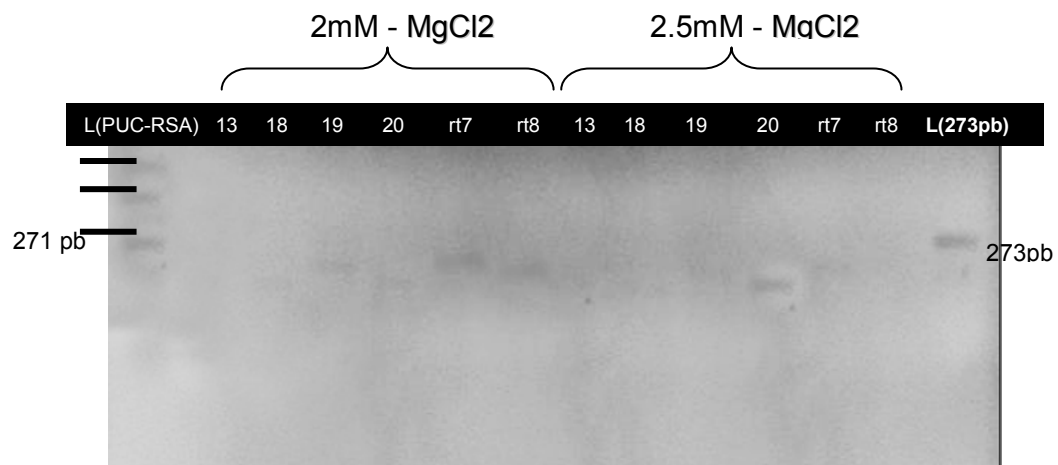


Fig. 14. Amplificación por PCR del marcador microsatélite Mmer-hk9b comparando 2 concentraciones de dNTPs. **Concentración de dNTPs de 0.2mM** Gel de agarosa 2% 100v, carril 1: marcador de peso molecular (PUC-RSA); carriles 2-7: productos de amplificación de la secuencia Mmer-hk9b a partir de *Merluccius gayi peruanus* con concentración de MgCl₂ 2 mM. Carriles 7-12: productos de amplificación de la secuencia Mmer-hk9b a partir de *Merluccius gayi peruanus* con concentración de MgCl₂ 2.5 mM. Carril 13: marcador de peso molecular 273pb.

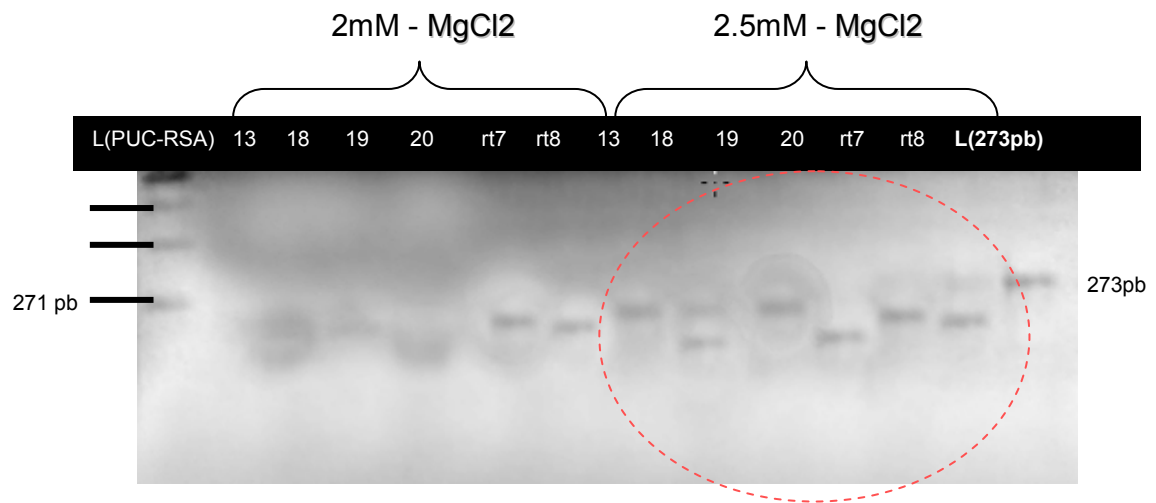


Fig. 15. Amplificación por PCR del marcador microsatélite Mmer-hk9b comparando 2 concentraciones de dNTPs. **Concentración de dNTPs de 1mM** - Gel de agarosa 2%,100v, carril 1: marcador de peso molecular (PUC-RSA). Carriles 2-7: productos de amplificación de la secuencia Mmer-hk9b a partir de *Merluccius gayi peruanus* con concentración de MgCl₂ 2 mM. Carriles 7-12: productos de amplificación de la secuencia Mmer-hk9b a partir de *Merluccius gayi peruanus* con concentración de MgCl₂ 2.5 mM. Carril 13: marcador de peso molecular 273pb.

6.2.1 PERFILES DEL MICROSATÉLITE MMERHK9B

Se trabajo inicialmente con 20 individuos tanto en geles de agarosa y poliacrilamida, como se observó una variedad de alelos se decidió emplear los 40 individuos de los 4 lances estudiados pertenecientes al II Crucero- sept.2002, de los cuales 37 de ellos amplificaron y se visualizaron los productos de PCR en geles de agarosa (2 %, 100 v, 45 min) y posteriormente en geles de acrilamida (6 %,500 v, 2h 30 min).

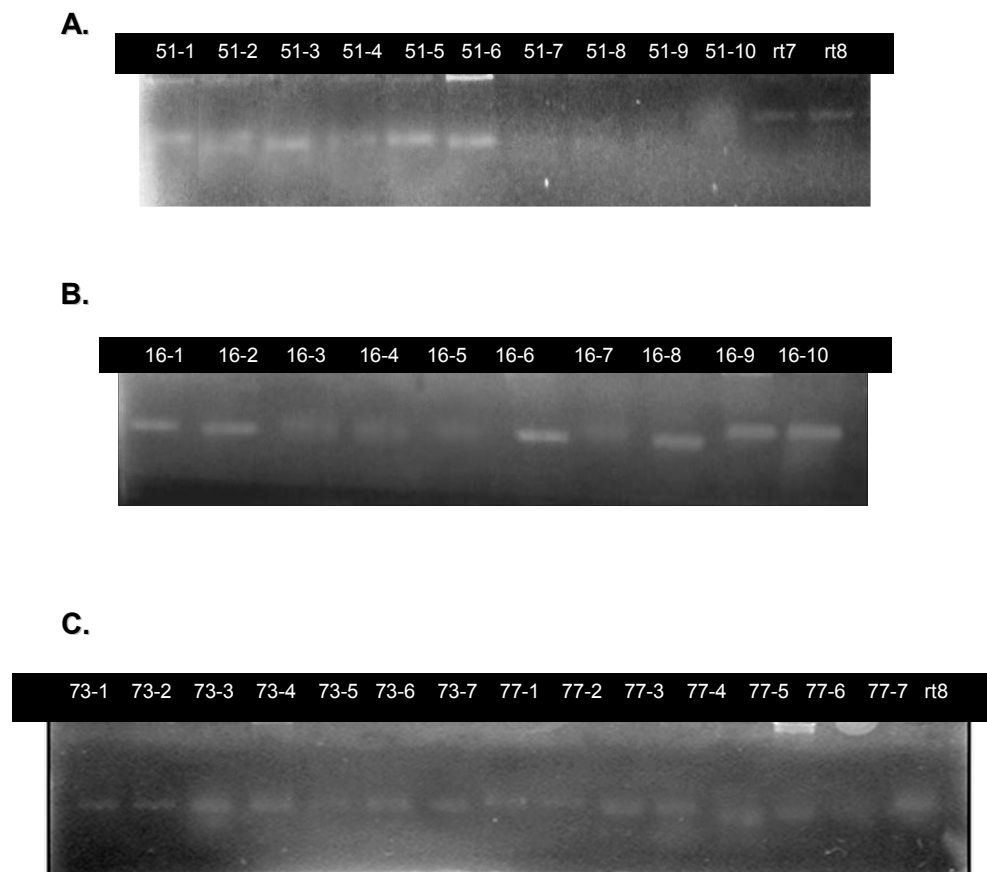
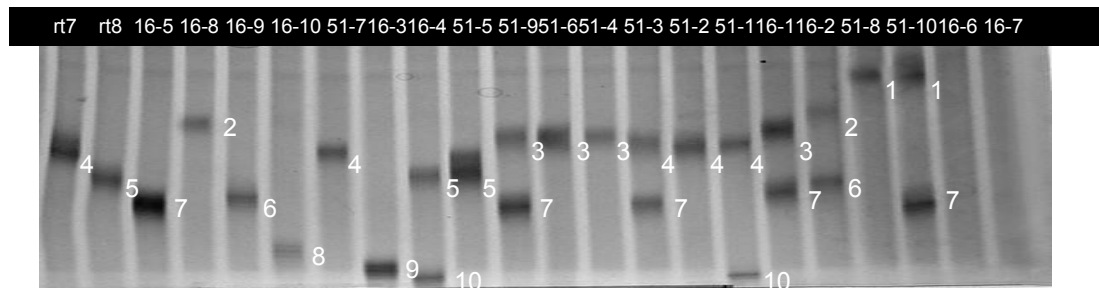


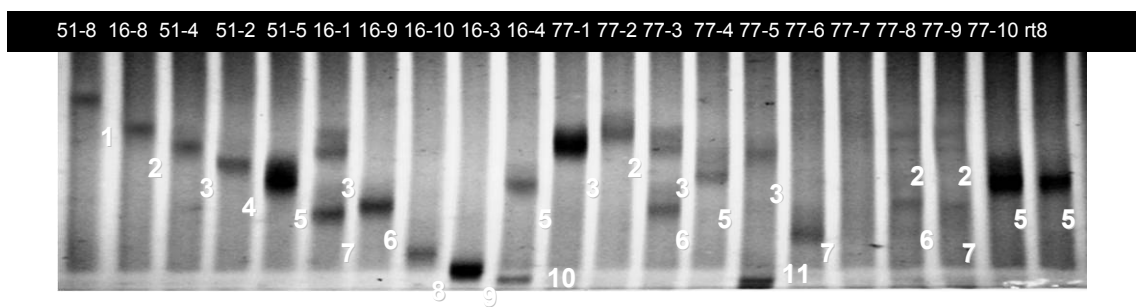
Fig. 16. Amplificación por PCR del marcador microsatélite Mmer-hk9b en geles de agarosa **A:** Gel de agarosa 2%,100v, productos de amplificación de la secuencia Mmer-hk9b a partir de *Merluccius gayi peruanus* del lance 51. **B:** Gel de agarosa 2%,100v, productos de amplificación de la secuencia Mmer-hk9b a partir de *Merluccius gayi peruanus* del lance 16. **C:** Gel de agarosa 2%,100v, productos de amplificación de la secuencia Mmer-hk9b a partir de *Merluccius gayi peruanus* de los lances 73 y 77.

Se realizó la visualización con mayor resolución en geles de acrilamida (Fig.17) de donde se obtuvieron un total de 12 alelos, se hizo un esquema con los individuos que presentaban *alelos característicos* de los cuales se hizo una regla y así obtener los mismos o nuevos alelos a medida que se leían los geles de nuevas poblaciones (Fig.20).

A.



B.



C.

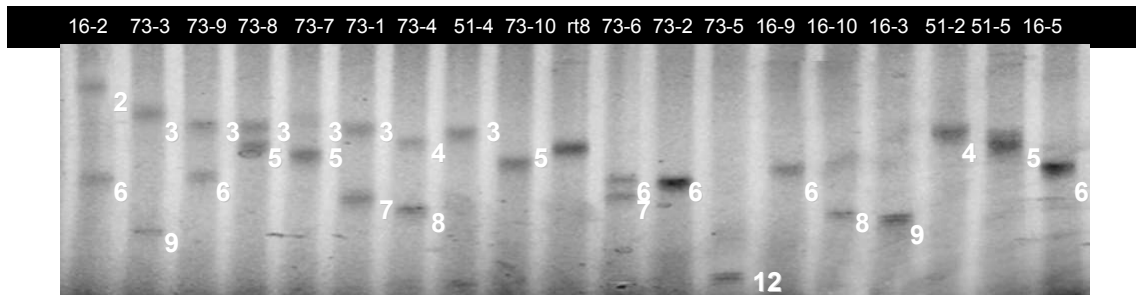


Fig.17. Amplificación por PCR del marcador microsatélite Mmer-hk9b. En geles de acrilamida
A: Gel de acrilamida 6%, 500v productos de amplificación de la secuencia Mmer-hk9b a partir de *Merluccius gayi peruanus* de los lances 51 y 16. **B:** Gel de acrilamida 6%, 500v productos de amplificación de la secuencia Mmer-hk9b a partir de *Merluccius gayi peruanus* con controles y lance 77. **C:** Gel de acrilamida 6%, 500v productos de amplificación de la secuencia Mmer-hk9b a partir de *Merluccius gayi peruanus* con controles y lance 73.

Se eligieron individuos que presentaban un *alelo característico*, los cuales fueron visualizados en geles de agarosa (2%, 100 v, 45 min) (Fig.18) y posteriormente en geles de poliacrilamida (6%, 500 v, 2h 30 min) (Fig. 19). Los amplicones se encontraban en un rango de 100-200pb teniendo como ladder el Gen Ruler™ 100pb Fermentas.



Fig.18. Gel de agarosa 2%,100v, productos de amplificación de la secuencia Mmer-hk9b a partir de *Merluccius gayi peruanus*

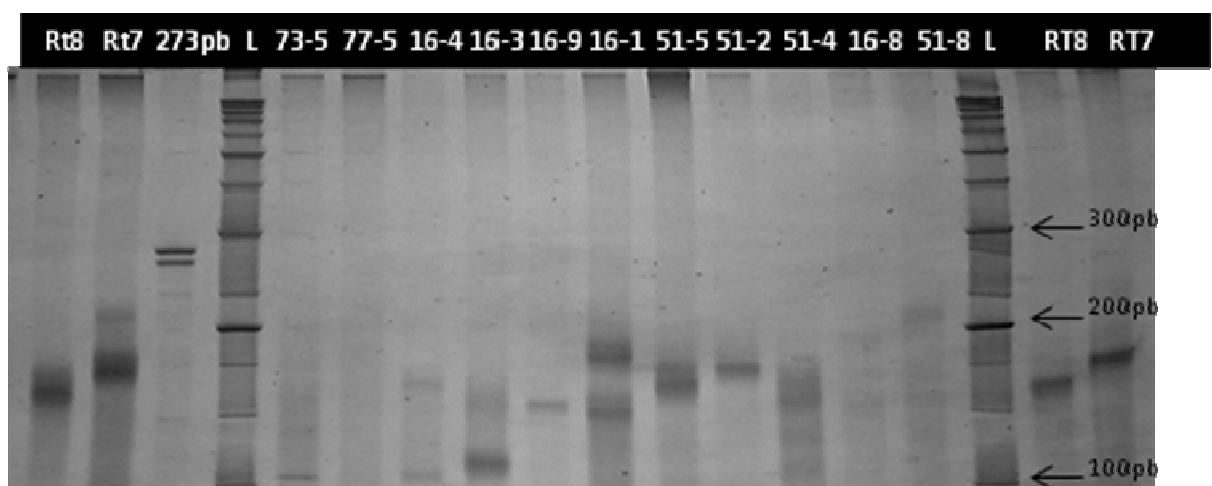


Fig.19. Gel de acrilamida 6%,500v, productos de amplificación de la secuencia Mmer-hk9b a partir de *Merluccius gayi peruanus*

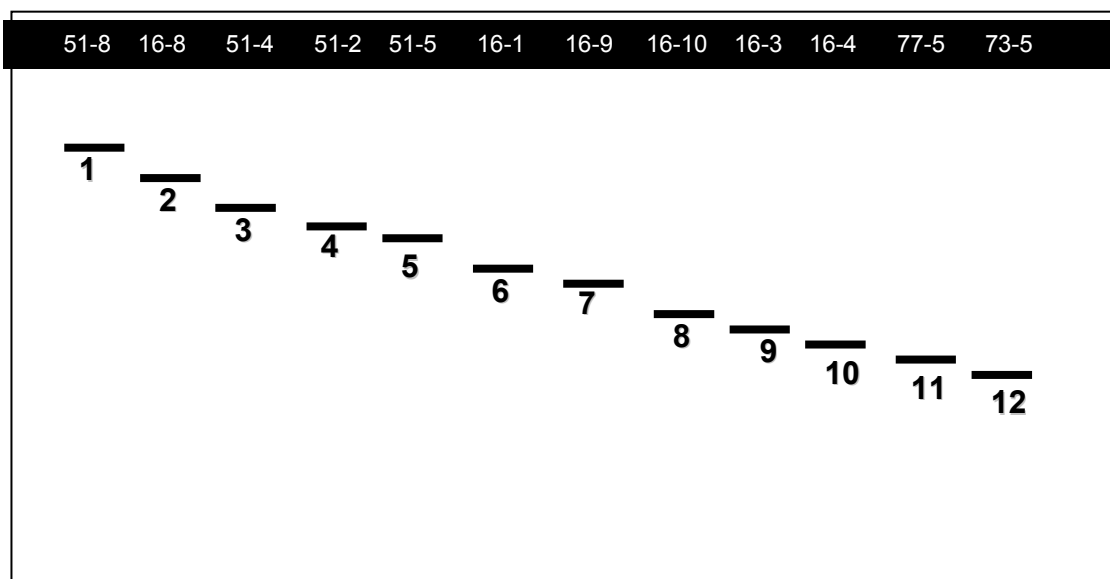


Fig.20. Representación esquemática de los diferentes perfiles obtenidos en las poblaciones de *Merluccius gayi peruanus* para el locus Mmer-hk9b.

Tabla 7. Optimización por PCR de los marcadores moleculares

Marcador	Tipo	[MgCl ₂] Mm	[dNTPs]	T °C de hibridación
Aldo C	Epic	2,5 mM	0,16 mM	60 °C
Mmer -hk9b	Microsatelite	2,5 mM	1 mM	50 °C

6.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS MARCADORES NUCLEARES (INTRONES POR EPIC- PCR Y MICROSATÉLITES POR AMPLIFICACIÓN CRUZADA) EN *Merluccius gayi peruanus*

El locus Aldo C presento 2 alelos en 16 individuos, este locus permitió diferenciar 2 genotipos considerándose como un marcador con bajo nivel de polimorfismo debido a que su heterocigocidad observada es de 6.3%.

El locus Mmer - hk9b presento 12 alelos en 37 individuos, este locus permitió diferenciar 23 genotipos considerándose como un marcador con un alto nivel de polimorfismo debido a que su heterocigocidad observada es de 51.4%.

Tabla 8. Características de los marcadores (Intrones y Microsatélites) en *Merluccius gayi peruanus*.

Tipo	Marcador	Tamaño (pb)	Nº individuos	Nº alelos	Ho	He	Especie
Epic	Aldo C (intron 1)	500pb	16	2	0.063	0.061	<i>Merluccius gayi peruanus</i>
Microsatelite	Mmerhk9b	100-200pb	37	12	0.514	0.874	<i>Merluccius gayi peruanus</i>

pb. Pares de bases
Significancia a (*) $p < 5\%$.

6.4. CARACTERÍSTICAS DEL MARCADOR MICROSATÉLITE Mmerhk9b POR AMPLIFICACIÓN CRUZADA) EN *Merluccius gayi peruanus*

Después de haber estudiado los cuatro lances como un todo se decidió analizarlos de manera independiente. (Tabla 7). Se observa por otro lado que el alelo 4 es el más representativo en el lance 51, el alelo 2,6 y 7 en el lance 16, el alelo 3 para el lance 73 y para el alelo 2,3 y 6 para el lance 77. (Tabla 8)

Tabla 9. Características del marcador Microsatélite Mmer -hk9b en *Merluccius gayi peruanus*.

Poblaciones	Lance51	Lance 16	Lance 73	Lance 71
Numero de alelos(N)	6	8	8	6
Heterocigosidad esperada(He)	0.83158	0.90833	0.87368	0.86275
Heterocigosidad observada(Ho)	0.40000	0.37500	0.70000	0.55556
Pvalor	0.00644	0.00000	0.17139	0.00920

Significancia a (*) $p < 5\%$.

Tabla 10. Alelos por población

Según lance	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	A ₉	A ₁₀	A ₁₁	A ₁₂
Lance 51 Centro	2	0	3	4	1	0	3	0	0	1	0	0
Lance 16 Sur	0	2	1	0	1	2	2	1	1	1	0	0
Lance73 Norte	0	0	5	1	3	3	2	1	1	0	0	1
Lance 77 Norte	0	3	3	0	2	3	2	0	0	0	1	0

6.5. FRECUENCIAS ALELICAS

En los 4 lances se encontraron 12 alelos de los cuales 6 alelos diferentes se encontraron en el Lance 51 (N=10 individuos) y el Lance 77 (N=9 individuos), por otro lado 8 alelos diferentes se encontraron en el Lance 16 (N=8 individuos) y Lance 73 (N=10 individuos). El patrón de diferenciación alélica intra e interpoblacional ha sido analizado en estos lances con la finalidad de determinar el grado de divergencia genética en relación con las zonas de captura. En la cual se observó que los cuatro lances comparten alelos como es el caso del alelo 7, alelo 5 y alelo 3 el cual se encuentra en el lance 51 con una frecuencia de 25 %, en el lance 16 con una frecuencia de 9%, en el lance 73 con una frecuencia de 28 % y en el lance 77 con una frecuencia de 22% esto es posible debido al flujo génico presente en los cuatro lances (Ver Fig.21).

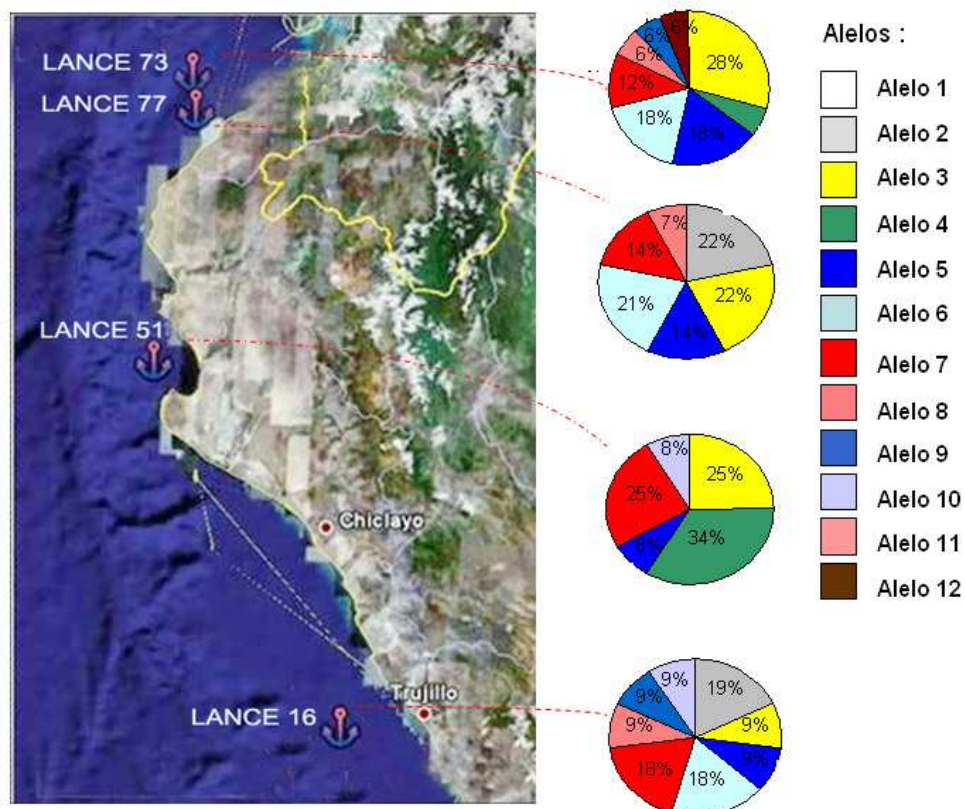


Fig.21. Frecuencias alélicas por lance

6.6. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

En la grafica se puede observar que según el genotipo la mayoría de los individuos son homocigotos.

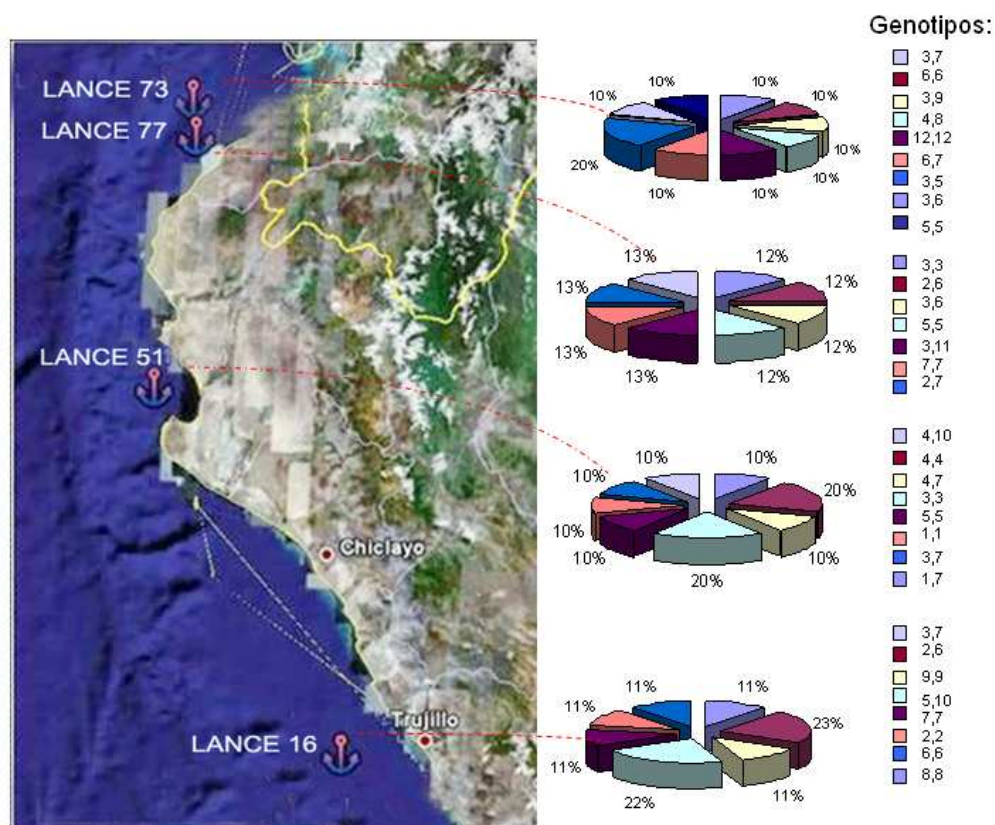


Fig.22. Frecuencias genotípicas por lance

En el análisis de diversidad genética para el locus Mmer-hk9b con respecto a los grupos estudiados grupo I(Lance 51) fue de 0,856, el grupo II(Lance 16) fue de 0,946, el grupo III (Lance 73) fue de 0,883 y el grupo VI (Lance 77) fue de 0,882. Siendo el grupo II (Lance 16) la que presenta una mayor tasa de diversidad genética aproximadamente un 94,6 %.

Tabla 11: Diversidad genética por locus y por población:

Loc-1	Lance51	Lance16	Lance73	Lance77
Locus (Mmer-hk9b)	0.856	0.946	0.883	0.882

6.7. COEFICIENTE DE ENDOGAMIA POBLACIONAL

Fis mostró los siguientes resultados: 0.532 para el Lance 51, 0.604 en el Lance 16 , 0.208 en el Lance 73 y 0.370 en el Lance 77, observándose un desequilibrio de Hardy-Weinberg el cual no es significativo en cada una de las poblaciones.

Coeficiente de endogamia poblacional - FIS

Lance 16		0.604
Lance 51		0.532
Lance 77		0.370
Lance 73		0.208

-1 = Puros heterocigotos
0 = HW
1 = Endogamia total



Fig.22. Valores del coeficiente de endogamia poblacional

6.8. COEFICIENTE DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA.

En relación con el valor del índice F_{ST} , no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones esto quiere decir que si existen diferencias en el valor F_{ST} pero no alcanzan la significancia del estadístico ($p > 5\%$). Los valores se encuentran en el intervalo cercano a 0 lo que se genéticamente se interpreta que los cuatro lances conforman una sola unidad poblacional.

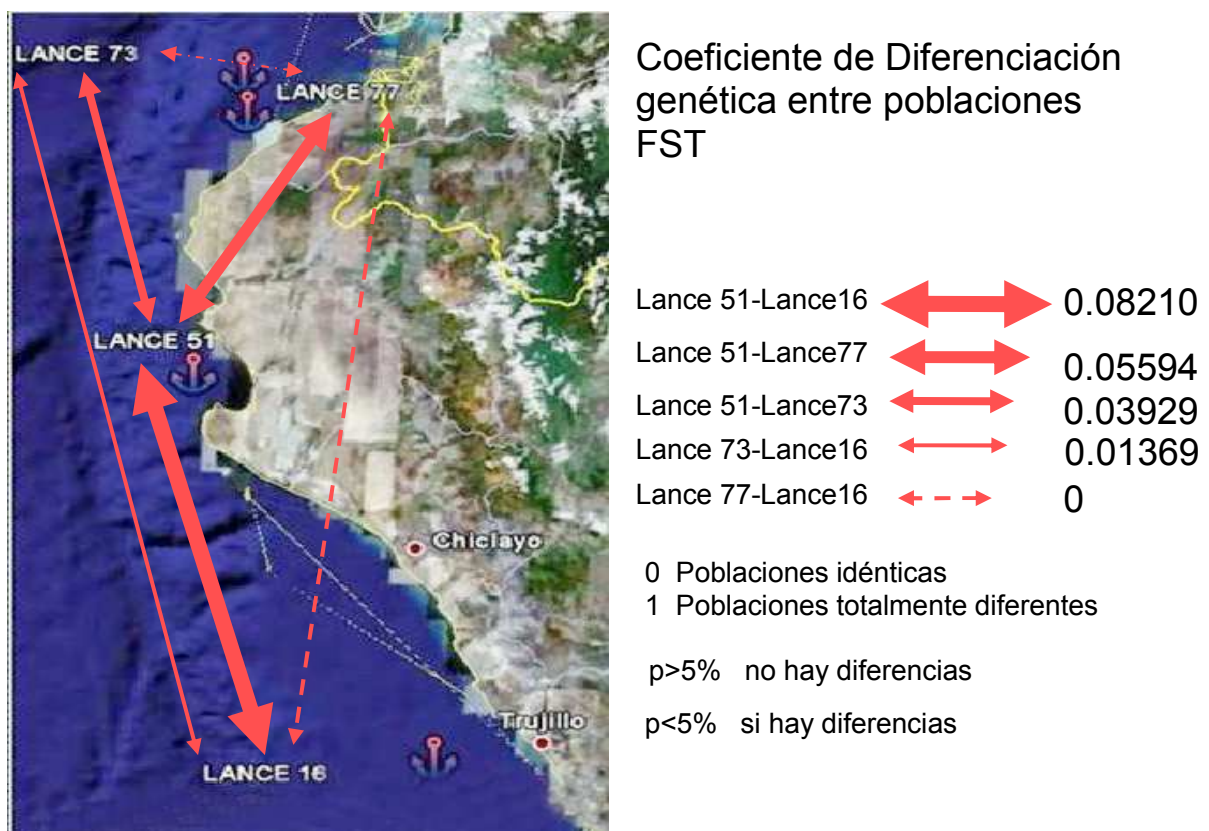


Fig.23. Valores del coeficiente de diferenciación genética

Según los coeficientes analizados en la presente investigación los cuatro lances conforman una sola unidad poblacional en los cuales existe un constante flujo.

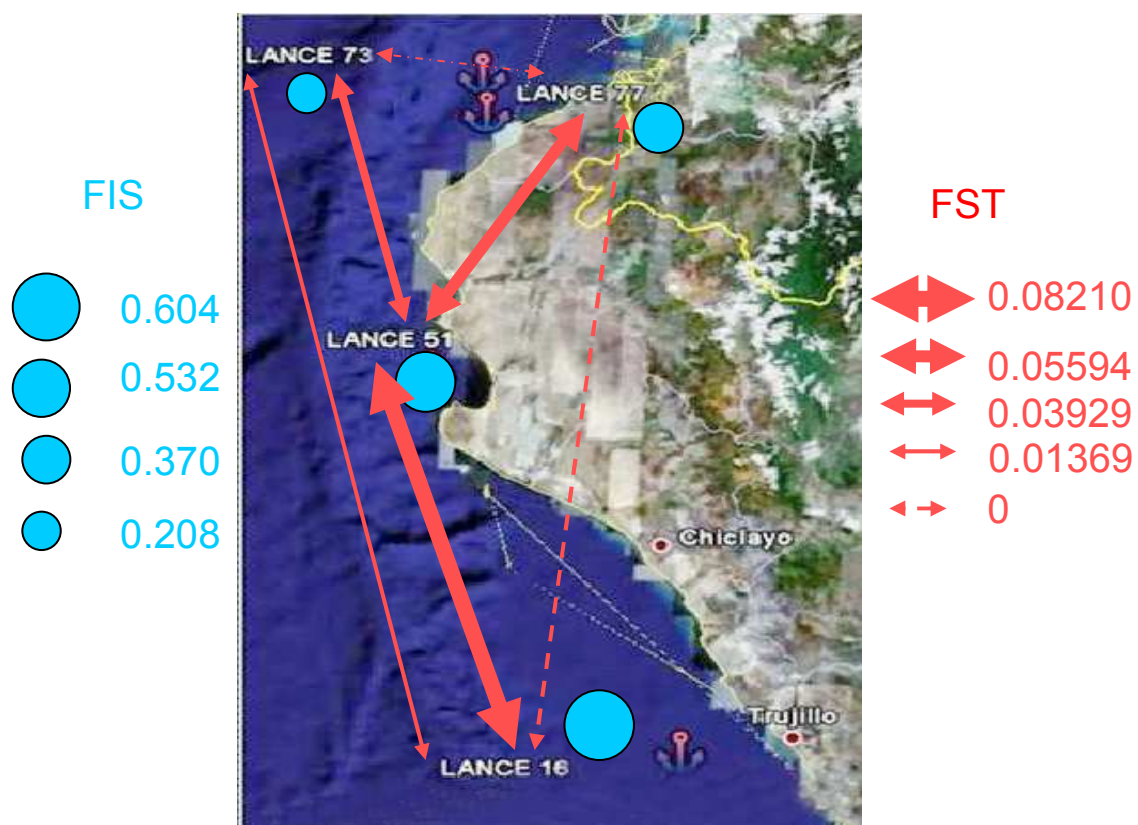


Fig.24. Valores de los coeficientes FIS y FST

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) reveló que el 96.14 % del total de varianza contabiliza para variaciones dentro de individuos, mientras que el 5.87 % restante se debe a diferencias entre individuos (Tabla 11).

Tabla 12: Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las 4 zonas de colecta de Merluza peruana *Merluccius gayi peruanus*

Origen de variación	V	%
Entre grupos	0,02647	5,87
Entre poblaciones	-0,00908	-2,01
Dentro de poblaciones	0,43351	96,14

*FST=0.03857 (P-value = 0.34897+-0.01638 en 1023 permutaciones)

VII. DISCUSION DE RESULTADOS

Los marcadores de ADN han demostrado su gran aptitud en el estudio de la diversidad genética a niveles intraespecífico e interespecífico (Karp y Edwards, 1997). Estos marcadores tienen la capacidad de identificar con certeza una variedad sin recurrir al estudio de muchos caracteres (Rallo et al., 2005).

La investigación realizada ha empleado dos estrategias EPIC-PCR y Amplificación Cruzada por PCR. La presente tesis es la primera investigación que emplea la técnica del EPIC-PCR, en poblaciones de *Merluccius gayi peruanus* distribuidas en la costa norte peruana, esta técnica anteriormente ha sido empleada en mamíferos (Palumbi y Baker, 1994), aves (Heslewood et al., 1998), insectos (Gomulski et al., 1998; He y Haymer, 1999), crustáceos (France et al., 1999; Bierne et al., 2000;), moluscos (Corte-Real et al, 1994; Daguin et al, 2001) y peces teleósteos (Hassan et al. 2002).

Los intrones acumulan rápidamente mutaciones en contraste a los exones, presentando una alta variabilidad genética (Palumbi, 1995) constituyéndose en marcadores útiles para el análisis de la estructura poblacional dentro de una especie (Aliaga, 2004).

Por otro lado en el desarrollo de la investigación se obtuvo para el marcador Aldolasa C (intron 1 marcador Aldo C) un máximo de 2 alelos en 16 individuos considerándose un marcador con bajo nivel de polimorfismo debido a que la frecuencia del alelo más frecuente, el alelo 1, es de 0.97. En el estudio realizado por Hassan (2002) en las especies de peces *Siganus rivulatus*($N=137$, $N_a=4$); *Siganus luridus* ($N=126$, $N_a=2$) *Dicentrarchus labrax* ($N=951$, $N_a=3$). Encontrándose resultados similares. Hasta el momento pareciera que solo presenta un solo locus.

Cabe resaltar que los microsatélites poseen atributos que los hacen adecuados marcadores genéticos en investigaciones pesqueras. Los microsatélites tienen un alto nivel de neutralidad en comparación a las aloenzimas probablemente al menos un 90% de estos (Estoup et al.1998).

En contraste, mediante el análisis con microsatélites, el marcador Mmer hk9b muestra mayor número de alelos, de 37 individuos encontramos 12 alelos siendo el alelo 3 el mas frecuente con una frecuencia alélicas de 0.20 considerándose un marcador con alto grado de polimorfismo. Lundy et al (1999), en un estudio realizado en poblaciones de merluza europea (*Merluccius merluccius*) mediante los mismos cebadores, reporto (N=64, Na=41- Faro Portugal). Castillo et al 2005 (N=60, Na=21- Bahía de Vizcaya).

El hecho de que se obtuviera un promedio superior en los estudios señalado podría explicarse por la existencia de una mayor variabilidad en la colección de individuos, que procedían de zonas geográficamente distintas a la nuestra (Océano Atlántico) además relacionando nuestros resultados con los anteriores trabajos cabe la posibilidad de que si aumentamos el número de individuos se tendría una mejor estimación de la frecuencia de alelos, teniendo en cuenta también que la heterocigosidad observada es de 51.4%.

La técnica de PCR empleada para la detección de marcadores nucleares (EPICs y Microsatelites) que detectan polimorfismos de longitud, se considera que la metodología del análisis, la interpretación de los resultados es sencilla y es reproducible entre laboratorios (Hamada et al., 1982; Rafalski et al., 1993). Siendo rápida debido a la posibilidad de análisis simultáneos, facilidad de estandarización y automatización de la reacción. En comparación con otras técnicas de detección como son southern blotting, secuenciación, captura magnética, clonación molecular y digestión enzimática que demandan una mayor cantidad de tiempo y un máximo esfuerzo económico.

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. En este sentido, los microsatélites presentaron un mejor contenido en información y una mayor fiabilidad. Esto puede estar relacionado con la alta tasa de mutación que presentan los microsatélites lo cual conduce a un alto grado de polimorfismo. (Aliaga, 2004). Las comparaciones con trabajos previos permiten concluir que en el presente estudio se ha obtenido un número relativamente elevado de alelos por locus, si se tiene en cuenta el número de individuos de la muestra analizada y la pertenencia geográfica.

Se considera que el microsatélite Mmerhk9b evaluado en merluza peruana proporciona información muy importante relacionada con su estructura poblacional teniendo en cuenta la diversidad alélica presente en esta especie *Merluccius gayi peruanus*. El conocimiento de la estructura poblacional puede proveer una guía valiosa para las estrategias de conservación y manejo de las especies (Rossiter et al, 2000; Eirizik et al, 2001).

La sensibilidad del marcador microsatélite Mmerhk9b en grupos poblacionales de merluza fue óptima encontrándose que los lances estudiados se encuentran en equilibrio de Hardy y Weinberg según el estadístico Fis; en el AMOVA se encontró que todas las pruebas de diferenciación para los diferentes niveles jerárquicos no detectándose diferencias dentro y entre los grupos de Merluza peruana. La mayor varianza fue encontrada dentro los individuos 96.14%.

Por otro lado las diferencias encontradas con el F_{ST} no son significativas con respecto a su P valor ($p > 5\%$) y esto genéticamente se interpreta que los cuatro grupos estudiados conforman una sola unidad poblacional.

VIII. CONCLUSIONES:

- La evaluación de los marcadores nucleares (intrones y microsatélites) por EPIC-PCR y AMPLIFICACION CRUZADA es útil para estudios de poblaciones de Merluza peruana.
- Aldo C no es un marcador útil para evaluar poblaciones de Merluza peruana.
- El marcador microsatélite Mmerhk9b es informativo para el estudio de poblaciones de Merluza peruana debido a su alto grado de polimorfismo de longitud.
- Al ser evaluados con el marcador microsatélite MmerHK9b, los 4 Lances de Merluza peruana procedente de diferentes lugares de la Costa Norte Peruana tienen similitud genética. Esto podría indicar la presencia de una sola unidad poblacional, sin embargo esta información debe ser corroborada con más marcadores.

IX. BIBLIOGRAFÍA:

- ALIAGA POMA, Claudia. “Variabilidad genética de *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachipomus* en la region del Alto Madera (Amazonía boliviana) para el análisis del polimorfismo de la longitud de secuencias intrónicas (EPIC-PCR). Asesores: Dra. Volga Iñiguez Rojas, Dr. Jean Francois Renno. Tesis Título Profesional. UMSA, La Paz. 2004.
- AYLLON, E., MARTINEZ, J. & GARCIA, E. 2006. Loss of regional population structure in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following stocking. ICES Journal of Marine Science 63:1269-1273.
- BALLOUX, F., & LUGON-MOULIN, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Mol. Ecol. 11: 155-165.
- BARTRON, M. & SCRIBNER, K. 2004 Temporal comparisons of genetic diversity in Lake Michigan steelhead, *Oncorhynchus mykiss*, populations: effects of hatchery supplementation. Environmental Biology of Fishes 69:395-407.
- BENTZEN, P., TAGGART, C. T., RUZZANTE DE., COOK, D. 1996. Microsatellite polymorphism and the population structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the northwest Atlantic. Canadian Journal of Fish and Aquatic Science 53:2706-2721.

- CASTILLO, A., ALVAREZ, P. & GARCIA, E. 2005 Population structure of *Merluccius merluccius* along the Iberian Peninsula coast. – ICES Journal of Marine Science, 62:1699-1704.
- COHEN, D., INADA, T., IWAMOTO, T. & SCIALABBA, N. 1990 Gadiform fishes of the world (Order Gadiformes). An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. FAO Fisheries Synopsis 125: 1-442.
- CUBILLOS, L.; ALARCON, C. & ARANCIBIA H. 2007. Selectividad por tamaño de las presas en merluza común (*Merluccius gayi gayi*), zona centro-sur de Chile (1992-1997) Invest. Mar., Valparaíso, 35(1): 55-69 2007.
- DUDA, T. AND R. PALUMBI. 1999. Population structure of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, among western Indian Ocean and western pacific populations. Marine Biology 134: 705-710.
- EIZIRIK, E., KIM, J., MENOTTI, R., CRAWSHAW, P., BRIEN, S., Y JOHNSON, W. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). Molecular Ecology. 10: 65-79.
- ESPINO, M. & WOSNITZA-MENDO, C. 1989. Biomass of hake (*Merluccius gayi*) of Peru, 1953-1987. In D. Pauly, P. Muck, J. Mendo, I. Tsukayama (eds.) The Peruvian upwelling ecosystem: dynamics and interactions. ICLARM Conf. Proc. 18: 297-305.

- ESPINO, M. & V. WOSNITZA-MENDO. 1989. Relación entre las poblaciones de merluza (*Merluccius gayi peruanus*) y anchoveta (*Engraulis ringens*).
- ESPINO, M., CASTILLO, R. & FERNANDEZ, F. 1995 Biology and fisheries of Peruvian hakes (*Merluccius gayi peruanus*). En: Alheit J & TJ Pitcher (eds) Biology, fisheries and markets: 339-364. Chapman & Hall, Great Britain.
- ESPINO M. 2001. Perspectiva de Explotación de la Merluza Peruana .Instituto del Mar del Perú.
- ESTOUP,A.,LARGIADER,C.R.,PERROT ,E. &CHORURROUT,D.,1998 Rapid one – tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes.Molecular Marine Biology and Biotechnology,5: 295-298.
- EXCOFFIER L., SMOUSE, PE. QUATTRO JM.1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes – application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131:479-491.
- FERNANDEZ J. 1985 Estudio parasitológico de *Merluccius australis* (Hutton, 1872) (Pisces: Merlucciidae): Aspectos sistemáticos, estadísticos y zoogeográficos. Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción, Chile 56: 31-41.

- FRANCE, S., TACHINO, N., DUDA, T., SHLESER, R. & PALUMBI, S. 1999. Intraespecific genetic diversity in the marine shrimp *Penaeus vannamei* : multiple polymorphic elongation factor-1 α loci revealed by intron sequencing. Marine Biotechnology. 261-268.
- GALLEGUILLOS, R., TRONCOSO, L., OYARZUN, C., ASTORGA M. & PEÑALOZA, M. 2000 Diferenciación genética de *Merluccius gayi gayi* (Pisces, Merlucciidae)
- GALLEGUILLOS, R., TRONCOSO, L. & OYARZUN, C. 1999 Parentesco evolutivo en las Merluzas *Merluccius australis* y *Merluccius hubbsi* (Pisces, Merlucciidae) .
- GARCIA DE LEÓN, FJ., CHIKHI, L., BONHOMME, F.1997. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural population of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758).Molecular Ecology 6:51-62.
- GINSBURG I. 1954 Whitings on the coast of the American continents. Fishery Bulletin U.S. 56: 187-208.
- HASSAN, M., LEMAIRE, C., FAUVELOT, C. & BONHOMME, F. 2002 Seventeen new exon-primed intron-crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish.
- Hassan, M., Harmelin, V., y Bonhomme, F. 2003. Lessepsian invasion without bottleneck: example of two rabbitfish species (*Siganus rivulatus* and *Siganus luridus*). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 291: 219-232.

- HARTL, D., & CLARK, A. 1989. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachussetts, 683 p.
- HAUSER, L., ADCOCK, G., SMITH, RJ., RAMIREZ, J. & CARVALHO, G. 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). PNAS 99:11742-11747
- HERNANDEZ, C., GALLEGUILLOS, R. & OYARZUN, C. 2000 Diferenciación genética de *Merluccius gayi gayi* y *Merluccius gayi peruanus* (Pisces, Merlucciidae) y antecedentes paleogeográficos de su área de distribución.
- HO, J. (1990) Phylogeny and biogeography of hakes (*Merluccius*; Teleostei): A cladistic analysis. Fishery Bulletin U.S. 88: 95-104.
- INADA T. 1981 Studies on the merluccid fishes. Bulletin of Far Seas Fishery Research Laboratory (Shimizu) 18: 1-172.
- KABATA Z. & HO JS. 1981 The origin and dispersal of hake (Genus *Merluccius*: Pisces: Teleostei) as indicated by its copepod parasites. Oceanography and Marine Biology Annual Review 19: 381-404.
- LI, Y., A. KOROL, T. FAHIMA AND E. NEVO. 2004. Microsatellites within genes: Structure, Function, and Evolution. Molecular Biology and Evolution 21(6):991-1007.

- LUNDY, C., MORAN, P., RICO, C., MILNER, S.& HEWITT,G. 1999.Macrogeographical population differentiation in oceanic environments: a case study of European hake (*Merluccius merluccius*), a commercially important fish. *Molecular Ecology* 8:1889-1898.
- MORAN, P., LUNDY, C., RICO,C.& HEWITT G.1999.Isolation and characterization of microsatellite loci in European hake, *Merluccius merluccius* (Merlucidae, Teleostei).
- NIETO,J.; RAMOS,L.& MOTTE,E. 2005 Extraccion y purificación de ADN de *Tectona grandis* L. para su empleo en la tecnica RAPD -Foresta veracruzana 7(2):1-6
- PALUMBI, S. AND S. BAKER. 1994. Contrasting populations structure from Nuclear Intron Sequences and mtDNA of Humpback Whales. *Molecular Biology and Evolution* 11: 426-435.
- PALUMBI SR 1994. Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annual Review of Ecological Systems* 25:547-572.
- O' CONNELL, M., DILLON, MC. WRIGHT, JM. 1998 Development of primers for polymorphic microsatellite loci in the pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). *Molecular Ecology* 7: 358-360.

- ORÈ, D., QUIROZ, R., HURTADO, A. & FUJITA, R. 2003. Variabilidad de un sector de la region Hipervariable Mitocondrial Usando SSCP en la merluza peruana (*Merluccius gayi peruanus*).En I Congreso de Científicos Peruanos Lima, Perú, 2 al 5 de Enero de 2003. BA150
- POVH, J., LOPERA , N., RIBEIRO, R., LUPCHINSKI, E., GOMES, P. & LOPES, T. 2008 Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. Ciencia e Investigación Agraria, v.35, p.5-15, 2008.
- REGITANO, L.C.A. 2001a. Introdução à análise de marcadores moleculares. Pages 25-39. In: Regitano, L.C.A. and L.L. Coutinho (eds.). Biologia molecular aplicada à produção animal. EMBRAPA, Brasília, Brasil.
- REVALDAVES, E., RENESTO, E., Y MACHADO, M. 1997. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. JGenet. 20: no 3.
- RICHARD, M. & TORPE, R. 2001. Can microsatellites be used to infer phylogenies? Evidence from population affinities of the western Canary Island lizard (*Gallotia galloti*). Molecular phylogenetics and evolution. 20: 351-360.
- RICHARDSON, B. 1986. Allozyme electrophoresis. Australia. Academic Press Australia.

- RUZZANTE DE 1998. A comparison of several measures of genetic distance and population structure with microsatellite data: bias and sampling variance. Canadian Journal of Fish and Aquatic Science 55:1-14.
- SAIKI, R., D. GELFAND, S. STOFFEL, S. SCHARF, R. HIGUCHI, G. HORN, IS. MULLIS, and H. ERLICH. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.
- STEPHEN, CA. & ROSENBLATT, RH. 1996 Genetic divergence in antitropical pelagic marine fishes (*Trachurus*, *Merluccius*, and *Scomber*) between North and South America. Copeia 3: 586-598.
- VAN DER WERF. 1989. Introduction to some aspects of molecular genetics. University New England. Australia. 35-43p.
- WENBURG, J.BENTZ, P.FOOTE CJ. 1998. Microsatellite analysis of genetic population structure in an endangered salmonid: the coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*).Molecular Ecology 7: 733-749.
- YAN, J., LIU, S., SUN, Y., ZHANG, C., LUO, K. & LIU, Y. 2005. RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) X common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture 243:49-60.
- OPERACIÓN MERLUZA VII Puerto Pizarro (03°30' LS) - Pimentel (07°00'LS) /08 al 10 de agosto del 2005

X. ANEXOS:

10.1.GRAFICAS

FRECUENCIA POR ALELO EN "TODA" LA MUESTRA

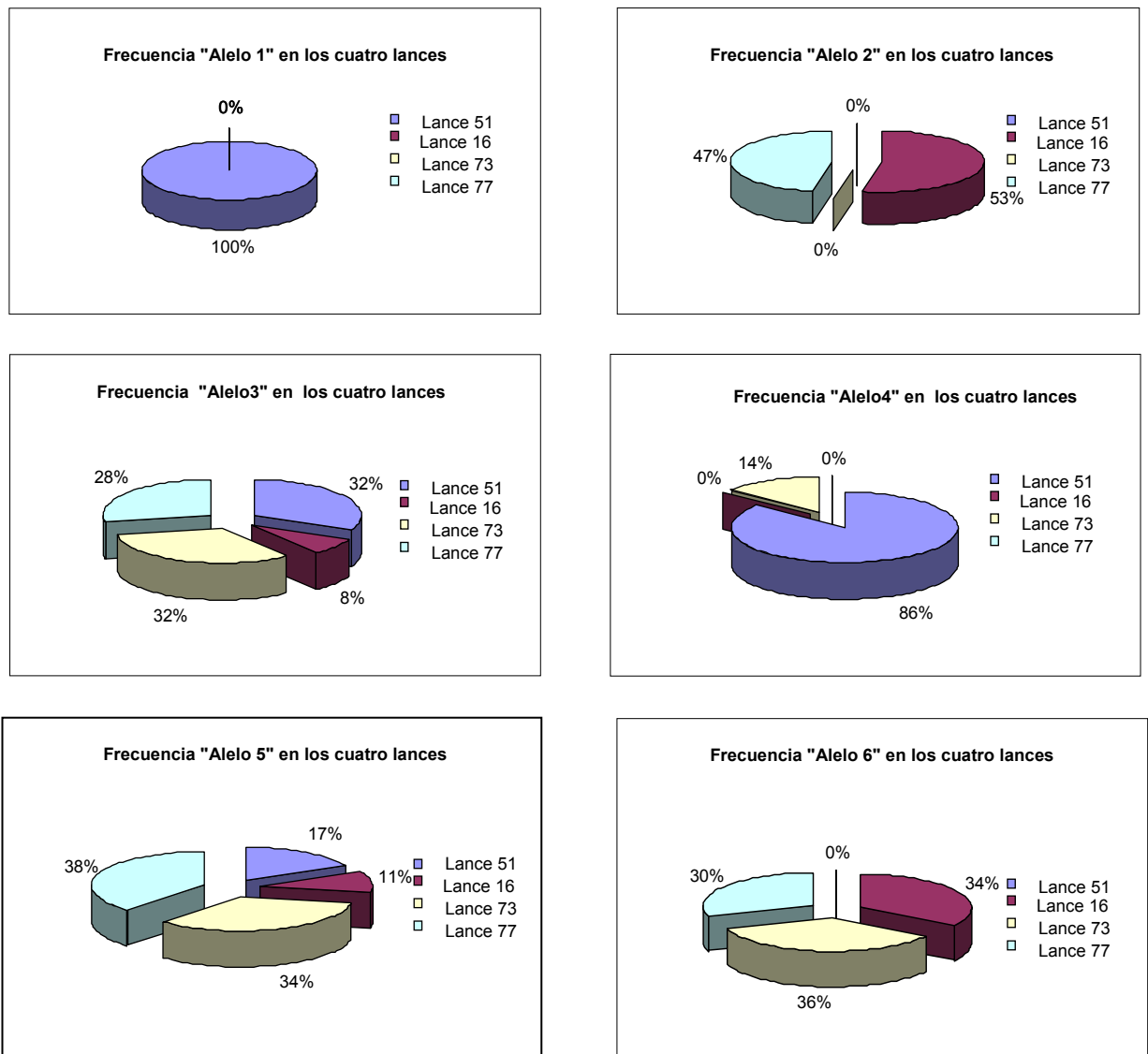


Fig. 25: Frecuencias por alelo en toda la muestra. Lances: 51,16, 73, 77.

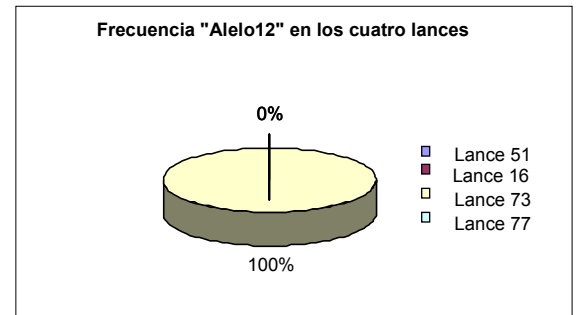
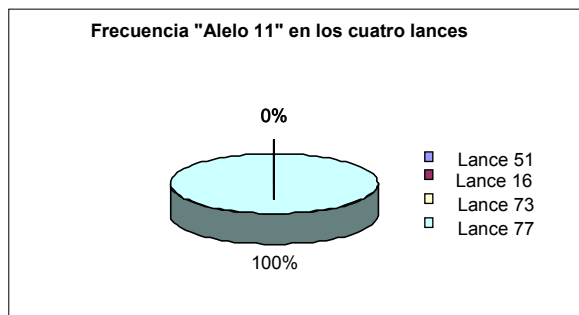
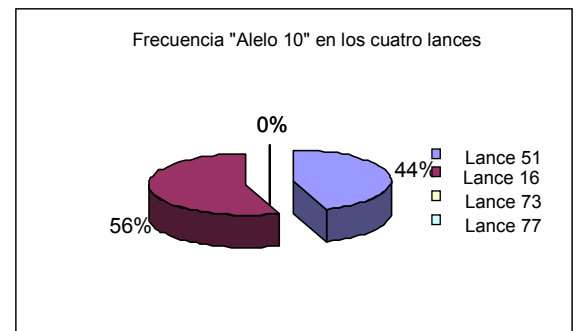
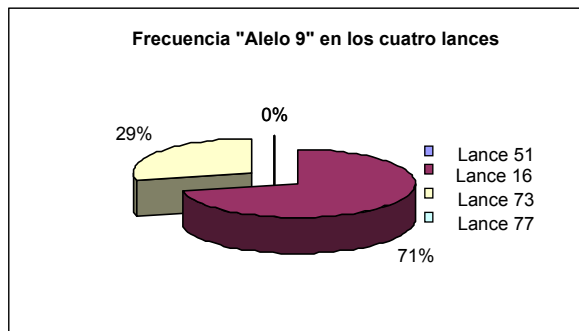
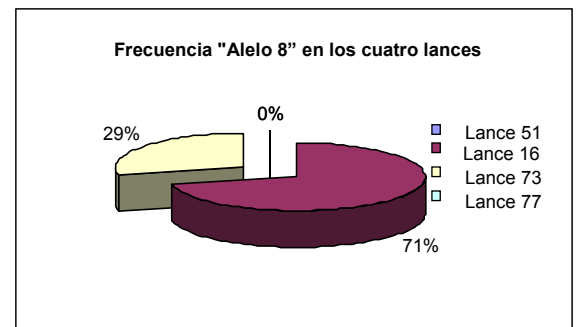
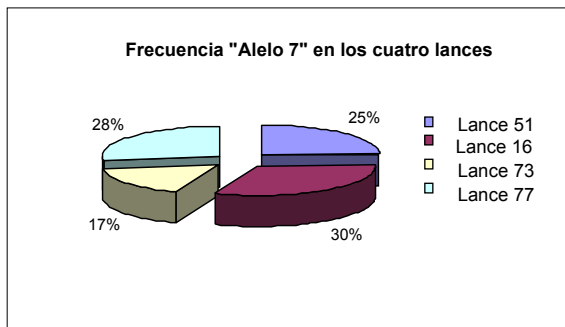


Fig. 26: Frecuencias por alelo en toda la muestra. Lances: 51,16, 73, 77.

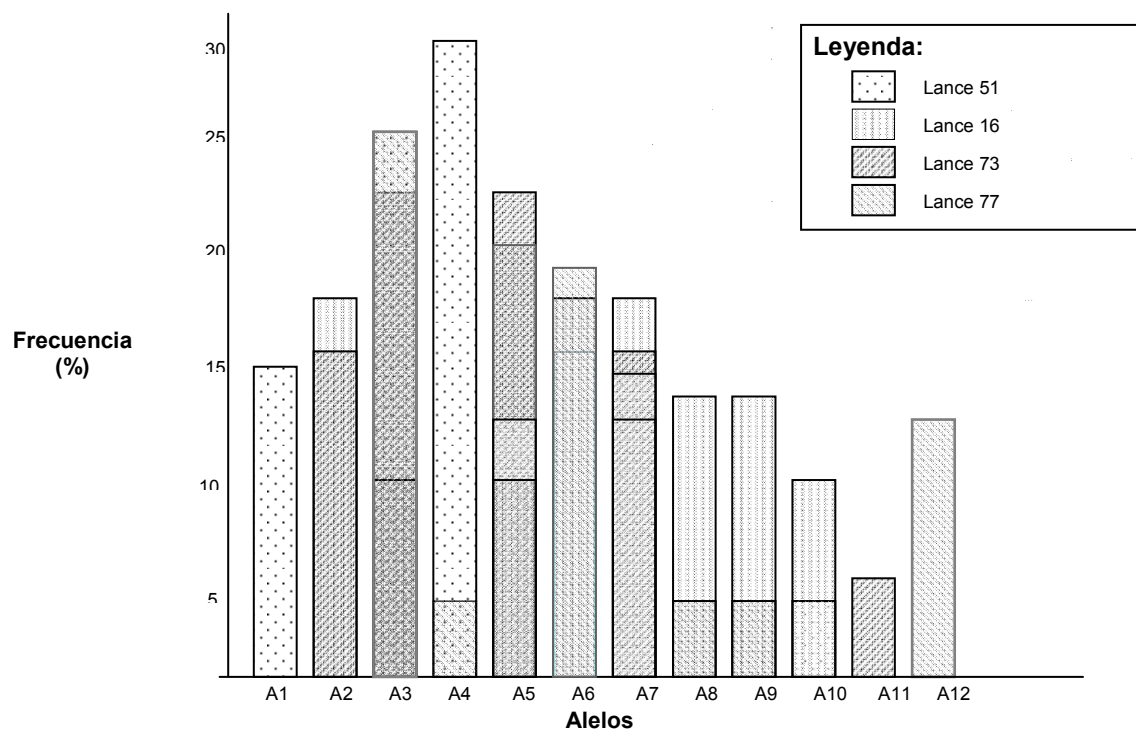


Fig. 27: Frecuencias por alelo en toda la muestra. Lances: 51, 16, 73, 77.

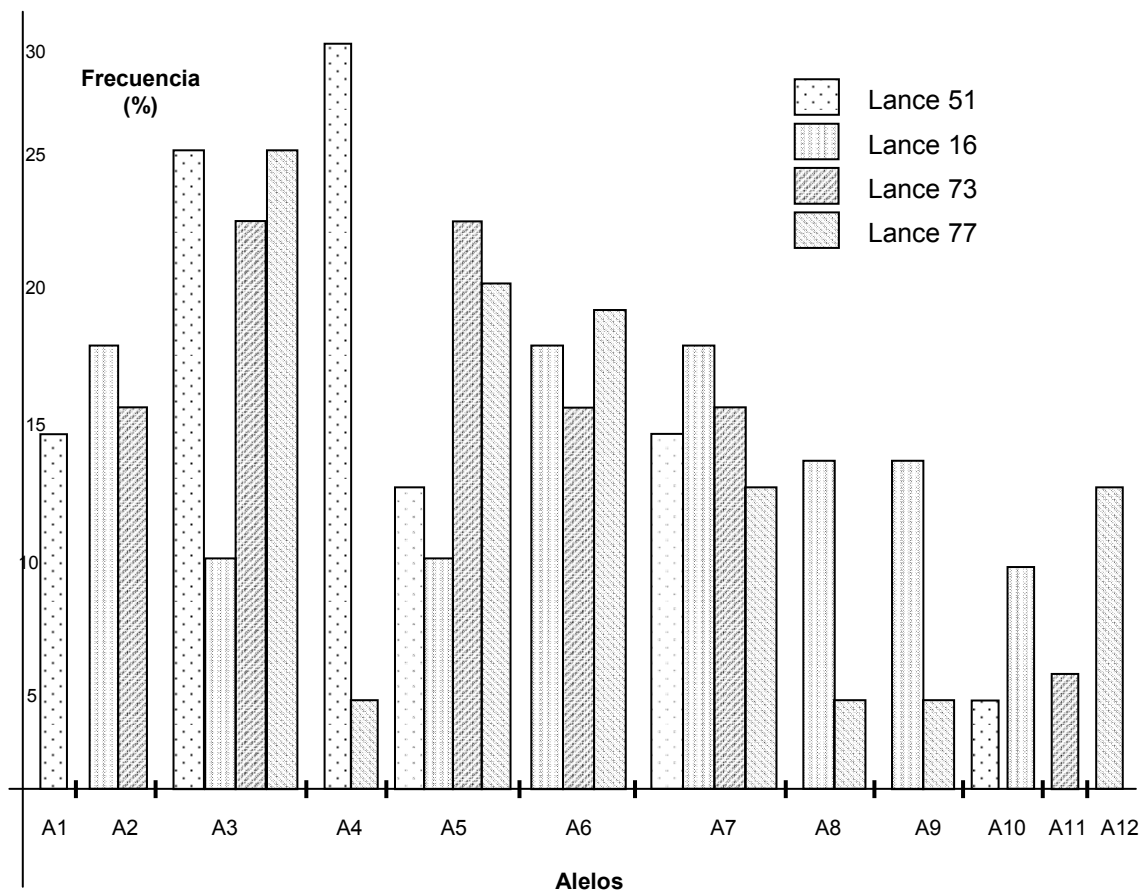


Fig. 28: Frecuencias por alelo en toda la muestra. Lances: 51,16, 73, 77.

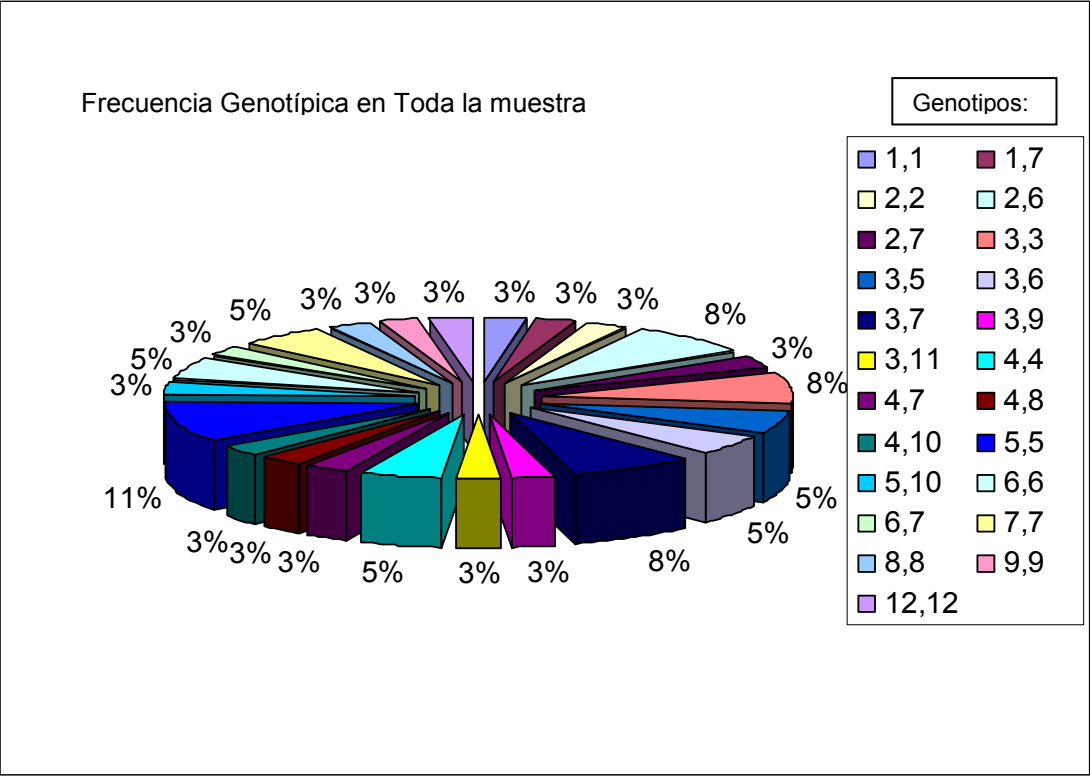


Fig. 29: Frecuencias genotípicas en toda la muestra. Lances: 51,16, 73, 77.

10.2. PROCEDIMIENTOS

10.2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

BUFFER TBE 10X

1 Litro:

- 108g Tris base
- 55g Ácido bórico
- 40mL EDTA 0.5M (pH 8.0)
- Completar con agua destilada hasta 1 litro.
- Autoclavar por 20 min.Ç

BUFFER TNS Urea

	<u>200mL</u>	<u>[final]</u>
• Tris	2mL 1M	10mM
• NaCl	5mL 5M	125Mm
• EDTA	2mL 0.5%	10mM
• SDS	10mL 10%	0.5%
• Urea	48.05g	4M

Con el anterior protocolo mencionado se paso a preparar BUFFER TNS Urea_para 50mL.

- Tris 0.5mL
- NaCl 1.25mL
- EDTA 0.5mL
- SDS 2.5mL
- Urea 12.012g.

10.2.2. PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA:

- Pesar la agarosa.
- Completar con Buffer TBE 1X hasta el volumen deseado.

Gel al 0.8%:

100ml	0.8 g. agarosa
-------	----------------

Gel al 1.5%:

40mL	(0.6g agarosa)
100mL	(1.5g agarosa)
120mL	(1.8g agarosa)



A.



B.



C.

Fig.30. Preparación de gel de agarosa **A.** Elección de materiales (Agarosa, TBE 10X, Agua destilada **B.** Pesado de agarosa según el porcentaje del gel. Mezclar con TBE1X. **Fig.3** La mezcla se lleva al microondas para después verterlo al molde.

10.2.3. ELECTROFORESIS HORIZONTAL



A.



B.



C.



D.

Fig.31. A. Carga de muestra en un gel de agarosa **B.** Cámara de electroforesis vertical
C. Tinción en bromuro de etidio **D.** Observación del gel en cámara UV.

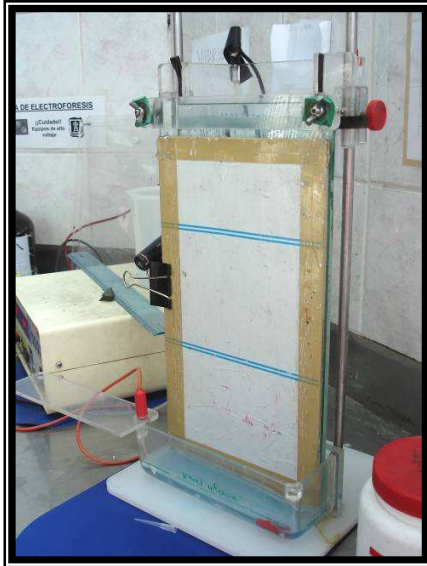
10.2.4. PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA DENATURANTES:

En la investigación se preparo geles 6% para el Microsatélite Mmer- hk9b en vidrios de 20 x 20 con 40 ml. Y para el EPIC Aldo C vidrios de 20 x 40. Con 80ml.

<u>40 ml.</u>		<u>80ml.</u>
• Pesar 22.4 gr.	UREA	89.6 gr.
• Medir 4 ml.	TBE 10X	16 ml.
• Medir 11.5 ml.	ACRILAMIDA 21%	46 ml.

Se combina todos los reactivos se disuelve, después se filtra esta combinación y se enrasa hasta el volumen que se necesita.

10.2.5. ELECTROFORESIS VERTICAL



A.



B.



C.

Fig.32. A. Gel de poliacrilamida 20x40 **B.** Gel de poliacrilamida 20x20 **C.** Carga de productos en un gel 20x20.

10.2.6. PREPARACION DE MASTER MIX



A.



B.



C.



D.

Fig.33. A. ADN genómico **B.** Kit. de PCR. **C y D.** Preparación del master mix

10.2.7. CONDICIONES DE PCR PARA LA AMPLIFICACION DE INTRONES EN
Merluccius gayi peruanus

CONDICIONES POR CADA INTRON

Primer	Aldo C1F
Primer	Aldo C2R

Programas de Termociclador

Hassan 02 para Aldo C

4 °C	3 min	
95 °C	3 min	
94 °C	12 s	} 35 CICLOS
60 °C	12 s	
72 °C	20 s	
72 °C	5 s	

10.2.8. CONDICIONES DE PCR PARA LA AMPLIFICACION DE MICROSATELITE EN *Merluccius gayi peruanus*

CONDICIONES POR CADA INTRON

Primer	U
Primer	L

Programas de Termociclador

Moran 50

8 °C	5 min		
94 °C	2 min		
94 °C	15 s	}	7 CICLOS
50 °C	20 s		
72 °C	20 s		
89 °C	15 s	}	23 CICLOS
50 °C	20 s		
72 °C	20 s		
4°C	2 min		