

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**“UTILIZACIÓN DE LOCI MICROSATÉLITES Y ADN
MITOCONDRIAL PARA EVALUAR LA ESTRUCTURACIÓN
GENÉTICO-POBLACIONAL DE LA CABALLA (*Scomber
japonicus* Houttuyn, 1782) EN EL MAR PERUANO”**

Tesis

Para optar al Título Profesional de

Biólogo Genetista Biotecnólogo

AUTOR

Sergio Paolo Barahona Padilla

Lima – Perú

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE

GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**UTILIZACIÓN DE LOCI MICROSATÉLITES Y ADN
MITOCONDRIAL PARA EVALUAR LA ESTRUCTURACIÓN
GENÉTICO-POBLACIONAL DE LA CABALLA (*Scomber
japonicus* Houttuyn, 1782) EN EL MAR PERUANO**

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

Bach. SERGIO PAOLO BARAHONA PADILLA

ASESOR: BLGO. ROGER QUIROZ BAZAN

COASESOR: BLGO. DANIEL SAÚL ORÉ CHÁVEZ

Lima – Perú

2014

DEDICATORIA

A mis amados padres, Hugo Enrique Barahona Castillo y Ana Lucía Padilla Tello, a quienes todas las mañanas tengo la suerte de besar y abrazar y decirles cuánto los quiero. Y por supuesto, a mi adorada hermanita, Sandra Lucía. Gracias por ser los pilares que me apoyan siempre, día a día y por encima de todo, para convertirme en una mejor persona. Esto es por y para ustedes.

A mi hermana Yvonne Barahona y mi sobrino Ítalo González Barahona, a quienes quiero mucho, y a mi abuelita, Ana del Carmen Tello Tovar, que desde el cielo sé que guía mis pasos.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, Roger Walter Quiroz Bazan, a quien considero un segundo padre, por confiar plenamente en mí y por brindarme todo su apoyo desde el inicio de mi estancia en el laboratorio. Recuerdo los primeros días cuando aún estábamos en el ambiente 312, pequeño pero agradable, donde siempre me decía: “Hay que bajar información, leer en inglés, no todo es laboratorio”. Nada más cierto. Luego nos mudamos al ambiente 205 donde pude conocer en carne propia lo que es “sufrir la tesis”, quedándome hasta las 10 de la noche o amaneciéndome y siempre encontraba ánimos y consejos de su parte para seguir adelante. Finalmente nos trasladamos al actual 319, donde por primera vez corrimos geles verticales de poliacrilamida para microsátélites, un verdadero dolor de cabeza. Pero se logró, se pudo, profe.

A mi coasesor, Daniel Saúl Oré Chávez, por su amistad e invaluable apoyo académico y de quien aprendí que la investigación es ver más allá de lo evidente: hacer lo que otros ya han hecho, pero pensar lo que otros aún no han pensado.

A mis compañeros y excompañeros del Laboratorio de Ecología Molecular y Biodiversidad Acuática a quienes tuve la suerte de conocer y que me apoyaron poniendo su valioso granito de arena durante la realización de mi tesis: Luis Gustavo Sánchez Silva, un excelente amigo y a quien debo mis primeros conocimientos sobre técnicas en biología molecular. A Diego Deville, Paola Castro, Kevin Ttito, Paul Tacuri, Ivonne Ramírez, Baldomero Gutarra, Mónica Criollo, Karla Calderón, Yuriko Ortega, Tatiana Toribio y Vania Cedrón. Gracias por esos días de extracción de ADN, PCR, guantes con bromuro, risas y alegrías.

A los biólogos del IMARPE SEDE ILO, Walter Condori y Javier Villanueva, por su preciada colaboración en la recolección de muestras.

Al MSc. Willian Capa de la Universidad Nacional del Santa (UNS) y al Dr. Ernesto Cedrón y familia, por su cálido recibimiento durante mi corta estadía en la ciudad de Chimbote. Eternamente agradecido.

A los profesores José Pino y Betty Shiga del Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo, porque fue allí donde la investigación nació para mí.

A mi “senpai” Jacquelyne Zarria por sus consejos y por su enorme apoyo durante mi tesis. A César Carvallo también por sus sabios consejos.

A los miembros del Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía, la Dra. Rina Ramírez y Víctor Jiménez que me posibilitaron la cuantificación de ácidos nucleicos con el espectrofotómetro Nanodrop.

A mi queridísima madrina Jackeline Alvez-Milho y a mi tío Jim Zúñiga Caro.

A mi amada Escuela de Genética y Biotecnología que me enseñó más que nociones teóricas y prácticas, y a su queridísimo Director, el profesor Fernando Retuerto Prieto.

A todos aquellos profesores y amigos que de una u otra manera me dieron consejos y ánimos para seguir adelante. Muchas gracias a ellos también.

Y finalmente, al Fondo de Promoción de Trabajo de Tesis de Pregrado del VRI-UNMSM (Código N° 141001027) por el financiamiento de este trabajo de investigación.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
APS	Persulfato de Amonio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPIC-PCR	Exon-primed Intron-crossing PCR
EST	Expressed Sequence Tag
FAO	Food and Agriculture Organization
IMARPE	Instituto del Mar del Perú
mM	Milimolar
ND2	NADH Deshidrogenasa Subunidad 2
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
rpm	Revoluciones por minuto
SSR	Simple Sequence Repeat
Ta	Temperatura de annealing o Temperatura de Hibridación
TEMED	Tetrametiletilendiamina
tRNA ^{Pro}	Gen del ARN de transferencia del aminoácido Prolina
tRNA ^{Thr}	Gen del ARN de transferencia del aminoácido Treonina
tRNA ^{Phe}	Gen del ARN de transferencia del aminoácido Fenilalanina
UV	Ultravioleta
WORMS	World Register of Marine Species
μl	Microlitros
μM	Micromolar

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Caballa (<i>Scomber japonicus</i>)	2
2.1.1. Sistemática	2
2.1.2. Distribución geográfica	3
2.1.3. Morfología	4
2.1.4. Aspectos biológicos	4
2.1.5. Ecología	5
2.1.6. Pesquería	5
2.2. Región Control Mitocondrial	7
2.3. Microsatélites	8
2.3.1. Ventajas	9
2.3.2. Clasificación	12
2.3.3. Generación	12
2.3.4. Detección del polimorfismo	13
2.3.5. Limitaciones	14
2.4. Diversidad Genética	16
2.4.1. Índices de diversidad genética basada en secuencias de ADN	17
2.4.2. Índices de diversidad genética basada en microsatélites	18
2.5. Estructura Genética	19
2.6. Estudios taxonómicos y filogenéticos en el género <i>Scomber</i>	21
2.7. Estudios genético-poblacionales en <i>Scomber japonicus</i>	21
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
4. METODOLOGÍA	25
4.1. Muestreo	25
4.2. Procesamiento de muestras	25
4.3. Extracción de ADN	27
4.4. Región Control Mitocondrial	29
4.4.1. Reacción en cadena la Polimerasa	29
4.4.2. Secuenciamiento	32
4.4.3. Revisión de secuencias	32
4.4.4. Identificación de la Región Hipervariable I (HVI)	32

4.4.5. Diversidad Genética	33
4.4.6. Análisis filogenético	33
4.4.7. Network	33
4.4.8. Historia demográfica	34
4.4.9. Estructuración genética	36
4.4.10. Test de Mantel	37
4.5. Microsatélites	37
4.5.1. Amplificación y Electroforesis	38
4.5.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	39
4.5.3. Lectura de alelos y asignación de genotipos	41
4.5.4. Diversidad genética	42
4.5.5. Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW)	42
4.5.6. Probabilidad de alelos nulos	42
4.5.7. Estructura genética	43
4.5.8. Test de Mantel	43
5. RESULTADOS	44
5.1. Extracción de ADN	44
5.2. Región Control Mitocondrial	45
5.2.1. Amplificación por PCR	45
5.2.2. Secuencias	45
5.2.3. Identificación de la Región Hipervariable I (HVI)	46
5.2.4. Diversidad genética	47
5.2.5. Análisis filogenético	51
5.2.6. Network	54
5.2.7. Historia demográfica	55
5.2.8. Estructura genética	59
5.2.9. Test de Mantel	61
5.3. Microsatélites	63
5.3.1. Marcador SJT18	63
5.3.2. Marcadores SJT49, Scja02, Scja07 y KSj12	73
6. DISCUSIÓN	76
6.1. Tamaño de muestra	76
6.2. Extracción de ADN	76
6.3. Región Hipervariable I (Dominio ETAS)	79
6.3.1. Diversidad genética	79

6.3.2. Historia demográfica	83
6.4. Microsatélites	84
6.4.1. Marcador SJT18	84
6.4.2. Efecto Stuttering	85
6.5. Estructuración genética	86
7. CONCLUSIONES	90
8. RECOMENDACIONES	91
9. REFERENCIAS	92
10. ANEXOS	101
10.1. Anexo 1: Concentraciones y purezas de los ADNs	104
10.2. Anexo 2: Curación de sitios polimórficos detectados en la HVI	105
10.3. Anexo 3: Equipo de Electroforesis Vertical	106
10.4. Anexo 4: Composición de las soluciones empleadas en la tesis	109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de las poblaciones de <i>Scomber japonicus</i> a nivel global	3
Tabla 2. Clasificación de los microsatélites	12
Tabla 3. Datos de colecta	25
Tabla 4. Primers utilizados para amplificar la Región Control en <i>Scomber japonicus</i>	30
Tabla 5. Protocolo de amplificación de la Región Control	31
Tabla 6. Loci microsatélites empleados en este estudio	38
Tabla 7. Protocolo de amplificación del locus SJT18	38
Tabla 8. Protocolo de amplificación del locus SJT49	39
Tabla 9. Distribución y frecuencias de los haplotipos de la Región Hipervariable I de <i>Scomber japonicus</i> en el mar peruano	48
Tabla 10. Frecuencias de los sitios polimórficos	49
Tabla 11. Caracterización molecular e índices de diversidad genética	50
Tabla 12. Tests de neutralidad	56
Tabla 13. Distribución Mismatch	59
Tabla 14. Test de AMOVA en base a la Región Hipervariable I	60
Tabla 15. Diferenciación Poblacional: Comparaciones a pares de F_{ST}	61
Tabla 16. Test exacto de diferenciación poblacional: Valores de los p-values	61
Tabla 17. Matriz de Distancias Geográficas en Km lineales entre localidades	61
Tabla 18. Matriz de Distancias Genéticas	62
Tabla 19. Genotipaje del marcador SJT18	66
Tabla 20. Frecuencias alélicas del marcador SJT18 por población	68
Tabla 21. Diversidad genética en base al marcador SJT18	69
Tabla 22. Probabilidad de alelos nulos por población	70
Tabla 23. Test de AMOVA para el marcador microsatélite SJT18	71
Tabla 24. Distancias genéticas entre poblaciones en base al marcador SJT18	72
Tabla 25. Modificaciones al método de Aljanabi et al (1997)	77
Tabla 26. Diversidad haplotípica (H_d) y diversidad nucleotídica (π) encontradas en otras especies de peces de importancia pesquera	81
Tabla 27. Concentraciones y purezas de los ADNs obtenidos	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica global de <i>Scomber japonicus</i>	3
Figura 2. Ilustración de <i>Scomber japonicus</i>	4
Figura 3. Desembarques anuales de <i>Scomber japonicus</i> en el mar peruano	6
Figura 4. Esquema de la Región Control de mamíferos	8
Figura 5. Polimorfismo de un microsatélite dinucleótido (AC) _n	14
Figura 6. Efecto Stuttering.	16
Figura 7. Hipótesis de los dos stocks de la caballa del Pacífico Sudoriental	23
Figura 8. Puntos de muestreo de caballa en la costa peruana	26
Figura 9. Sitios de hibridación de los primers L-Serg y HARN12S	30
Figura 10. Programa de amplificación de la Región Control Mitocondrial	31
Figura 11. Extracción de ADN con el método de Aljanabi et al (1997)	44
Figura 12. Extracción de ADN con la modificación propuesta	45
Figura 13. Amplicones de la Región Control Mitocondrial	45
Figura 14. Fragmento de electroferograma de la HVI	46
Figura 15. Porción del alineamiento múltiple de la Región Hipervariable I	46
Figura 16. Distribución Geográfica de los haplotipos	49
Figura 17. Árbol ML con 1000 réplicas de bootstrap bajo el modelo HKY	52
Figura 18. Árbol NJ con 1000 réplicas de bootstrap modelo K2P	53
Figura 19. Red de haplotipos Median Joining	55
Figura 20a. Distribuciones Mismatch (Paita y Ventanilla)	57
Figura 20b. Distribuciones Mismatch (Ilo y Población total)	58
Figura 21. Test de Mantel considerando distancias F_{ST}	62
Figura 22. Test de Mantel considerando distancias F_{ST} linearizadas de Slatkin	63
Figura 23. Estandarización del locus SJT18	64
Figura 24. Corrida vertical de poliacrilamida del locus microsatélite SJT18	64
Figura 25. Verificación de alelos del locus microsatélite SJT18	65
Figura 26. Frecuencias alélicas del marcador SJT18 (tipo pie)	67
Figura 27. Frecuencias alélicas del marcador SJT18 (en columnas)	67
Figura 28. Test de Mantel para el marcador SJT18 en base a distancias F_{ST}	73
Figura 28. Marcadores Scja02, Scja07 y KSjl2. Estandarización $MgCl_2$	72
Figura 29. Test de Mantel para el locus SJT18 en base a distancias de Nei	73
Figura 30. Corridas electroforéticas verticales del marcador microsatélite SJT49	74
Figura 31. Marcadores Scja02, Scja07 y KSjl2. Estandarización del $MgCl_2$	74

Figura 32. Marcadores Scja02, Scja07 y KSjl2. Estandarización de la T_a	74
Figura 33. Electroforesis vertical de los marcadores Scja02, Scja07 y KSjl2	75
Figura 34. Electroforesis vertical para el marcador Scja02	75
Figura 35. Equipo de Electroforesis vertical CBS Scientific	108

RESUMEN

La caballa *Scomber japonicus* (Perciformes: Scombridae) es una especie pelágica de gran importancia económica en el Perú y en varios países alrededor del mundo. A pesar de su importancia, no se han reportado estudios concernientes a la genética de poblaciones en esta especie en el Perú. Por este motivo, el objetivo de la presente tesis fue evaluar la estructuración genética de caballa en el mar peruano. Se utilizó la Región Hipervariable I (Dominio ETAS) de la Región Control Mitocondrial junto a cinco marcadores microsatélites. El análisis del marcador mitocondrial evidenció una escasa diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas y que el recurso atravesó un proceso de expansión poblacional en el pasado. De los marcadores microsatélites solamente el locus SJT18 fue útil para el análisis genético-poblacional debido a que los cuatro marcadores restantes tuvieron serios problemas de efecto stuttering (bandas tartamudas). Este locus, al igual que el marcador mitocondrial, sugirió una escasa diferenciación entre las poblaciones. Se concluye que la caballa peruana comprende una sola unidad panmíctica lo cual refuerza la hipótesis de un único stock pesquero.

Palabras claves: *Scomber japonicus*, Región Control, Región Hipervariable I, Microsatélites, Electroforesis en gel de poliacrilamida, Estructura genética.

ABSTRACT

The Chub Mackerel *Scomber japonicus* (Perciformes: Scombridae) is a species of great economic importance in Peru and several countries around the world. Despite its importance, studies concerning population genetics in this species have not been reported in Peru. Therefore, the aim of present thesis was to evaluate genetic structuration of the chub mackerel in Peruvian sea. The Hypervariable Region I (ETAS Domain) plus five microsatellite loci were used. The analysis of the mitochondrial marker showed evidence of a low genetic differentiation between studied samples and that the resource underwent a demographic expansion in the past. Only the locus SJT18 from the used microsatellite markers was useful for population genetic analysis because the remaining four microsatellite markers had serious problems of stuttering effect (stutter bands). This locus, well as the ETAS Domain, suggested the low genetic differentiation between populations. The analysis concluded that Peruvian chub mackerel comprises a single panmictic unity, which reinforces the hypothesis of a single fish stock.

Keywords: *Scomber japonicus*, Control Region, Hypervariable Region I, Microsatellites, Polyacrylamide gel electrophoresis, Genetic structure.

1. INTRODUCCIÓN

La caballa *Scomber japonicus* es un pez escómbrido de gran importancia para la actividad pesquera en numerosos países del mundo como Japón, China, Korea, Taiwán, países del Atlántico y Sudamérica. En el Perú, la caballa ocupa el tercer lugar de explotación entre los peces pelágicos luego de la anchoveta y el jurel, seguida de la sardina (IMARPE, 2006). Esta especie tiene como dieta al fitoplancton y estadios juveniles de anchoveta y sardina y a su vez es presa de los grandes peces carnívoros teniendo un lugar clave en el ecosistema marino. Se sabe que la explotación de los recursos marinos puede tener un elevado impacto en la diversidad genética de las poblaciones, pues modifica la estructura genética y disminuye el tamaño poblacional. Por ello, la evaluación de la estructura genética en las poblaciones explotadas es una herramienta valiosa para definir estrategias de gestión pesquera y manejo sustentable (Carvalho y Hauser 1994; Ward, 2000). Es reconocido el gran potencial de los marcadores moleculares para este fin, sobre todo marcadores mitocondriales y microsatélites. En Japón, Korea, Taiwán y China, donde la caballa es el principal recurso pesquero, se han generado un número importante de marcadores microsatélites y se han empleado marcadores mitocondriales para evaluar la estructura genética en esta especie. En nuestro país, aun no se ha estudiado la estructura genética de la caballa usando marcadores moleculares.

La presente tesis tiene objetivo determinar la estructura genética actual de la caballa en el mar peruano usando un marcador mitocondrial (Región Hipervariable I) y cinco loci microsatélites generados para la especie. Los resultados servirán para dilucidar el grado de diferenciación genética entre las poblaciones de caballa en el mar peruano.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Caballa (*Scomber japonicus*)

2.1.1 Sistemática

La familia Scombridae comprende 15 géneros y unas 51 especies, la mayoría pelágicas migratorias caracterizadas por su abundancia y alto valor económico, entre las cuales destacan los atunes, bonitos y caballas (Collette, 2003). Las caballas pertenecientes al género *Scomber* se dividen en tres especies según Matsui (1967): *Scomber scombrus*, *Scomber australasicus* y *Scomber japonicus*. Collette (1999) reconoció a una cuarta especie: *Scomber colias*. La clasificación taxonómica de la caballa *Scomber japonicus* según la **WORMS** (<http://www.marinespecies.org>) es:

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclase: Pisces

Clase: Actinopterygii

Orden: Perciformes

Familia: Scombridae

Subfamilia: Scombrinae

Tribu: Scombrini

Género: *Scomber*

Especie: *Scomber japonicus* (Houttuyn, 1782)

Nombres comunes: Caballa, macarela, verdel, estornino, magrú, cachorreta, chub mackerel, pacific mackerel.

2.1.2 Distribución geográfica

Scomber japonicus presenta una distribución circumglobal y cosmopolita con poblaciones ampliamente separadas (Scoles et al., 1998). Cada población fue clasificada como subespecie en el pasado, categoría taxonómica actualmente no aceptada por la WORMS (Tabla 1). La población de caballa de la costa occidental de Sudamérica, antes conocida como la subespecie *Scomber japonicus peruanus*, se distribuye desde Panamá hasta Bahía Darwin (Chile) incluyendo las islas Galápagos (Matsui, 1967) (Figura 1).

Tabla 1. Distribución de las poblaciones de *Scomber japonicus* a nivel global

Poblaciones, antes Subespecies (categoría no aceptada actualmente)	Distribución	Área FAO de Pesca
<i>Scomber japonicus japonicus</i> (Houttuyn, 1782)	Pacífico Noreste	Área 71
<i>Scomber japonicus colias</i> (Gmelin 1789)	Atlántico Este	Área 34
<i>Scomber japonicus grex</i> (Mitchill, 1815)	Atlántico Oeste	Área 31
<i>Scomber japonicus diego</i> (Ayres, 1875)	Pacífico Noreste	Área 77
<i>Scomber japonicus peruanus</i> (Jordan y Hubbs, 1925)	Pacífico Sureste	Área 87
<i>Scomber japonicus marplatensis</i> (López, 1935)	Argentina y Brasil	Área 41

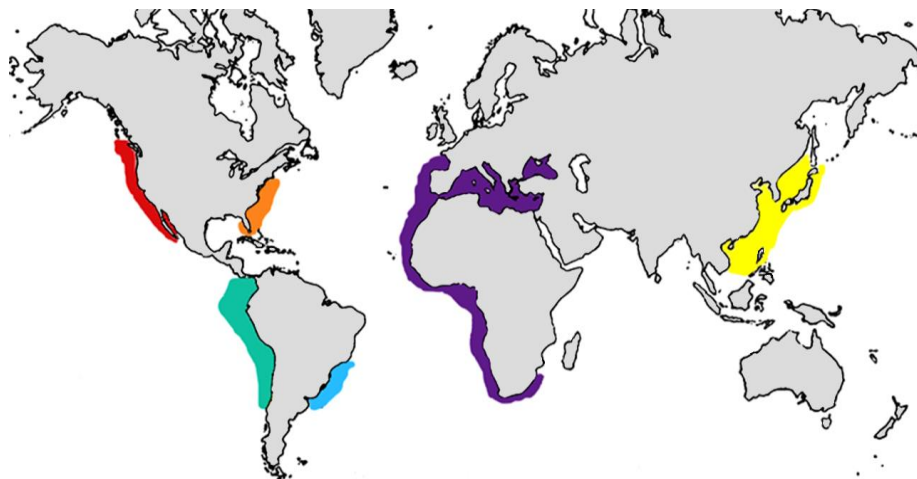


Figura 1. Distribución geográfica de la caballa (Modificado de Scoles et al., 1998)

2.1.3 Morfología

La caballa posee cuerpo alargado, fusiforme, robusto y con pedúnculo caudal delgado. La cabeza es pequeña, con ojos grandes y el hocico puntiagudo es ligeramente prominente. La coloración del lomo es verde-botella y está ornamentado con muchas líneas gruesas, onduladas y el vientre es color plateado. Presenta dos aletas dorsales bien separadas entre sí. La segunda aleta dorsal y la aleta anal se encuentran seguidas de 5 aletillas. La aleta pectoral es pequeña y ubicada a los lados del cuerpo (Collette y Nauen, 1983) (Figura 2).

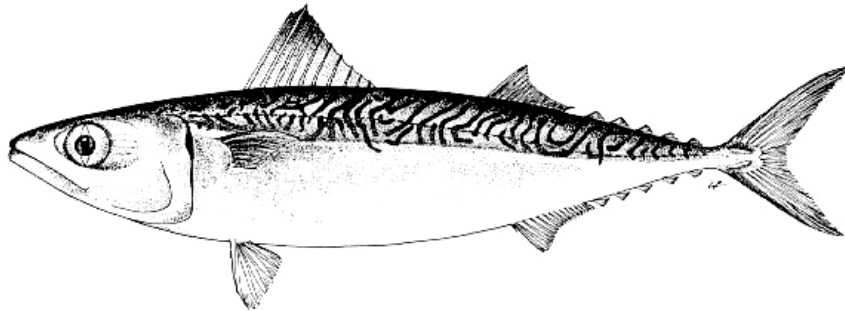


Figura 2. Ilustración de *Scomber japonicus* (Oyarzún, 2001)

2.1.4 Aspectos biológicos

La caballa es una especie sin dimorfismo sexual visible y con fertilización externa (Kramer, 1969). Los juveniles alcanzan la edad adulta entre los 3 y 4 años (Fitch, 1951) con un tamaño medio de inicio de madurez sexual de 26 cm (Pardo y Oliva, 1992). Los principales periodos de desove ocurren con mayor intensidad durante el verano (enero - marzo) y desde fines de la primavera. La longevidad máxima de la caballa reportada en aguas peruanas en base a lecturas de anillos de otolitos es de 9 años (Kotlyar y Abramov, 1983), aunque en otras regiones del mundo se han registrado edades de hasta 11 (Japón, Watanabe, 1970; California, Fitch, 1951) y 12 años (Argentina, Perrota y Pertierra, 1993).

2.1.5 Ecología

Es difícil determinar el nivel trófico de la caballa debido a su dieta particularmente omnívora y oportunista, pues se alimenta de fitoplancton, larvas de peces y moluscos, crustáceos (copépodos y eufásidos), quetognatos, tunicados (Konchina, 1982), estadios juveniles de otras especies de peces (sardina, anchoveta y anchoa), e incluso se ha reportado canibalismo a nivel de huevos (Böhm, 1984), por lo que dependiendo del alimento disponible, puede pasar de un segundo nivel trófico (planctófago) a un cuarto nivel trófico (ictiófago) (Castro, 1991).

La caballa es depredada por otros peces pelágicos grandes como atunes, peces espada, bonitos, tiburones, y por mamíferos marinos como delfines y ballenas (Ojeda y Jaksic, 1979). Se ha encontrado restos de caballa en el contenido estomacal de la merluza *Merluccius gayi peruanus* (Fuentes et al., 1989). Estas relaciones convierten a esta especie en un componente clave dentro de la ecología trófica marina, pues sirve de enlace entre los niveles productores y los grandes predadores (Castro, 1991).

2.1.6 Pesquería

En el Perú la explotación comercial de caballa comenzó en la década de los 60, con bajos niveles iniciales de captura (8, 350 toneladas anuales en promedio). Durante los 70, como consecuencia de la caída del stock de anchoveta debido a la pesca excesiva y el Fenómeno El Niño 1972-73, la explotación de caballa aumentó relativamente (Mendo, 1984). Durante los años 80 y 90 los desembarques fueron estables con oscilaciones en el nivel de los desembarques. En el año 1997 las capturas se incrementaron significativamente llegando a su pico máximo en el año 1998 (401, 903 toneladas) y 1999 (375, 522 toneladas) debido a que los cambios ambientales ocasionados por el Fenómeno El Niño 1997-98 favorecieron enormemente la tasa

reproductiva de la caballa (Ñiquen y Bouchon, 2004). A partir del año 2002 las capturas declinaron y los niveles de desembarques se han mantenido hasta entonces (Figura 3).

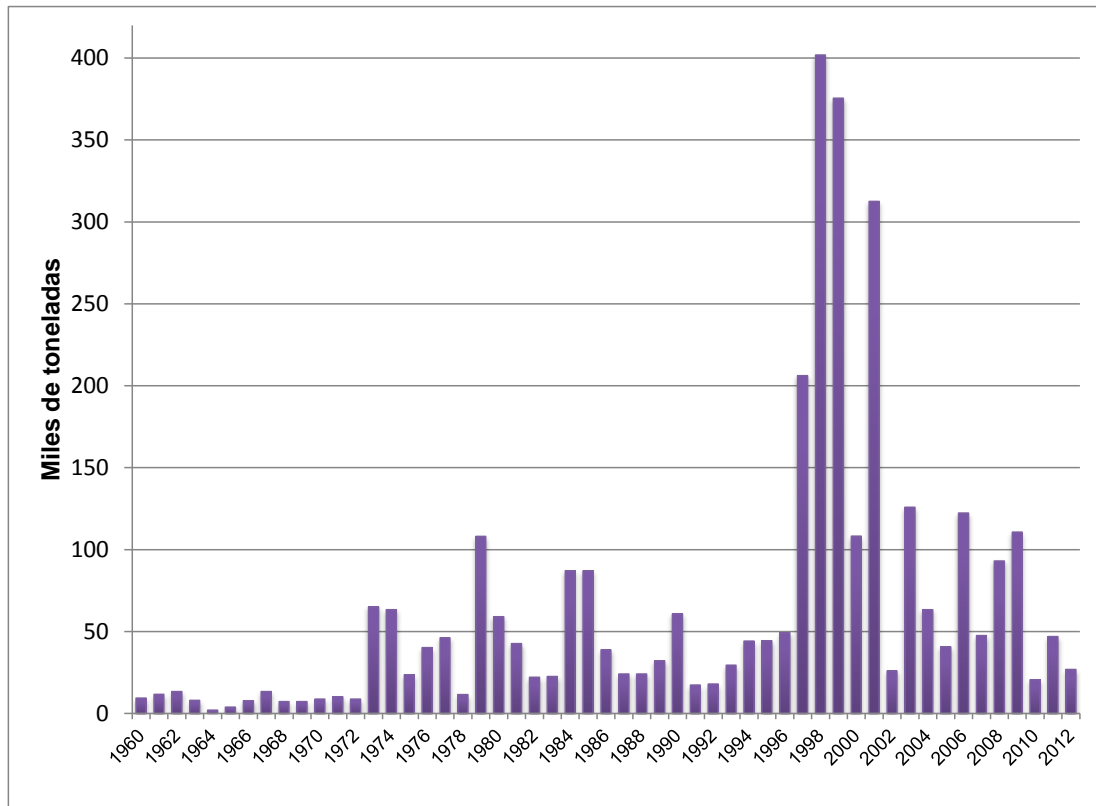


Figura 3. Desembarques anuales de *Scomber japonicus* en el mar peruano.

(Datos tomados de Castro y Santana, 2000)

Los principales puntos de pesca de la caballa en el Perú son los puertos de Paita, Chimbote y Callao; y dentro de las principales medidas de regulación se tiene la fijación de tamaño de malla (1½ pulgada) y una talla mínima de captura de 32 cm de longitud total (IMARPE ITP, 1996). La caballa tiene un comportamiento gregario - migratorio (cardúmenes), con preferencia por aguas cálidas (14° - 23°C), poco profundas y cercanas a la costa (Collette y Nauen, 1983). Por ello las capturas son obtenidas a lo largo de las 60 millas náuticas, pero también se han realizado capturas hasta las 200 millas concordantes con la presencia de larvas (Rojas y Mujica, 1981).

2.2 Región Control Mitocondrial

La Región Control es la única región no codificante del genoma mitocondrial y la que presenta mayor tasa de evolución molecular (Brown, 1986). En mamíferos y peces se encuentra flanqueada por las secuencias codificadoras tRNA^{Pro} y tRNA^{Phe}, y está dividida en tres dominios (Sbisa et al., 1997):

a) Dominio ETAS o Región Hipervariable I

Este dominio se encuentra en la posición 5' adyacente al tRNA^{Pro} y presenta secuencias específicas que actúan como señales de terminación (TAS) durante la replicación de la cadena pesada. Esta región es un marcador popular para estudios intrapoblacionales debido a su alta tasa de mutación comparada con los otros dos dominios, otros genes mitocondriales e incluso regiones nucleares (Lee et al., 1995; Taberlet, 1996).

b) Dominio Central Conservado:

El dominio central conservado muestra baja variabilidad y presenta bloques de secuencia conservados (CSB-F, CSB-E y CSB-D), que al parecer presentan funciones críticas para el metabolismo mitocondrial (Guo et al. 2003).

c) Dominio Derecho o Región Hipervariable II

Adyacente al tRNA^{Phe}, contiene al origen de replicación de la cadena pesada (O_H), promotores transcripcionales de las cadenas ligera y pesada y algunas secuencias conservadas o CSBs (Saccone et al., 1991) (Figura 4).

Las regiones hipervariables suelen presentar inserciones-delecciones y algunas veces secuencias repetidas, las cuales provocan que el tamaño de la Región Control varíe mucho entre especies: por ejemplo, en el esturión blanco es de 976 pb (Buroker et al.,

1990), en salmónidos es 1128 pb (Shedlock et al., 1992) y en pleuronéctidos es aproximadamente de 1500pb (Lee et al., 1995).

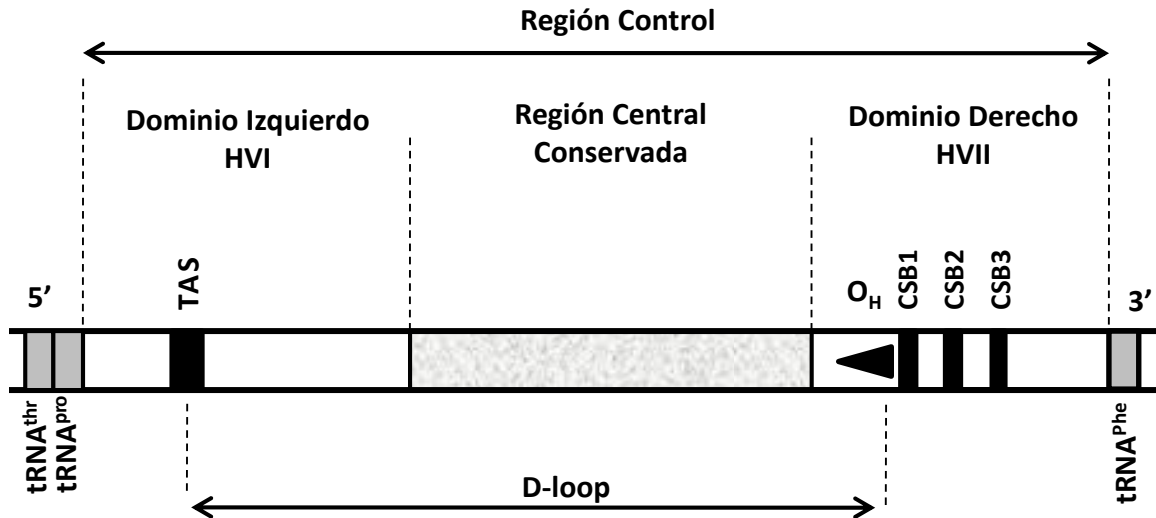


Figura 4. Esquema de la Región Control de mamíferos (O_H: Origen de Replicación de la cadena pesada, CSB: Bloque de Secuencia conservada, TAS: Secuencia asociada a terminación, D-Loop: Displacement Loop) (Tomado de Smith, 1996)

2.3. Microsatélites

Los microsatélites o SSRs (*Simple Sequence Repeats*) son secuencias de 1 a 6 pb que se repiten en tándem un determinado número de veces. Las localizaciones de los microsatélites están distribuidas a lo largo de los cromosomas y cada locus microsatélite es identificable por un motivo de secuencia particular (Tautz y Renz, 1984).

2.3.1 Ventajas

Los microsatélites poseen características ventajosas que los convierten en los marcadores moleculares preferidos para múltiples análisis como genética forense, pruebas de paternidad, genética de poblaciones, construcción de mapas genéticos,

estudios de identificación varietal y estudios de asociación (Shinde et al., 2003). Estas ventajas son:

2.3.1.1 Neutralidad

Los microsatélites se consideran regiones génicas con evolución molecular neutral, es decir, no están afectados por la selección natural, lo que los convierte en marcadores compatibles con los postulados de la genética de poblaciones, pues las frecuencias alélicas se verán afectadas sólo por tres fuerzas evolutivas: deriva génica, mutación y flujo génico (Schlötterer, 2000). Sin embargo, dependiendo de su localización genómica, los microsatélites pueden estar sometidos a selección y tener funcionalidad en eventos críticos como replicación, recombinación, expresión y estructura del ADN (Kashi et al., 1997; Chistiakov et al., 2006).

2.3.1.2 Elevado grado de polimorfismo

Los microsatélites tienden a ser hipervariables (multialélicos) gracias a la alta tasa de mutación que presentan. El proceso mutacional de los microsatélites ocurre de una manera muy diferente a las clásicas mutaciones puntuales (sustituciones) porque se basa en un particular evento conocido como *slippage*, que consiste en el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (Ellegren, 2004). Existen tres principales modelos de evolución que explican la aparición de alelos microsatélites:

2.3.1.2.1 Modelo de alelos infinitos (IAM, del inglés: Infinite Alleles Model) (Kimura y Crow, 1964): Propone que cada mutación crea un nuevo y único alelo por agregación de una unidad repetitiva a una tasa μ . Como cada alelo nuevo es más grande que el anterior, este modelo no permite homoplasia.

2.3.1.2.2 Modelo de mutación de a pasos (SMM, del inglés: Stepwise Mutation Model) (Otha y Kimura, 1973): Un alelo puede mutar en ambas direcciones por igual, ya sea agregando una unidad repetitiva (expansión) o perdiendo una unidad repetitiva (contracción) con una tasa de $\mu/2$. Este modelo, por lo tanto, permite alelos idénticos por estado (homoplasia). Asumiendo este escenario, la diferencia en tamaño transmite información adicional acerca de la filogenia de los alelos, debido a que alelos con tamaños muy diferentes estarán menos relacionados entre sí que alelos con tamaños similares. Slatkin (1995) desarrolló el estadístico R_{ST} especialmente para microsatélites basándose en este modelo.

2.3.1.2.3 Modelo de mutación de dos fases (TPM, del inglés: Two-phase Model) (Di Rienzo et al., 1994). Similar al modelo SMM, propone que un alelo puede mutar en ambas direcciones con una repetición (una fase, probabilidad: p) o con varias repeticiones (dos-fases, probabilidad: $1 - p$).

2.3.1.3 Codominancia

El polimorfismo de longitud que caracteriza a los microsatélites permite diferenciar a las variantes alélicas por su tamaño, lo cual facilita la identificación individual de heterocigotos. Esta característica le otorga a los microsatélites una gran ventaja sobre RAPDs o AFLPs que son marcadores dominantes pues solo describen la presencia/ausencia de las bandas (Wright y Bentzen, 1994).

2.3.1.4 Abundantes en el genoma

Los microsatélites se encuentran de manera abundante en el genoma tanto en regiones codificantes como no codificantes (intrones, exones, promotores, secuencias intergénicas, etc) (Rajendrakumar et al., 2007). Se sabe que los microsatélites son numerosos en el genoma de peces (O'Connell y Wright, 1997), himenópteros,

mamíferos y escasos en el genoma de aves, plantas y lepidópteros (González, 2003). Además se han reportado microsatélites en el genoma cloroplastidial (Powel et al., 1995) y mitocondrial (Soranzo et al., 1999) en algunas especies de coníferas.

2.3.1.5 Específicos de locus

Los primers microsatélites son diseñados en las regiones flanqueantes del motivo repetitivo lo que permite amplificar por PCR dicha región específica (locus), a diferencia de marcadores aleatorios como RAPD o AFLP en los cuales se desconoce las identidades de los loci amplificados (Tautz y Renz, 1984).

2.3.1.6 Transferibilidad

Los microsatélites han reportado altos niveles transferibilidad (éxito de amplificación cruzada) gracias a que las zonas donde se diseñan los primers, que son las secuencias flanqueantes al motivo repetitivo, suelen ser conservadas a través de la evolución permitiendo que con un par de primer diseñados para una especie en particular se pueda amplificar el mismo locus en otras especies estrechamente relacionadas. La amplificación cruzada de loci microsatélites ha tenido éxito en varios grupos vertebrados como peces (Rico et al., 1996; Silva, 2010; Rojas, 2011), aves (Primmer et al., 1996) y mamíferos (Schlötterer et al 1991).

2.3.2 Clasificación

Los microsatélites se clasifican de acuerdo al número de repeticiones del motivo. Por ejemplo, los motivos microsatélites del tipo di, tri y tetranucleótidos son los más populares para estudios de genética de poblaciones (Selkoe y Toonen, 2006). Otra clasificación es por la organización del motivo repetitivo:

Tabla 2. Clasificación de los microsatélites

TIPO	EJEMPLO
Microsatélite Simple Puro	(ACC) ₉
Microsatélite Simple Interrumpido	(ACC) ₆ AT (ACC) ₈
Microsatélite Compuesto Puro	(ACC) ₁₂ (TGG) ₅
Microsatélite Compuesto interrumpido	(ACC) ₁₂ AT (TGG) ₅ GA (TTA) ₆
Microsatélite Complejo	(ACC) ₈ TG (GA) ₁₂ (TTA) ₅ GC (TTA) ₄

2.3.3 Generación

El desarrollo de marcadores microsatélites para una especie requiere necesariamente de datos de secuencias las cuales se pueden obtener a partir de la construcción de librerías genómicas o a partir de un screening *in silico* de secuencias de genomas así como también de librerías de ESTs (Zane et al., 2002).

2.3.3.1 Microsatélites obtenidos a partir de librerías genómicas

Los métodos de aislamiento de microsatélites han mejorado con el tiempo y varios protocolos han sido publicados, siendo la metodología de generación de librerías genómicas enriquecidas el más usado en la actualidad (Ostrander et al., 1992; Canales-Aguirre et al., 2010; Marín et al., 2011; Sánchez, 2013)

2.3.3.2 Microsatélites derivados de librerías de ESTs

Los microsatélites detectados en ESTs (EST-SSRs), han sido reportados como menos variables que los microsatélites genómicos debido a que se encuentran en zonas

expresadas (codificantes), sin embargo presentan ventajas con respecto a los microsatélites genómicos (Qiu et al., 2009; Gupta et al., 2003):

1. Pueden detectar variación en la porción expresada del genoma, la cual podría ser de interés para estudios de asociación característica-marcador.
2. Pueden ser desarrollados sin costo a partir de base de datos de ESTs.
3. Poseen altos niveles de transferibilidad lo cual permite utilizarlos en un gran número de especies relacionadas debido a que las regiones flanqueantes (exones) son las secuencias más conservadas entre las especies.

2.3.4 Detección del polimorfismo

El polimorfismo de longitud de los microsatélites permite que los alelos puedan ser separados mediante electroforesis de poliacrilamida (Figura 5) o mediante electroforesis capilar. Este último se realiza en analizadores genéticos con cebadores fluorocromados con el cual es posible trabajar de forma multilocus (Lakshminarayana et al., 2007; Fresneda-Rodríguez et al., 2013). En los últimos años se está empleando la técnica del High Resolution Melting (HRM) la cual analiza la curva de melting de los amplicones microsatélite para la genotipificación (Ganaopolus et al., 2012; Xanthopoulou et al., 2014).

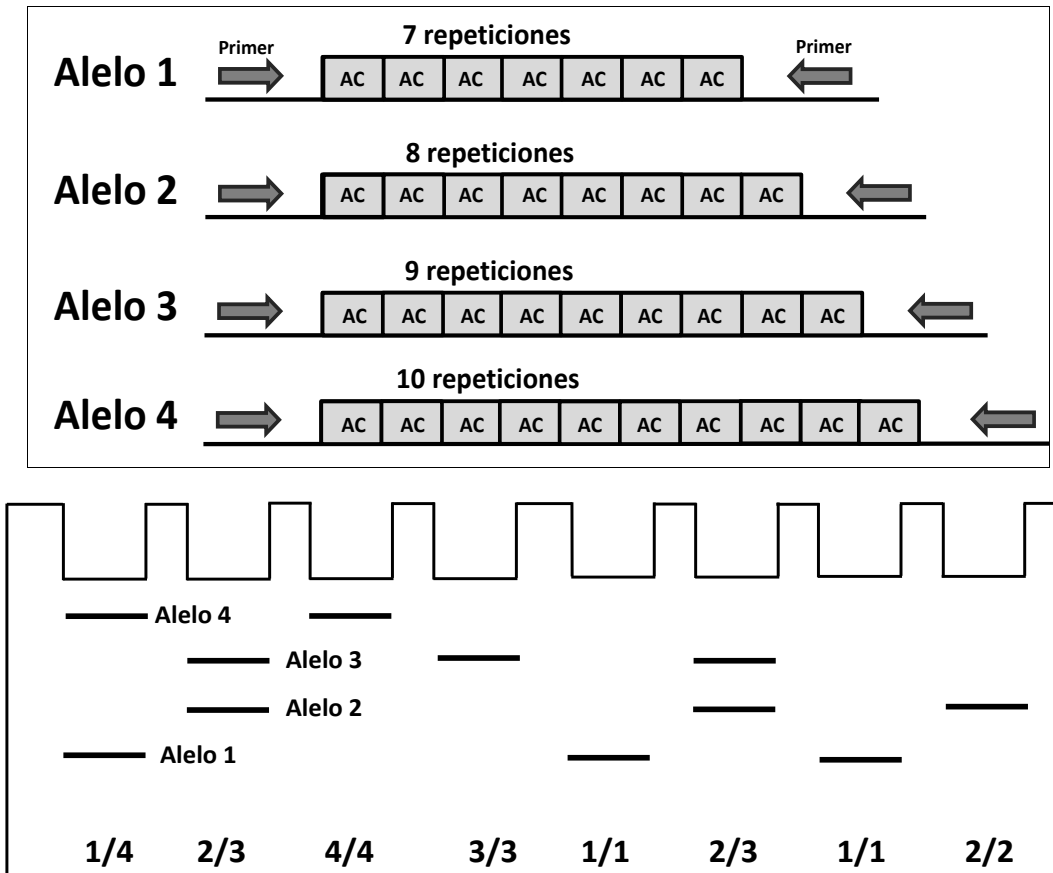


Figura 5. Polimorfismo de un microsatélite dinucleótido (AC)_n

2.3.5 Limitaciones

A pesar de sus reconocidas ventajas, los microsatélites pueden presentar limitaciones que disminuyen su sensibilidad y pueden conllevar a una incorrecta interpretación de los datos obtenidos:

2.3.5.1 Alelos nulos

Los alelos nulos son alelos no amplificados usualmente por una mutación en el sitio de unión de los primers. Si un alelo nulo se encuentra presente en un individuo heterocigoto se le puede genotipar erróneamente como homocigoto para el otro alelo (falsos homocigotos), lo cual provoca una subestimación de la heterocigosidad observada y ocasiona desvíos de las proporciones esperadas para el EHW. El diseño

de primers alternativos para el locus puede resolver este problema (Callen et al., 1993).

2.3.5.2 Efecto Stuttering

El efecto Stuttering (“bandas tartamudas”) es la amplificación no específica de fragmentos de tamaño similar al producto principal debido a errores de slippage cometidos por la ADN polimerasa durante la PCR (Levinson y Gutman, 1987; O’Reilly y Wright, 1995). Las bandas tartamudas (*stutter bands*), conocidas también como “artefactos” o “fantasmas”, dificultan enormemente el proceso de genotipificación (Hoffman y Amos, 2005) (Figura 6).

2.3.5.3 Dominancia de alelos pequeños

El fenómeno denominado “Short Allele dominance” o “Large allele dropout” se refiere a que alelos de gran tamaño no amplifican tan eficientemente como los alelos pequeños, lo cual genera el mismo problema que los alelos nulos porque no se detectan los heterocigotos y se estima incorrectamente las frecuencias alélicas (Wattier et al., 1998).

2.3.5.4 Homoplasia

Los alelos homoplásicos son alelos idénticos en longitud pero no en secuencia, o bien idénticos en longitud y secuencia pero con diferente historia evolutiva. Este tipo de polimorfismo es detectable únicamente con secuenciamiento (Jarne y Lagoda, 1996).

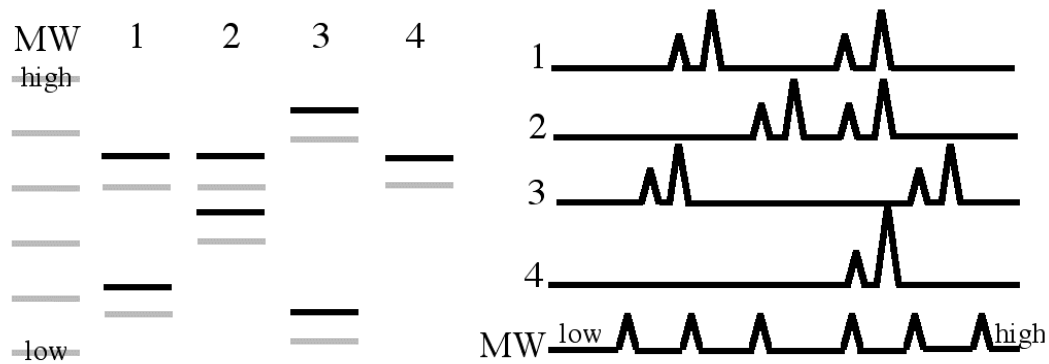


Figura 6. Efecto Stuttering. Izquierda: las bandas negras indican a los alelos y las bandas grises a las bandas tartamudas. Derecha: los alelos aparecen como picos más altos que los productos Stutter.

(Fuente: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/microsatellite.html>)

2.4 Diversidad Genética

La diversidad genética es la cantidad o suma de la variación genética presente en una población o especie como consecuencia de su evolución (Koski et al, 1997). La variación genética se define a su vez como las diferencias genéticas entre individuos o entre poblaciones de una especie. La diversidad genética actúa como un reservorio que permite a las poblaciones adaptarse a los cambios ambientales. Altos niveles de variación genética incrementan el potencial de las poblaciones a responder a selección y mantener la salud de los individuos. La diversidad genética es estimada mediante parámetros o índices que cuantifican la variación genética (polimorfismo) encontrada en los marcadores moleculares empleados, y resumen toda esa información en términos numéricos mucho más manejables.

2.4.1 índices de diversidad genética basados en secuencias de ADN

Los índices de diversidad genética en base a polimorfismos de secuencias utilizan las generalmente las frecuencias de los haplotipos.

2.4.1.1 Número de sitios polimórficos, variables o segregantes (S): se refiere al número de posiciones en la secuencia que presentan por lo menos un polimorfismo.

2.4.1.2 Diversidad haplotípica (H_d) (Nei, 1987): es la probabilidad de que 2 haplotipos tomados al azar sean diferentes. Su valor es 0 cuando todas las secuencias son idénticas y 1 cuando cada secuencia es un haplotipo distinto. Es equivalente a la heterocigosidad esperada (H_e) para marcadores microsatélites. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$H_d = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum p_i^2 \right)$$

Donde, n = número de secuencias

p_i = frecuencia de cada haplotipo

2.4.1.3 Diversidad nucleotídica (π) (Nei y Li, 1979): es la probabilidad de que 2 nucleótidos en la misma posición (homólogos) tomados al azar sean diferentes. Se calcula determinando las diferencias nucleotídicas a pares de haplotipos ponderándolas con las frecuencias de éstos. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$\pi = \frac{2n}{n-1} \sum p_i p_j d_{ij}$$

Donde, n = número de secuencias

p_i = frecuencia del haplotipo i

p_j = frecuencia del haplotipo j

d_{ij} = proporción de nucleótidos diferentes entre los haplotipos i y j

2.4.2 Índices de diversidad genética basados en microsatélites (SSRs)

Los índices de diversidad genética para microsatélites se basan generalmente en las frecuencias alélicas. Los más utilizados son:

2.4.2.1 Riqueza alélica (RA): es el número promedio de alelos por locus. Es considerada la medida de diversidad genética más simple pues no depende de las frecuencias alélicas sino enteramente del tamaño de la población y del número de alelos observados.

2.4.2.2 Número efectivo de alelos (Ne) (Kimura y Crow, 1964): Hace referencia a los alelos capaces de pasar a la siguiente generación (efectividad alélica). Es una medida de los alelos que contribuyen a la heterocigosis de un locus. Se calcula como el recíproco de la suma de cuadrados de las frecuencias alélicas.

$$Ne = \frac{1}{\sum p_i^2} = \frac{1}{1 - He}$$

Donde, p_i = frecuencia del alelo i

2.4.2.3 Heterocigosidad Observada (Ho): Se define como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra. Se calcula por cómputo directo.

$$H_o = \frac{\text{Número de heterocigotos}}{n}$$

Donde, n = número de individuos en la población

2.4.2.4 Heterocigosidad Esperada (He) (Nei, 1973): Es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar en la población sean diferentes. Es la heterocigosidad para el locus si la población estuviera en Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW).

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

2.4.2.5 Heterocigosidad Esperada imparcial, normalizada, sin sesgo o Unbiased (uHe) (Nei, 1978): es la heterocigosidad esperada corregida para poblaciones con pequeño tamaño de muestra. Se calcula como:

$$uH_e = \left(\frac{2n}{2n-1}\right)H_e$$

Donde, n = número de individuos en la población

2.4.2.6 Coeficiente de endogamia (Fis): Indica el déficit de heterocigotos en una subpoblación o el total. Su valor oscila entre -1 (todos heterocigotos) y 1 (todos homocigotos). Fis < 0 (Exceso de heterocigotos), Fis = 0 (Equilibrio Hardy-Weinberg), Fis > 0 (Déficit de heterocigotos por exceso de homocigotos, endogamia o incidencia de alelos nulos). Se calcula como:

$$F_{IS} = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

2.4.2.7 Contenido de Información Polimórfica (PIC) (Botstein et al., 1980): Indica qué tan polimórfico (informativo) es un locus. Se calcula en base al número y frecuencia de los alelos. PIC = 0 (locus monomórfico), PIC < 0.25 (ligeramente informativo), 0.5 > PIC > 0.25 (razonablemente informativo), PIC > 0.5 (altamente polimórfico),

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2\right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

2.5 Estructura Genética

Hay que diferenciar la estructura genética de la estructura demográfica. La estructura demográfica está determinada por eventos asociados al nacimiento, muerte, dispersión, historia de vida y sistema de apareamiento, y solo puede ser estudiada

mediante censos y observaciones sin necesidad de incluir aspectos genéticos en el estudio (Slatkin, 1994). La estructura genética, en cambio, se refiere a la distribución de la diversidad genética (genotipos, alelos, o haplotipos) en el espacio y tiempo, dentro y entre las poblaciones de una especie. La estructura genética está determinada, aparte de la estructura demográfica, por procesos genéticos como la selección, recombinación, mutación, deriva génica y flujo génico. Por ello, para determinar la estructura genética, es necesario comprender el patrón de variación genética de la especie (Slatkin, 1994). Las dos fuerzas evolutivas principales que moldean la estructura genética de las poblaciones son la deriva génica y el flujo génico (migración) (Templeton, 2006).

El estudio de la estructura genética de una especie es de vital importancia porque permite identificar poblaciones que requieren ser consideradas como distintas unidades de manejo ya sea para su conservación o para su explotación. A los peces marinos de interés pesquero se les suele dividir en poblaciones llamadas stocks, que son poblaciones autosustentadas con áreas propias de desove y circuitos de migración característicos, y cuya identificación es crucial para una gestión pesquera efectiva y se pueda prevenir el colapso de los stocks con menor diversidad genética (Allendorf et al., 1987; Mustafa, 1999).

2.5.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW)

Uno de los supuestos básicos para analizar la estructura genética es que el locus o los loci utilizados tengan un comportamiento neutral con respecto a la selección natural, es decir, que la población bajo este marcador esté en Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW), el cual es un estado ideal donde la población tiene un tamaño infinito, cruzamiento al azar (panmixis), no mutación, no migración, no selección y no deriva génica. Bajo estas

condiciones las frecuencias alélicas de dicho(s) marcador(es) en la población se mantienen teóricamente constantes de generación en generación.

2.6 Estudios taxonómicos y filogenéticos en el género *Scomber*

Scomber japonicus al ser la especie más extendida del género *Scomber* es simpátrica con *Scomber scombrus* y *Scomber colias* en el Atlántico Norte, y con *Scomber australasicus* en el Pacífico Sudeste. Scoles et al (1998) e Infante et al (2007) usando Región Control mitocondrial y el gen 5SrDNA respectivamente reconocieron a *Scomber colias* como una especie separada de *Scomber japonicus*. Zardoya et al (2004) mostraron diferencias en la estructuración genética basadas en análisis de ADN mitocondrial en las poblaciones de *Scomber japonicus* y *Scomber scombrus* del Atlántico y mar Mediterráneo. Catanese et al (2010) reportaron los genomas mitocondriales completos de *S. colias*, *S. japonicus* y *S. australasicus* concluyendo que *Scomber colias* es una especie simpátrica con *Scomber japonicus*. La sistemática y relaciones filogenéticas de las especies del género *Scomber* fueron finalmente esclarecidas por Cheng et al (2011) en base a los marcadores Citocromo oxidasa I, Citocromo b, Región Control y 5SrDNA quienes confirmaron la monofilia del género *Scomber* y que *Scomber japonicus* es genéticamente más cercano a *Scomber australasicus* que a *Scomber colias*. Adicionalmente, la concordancia filogenética encontrada entre las secuencias mitocondriales y nucleares sugirieron al Océano Atlántico como centro de origen del género *Scomber* y una sucesión de múltiples rutas de migración como principal hipótesis para explicar la actual distribución geográfica de sus especies.

2.7 Estudios genético-poblacionales en *Scomber japonicus*

Tzeng et al (2007) estudiaron la estructuración poblacional de *Scomber japonicus* en el mar de Taiwán basándose en la secuencia completa de la Región Control mitocondrial. Sus resultados mostraron escasa diferenciación genética entre las poblaciones analizadas y sugirieron la presencia de un único stock genético, en contraste con la hipótesis previa de dos stocks basada en datos morfométricos y alozimas (Lin, 1998; Tzeng y Yeh, 2007). Yagishita y Kobayashi (2008) aislaron 9 loci microsatélites para *Scomber japonicus* y Tang et al (2009) aislaron 10 microsatélites para *Scomber australasicus* de los cuales 9 fueron de utilidad en *Scomber japonicus*. Cha et al (2010) aislaron otros 8 loci microsatélites para *Scomber japonicus* con el método de librerías genómicas enriquecidas. Usando la misma metodología, Zeng y Cheng (2012) aislaron 30 nuevos loci microsatélites. Zeng et al (2012) emplearon los microsatélites generados por Yagishita y Kobayashi (2008) y por Cha et al (2010) para evaluar la estructura poblacional de *Scomber japonicus* en el mar de China. Cheng et al (2014) evaluaron la diversidad y estructura genética de *Scomber japonicus* en el mar de China empleando 15 loci generados por Zeng y Cheng (2012). En el mar argentino se han designado dos stocks de caballa en base a ocurrencias estacionales, comportamiento, parámetros de crecimiento, fauna parasitaria y características morfométricas (Perrotta y Aubone, 1991; Cremonte y Sardella, 1997). Las diferencias entre dichos stocks de caballa, separados por la Latitud 39° Sur, fueron comprobadas posteriormente mediante análisis de alozimas (Roldán et al., 2000).

La caballa de la costa occidental de Sudamérica (Panamá, Ecuador, Perú, y Chile) no reporta estudios de genética poblacional hasta la fecha. Sin embargo, estudios no moleculares sugieren un grado de diferenciación: Individuos de caballa provenientes del mar de Ecuador presentaron un crecimiento más acelerado que los individuos del

mar de Chile, y dicha diferencia fue claramente visible en el mayor número de anillos hialinos de otolitos de individuos provenientes de Ecuador que de los individuos de Chile (Menz y Pizarro, 1998). Datos sobre áreas de desove y distribución de larvas sugieren la existencia de dos stocks de caballa: Stock Centro-Norte del Perú y Stock Sur de Perú - Norte de Chile (Serra et al., 1982). Dawson (1986) basado en parámetros de crecimiento sugirió dos stocks de similar distribución: uno en el mar de Ecuador y el norte del Perú, y el otro ocupa las aguas del sur del Perú y Chile.

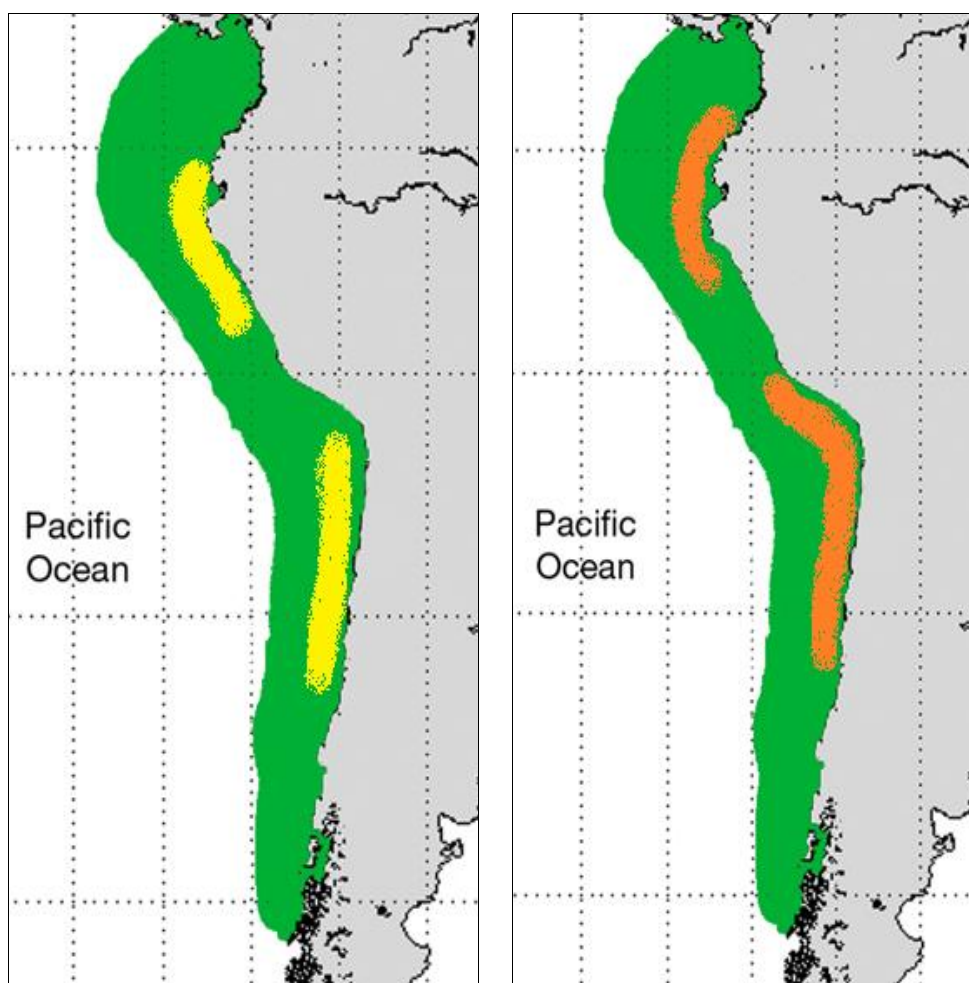


Figura 7. Hipótesis de los dos stocks de la caballa del Pacífico Sudoriental
Izquierda: Hipótesis de Serra (1982). Derecha: Hipótesis de Dawson (1986).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Si las diferencias genéticas detectadas con marcadores tanto mitocondriales y nucleares entre las poblaciones del norte, centro y sur del Perú de *Scomber japonicus* “caballa” son estadísticamente significativas, entonces es posible la existencia de más de un stock de este recurso en el mar peruano.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la estructuración genético-poblacional de la caballa (*Scomber japonicus*) en el mar peruano en base al marcador mitocondrial Región Hipervariable I (Región Control) y marcadores microsatélites.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar una metodología de extracción de ADN en *Scomber japonicus*.
- Estandarizar las reacciones de PCR para cada marcador genético.
- Obtener las secuencias del marcador mitocondrial y los genotipos microsatélite de cada individuo para estimar la diversidad genética local y total de la caballa en el mar peruano.
- Evaluar la estructura genética de la caballa en el mar peruano.

4. METODOLOGÍA

4.1 Muestreo

Las localidades escogidas para el muestreo fueron puntos geográficos representativos de la costa peruana: Paita (Norte), Ventanilla (Centro) e Ilo (Sur) (Tabla 3, Figura 8). El criterio de selección de localidades se basó en la naturaleza de la especie pues al ser un pez pelágico presenta un patrón de aislamiento por distancia, por lo cual se espera que individuos muestreados en localidades extremas muestren entre sí mayor divergencia genética que individuos más cercanos. Los individuos fueron comprados en cada puerto asegurando que hayan sido capturados en la zona geográfica correspondiente (Tabla 3).

Tabla 3. Datos de colecta

Localidad	Zona	Referencia	Coordenadas	n	Colector	Fecha
Paita	Norte	Muelle pesquero	05° 05' S 81° 06' W	25	Sergio Barahona	Marzo, 2013
Ventanilla	Centro	Terminal pesquero	11° 59' S 77° 07' W	25	Sergio Barahona	Enero, 2013
Ilo	Sur	Puerto de Ilo	17° 38' S 71° 20' W	25	Sergio Barahona	Febrero, 2014

n: número de individuos

4.2 Procesamiento de muestras

El procesamiento consistió en seccionar un fragmento de músculo esquelético dorsal proveniente del lomo de cada individuo. Se escogió el tejido muscular para la extracción de ADN por tener ciertas ventajas con respecto a otros tejidos:

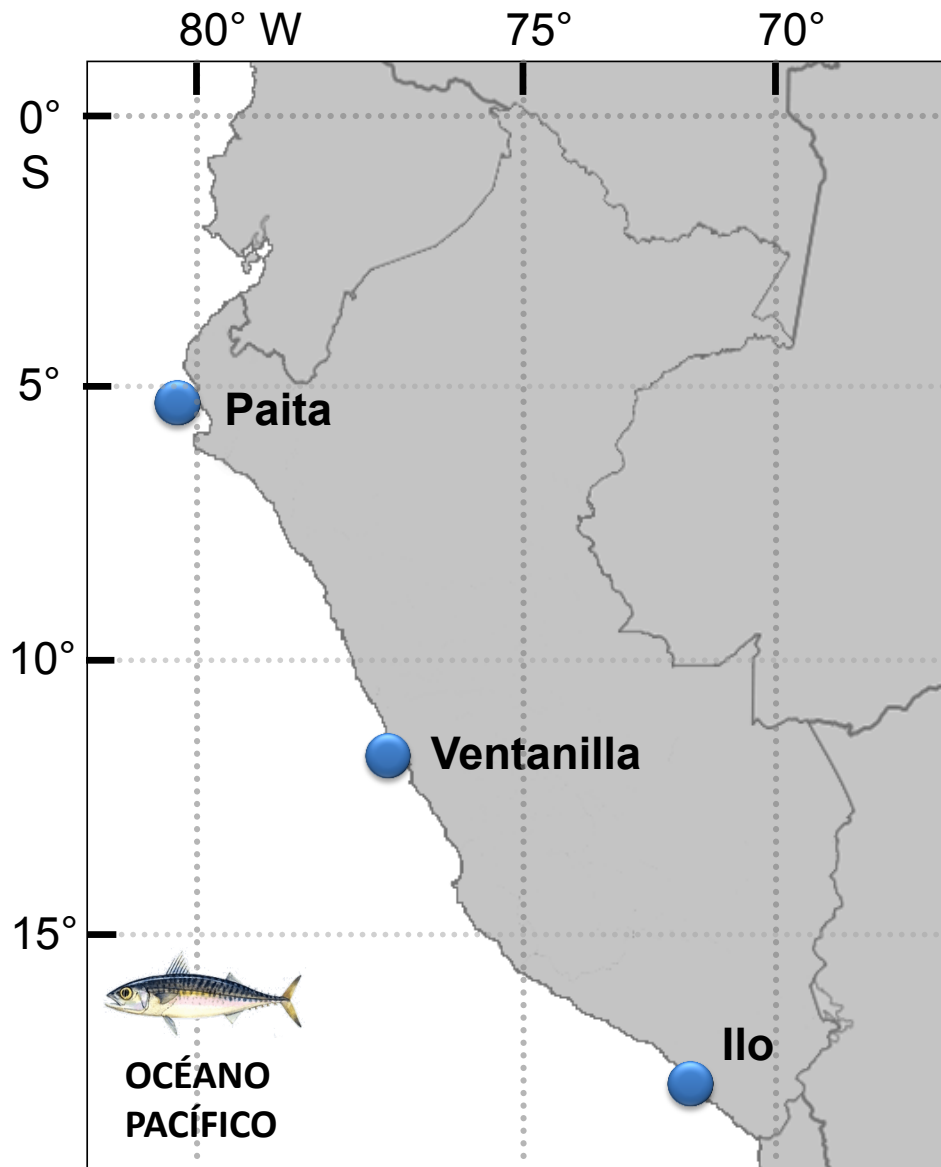


Figura 8. Puntos de muestreo de caballa en la costa peruana

- 1) Es un tejido de fácil acceso y es el más abundante.
- 2) A diferencia del tejido hepático no presenta toxinas o metabolitos secundarios que puedan interferir con las posteriores pruebas genéticas.
- 3) Al ser el tejido responsable de la locomoción, clave para esta especie pelágica-migratoria, el ADN a extraer es en su mayoría mitocondrial.

Debido a que el músculo de la caballa es muy vascularizado y presenta un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (Tornaritis et al., 1993), el fragmento fue lavado y deshilachado con pinzas en presencia de buffer TE 20:5 hasta que su tonalidad roja cambie a blanca y ya no libere aceite. El lavado permite eliminar sustancias que puedan interferir en el proceso de extracción y el deshilachado por su parte favorece a que el alcohol penetre y difunda con mayor facilidad en el interior del tejido deshidratándolo con mayor eficiencia, evitando de esta manera que se descomponga desde el interior y se degrade el ADN. Los tejidos fueron secados, colocados dentro de viales y almacenados en etanol absoluto a una temperatura de -4°C en el Laboratorio de Ecología Molecular y Biodiversidad Acuática (FFCCBB-UNMSM).

4.3 Extracción de ADN

El aislamiento de ADN es el primer paso en cualquier estudio de genética molecular, y la metodología a emplearse depende del tipo de muestra, la disponibilidad de reactivos y el equipamiento del laboratorio. Un método rápido para la extracción de ADN es el Salting Out (Aljanabi et al., 1997), el cual fue llevado a cabo siguiendo el protocolo original y además fue modificado con respecto a la composición del Buffer de Homogenización, la sal y la solución de Resuspensión (Tabla 25). El protocolo modificado se explica a continuación en detalle:

1. Una pequeña cantidad de tejido muscular (almacenado en etanol absoluto) fue colocado en una placa Petri para ser lavado y triturado en Buffer TE 20:5 repetidas veces con ayuda de pinzas estériles hasta asegurarse de que la muestra ya no contenga alcohol. En este paso se rehidrata el tejido eliminando todo rastro de alcohol que pueda interferir con el posterior proceso de lisis. 50-100 mg de tejido seco fue introducido en un tubo de 1.5 ml estéril.

2. Se adicionó a cada tubo 400 μ l de Buffer de Homogenización TNE-UREA (ver composición en Anexo 4) y se disgregó el tejido con ayuda de una varilla estéril por un tiempo de 30-60 segundos. Luego se adicionó 100 μ l de SDS 10% (concentración final 2%) y 10 μ l de Proteinasa K 20 mg/ml (concentración final 400 μ g/ml). Se incubó a 60°C por un tiempo mínimo de 1 hora con agitaciones ocasionales. La lisis consiste en el rompimiento de las células por acción de un detergente (SDS) el cual solubiliza las membranas, y la acción de la enzima Proteinasa K la cual degrada proteínas, liberándose finalmente el ADN tanto nuclear como mitocondrial. Los pasos posteriores a la lisis consisten en separar el ADN de los restos celulares o “debris” (proteínas digeridas, lípidos, etc).
3. Se adicionó al lisado el mismo volumen de Acetato de Amonio 10M (concentración final 5M), se invirtió el tubo gentilmente por 1 minuto y se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos. En este paso todas las proteínas pierden su solubilidad debido a la gran cantidad de sal (salting out) y precipitan luego de la centrifugación. En el sobrenadante quedan los ácidos nucleicos.
4. Se rescató lo máximo posible de sobrenadante y se trasvasó a otro tubo. Se adicionó al sobrenadante el doble de volumen de etanol absoluto frío y se incubó por 1 hora a - 20°C para precipitar el ADN con mayor eficiencia. Se centrifugó a 12000 rpm por 30 minutos.
5. El pellet de ADN fue lavado con 1 ml de Etanol 70% por 1 minuto para eliminar las sales adheridas a los grupos fosfato. Se lavó el pellet dos veces y entre cada lavada se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos para fijar el pellet al fondo del tubo. El pellet fue secado en una estufa a 40°C por una hora.

6. El pellet seco fue resuspendido en 200 μ l de buffer TE 20:1 (Tris 20M, EDTA 1mM) y almacenado a -20°C .

Para verificar la integridad del ADN extraído, se mezcló 5 μ l de ADN de cada individuo con 2 μ l de Loading Buffer y cargado en un gel de agarosa 1% de 5 mm de espesor y se dejó correr a 100 voltios por 30 minutos. Terminada la corrida el gel fue teñido con bromuro de etidio (5 mg/ml), visualizado en un transiluminador UV y registrado fotográficamente con una cámara digital Canon Power Shot SD78IS. El ADN genómico íntegro debe observarse como una banda superior cercana al pocillo.

Se cuantificó la concentración de ADN (ng/ μ l) y la relación ADN/Proteína (A260/A280) usando con un espectrofotómetro NanodropTM (Thermo Fisher Scientific, Inc). Se prepararon alícuotas de ADN las cuales fueron llevadas a una concentración final de 25 ng/ μ l para utilizarlas como soluciones de trabajo.

4.4 Región Control Mitocondrial

4.4.1 Reacción en cadena la Polimerasa (PCR)

Para amplificar la Región Control completa de *Scomber japonicus* con el cebador reverse HARN12S (Oré, 2011) fue diseñado en el presente estudio el cebador forward **L-Serg** (Tabla 4) empleando el genoma mitocondrial completo y anotado de *Scomber japonicus* (Accession Number: AB488405.1). Para el diseño se usó la herramienta OligoAnalyzer 3.1 de IDT (<http://www.idtdna.com/Scitools/Scitools.aspx>) asegurando que los valores de los Delta G (kcal/mol) para hetero-dimer, self-dimer y hairpin sean valores negativos los más cercanos a cero. El primer forward L-Serg se ancla al gen tRNA^{Thr} y el primer reverse HARN12S al gen 12SrRNA (Figura 9). Para estimar el tamaño final del amplicón, se alinearon las secuencias del primer L-Serg y el reverse complement del primer HARN12S con el genoma mitocondrial *Scomber japonicus*

(Accession Number: AB488405.1) empleando la herramienta ClustalW disponible en BIOEDIT 7.0.5.3 (Hall, 1999).

Tabla 4. Primers empleados para amplificar la Región Control en *Scomber japonicus*

Primer	Dirección	Secuencia (5' → 3')	Referencia
L-Serg	Forward	CTCAGCGTTTAGAGCATCGGTC	Este estudio
HARN12S	Reverse	GGGCTGGCACGAGTTTTACCG	Oré, 2011

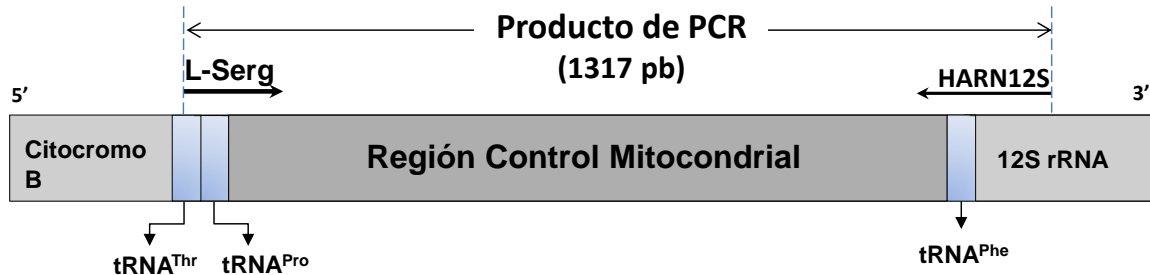


Figura 9. Sitios de hibridación de los primers L-Serg y HARN12S en el genoma mitocondrial de *Scomber japonicus*. El primer L-Serg se ancla al gen tRNA^{Thr} y el primer HARN12S al gen 12SrRNA.

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un Termociclador Automático GeneAmp modelo 2720 de Applied Biosystems. La estandarización fue realizada ajustando las concentraciones finales de MgCl₂ y de los primers, así como el programa de perfil térmico. Una reacción de PCR está estandarizada cuando las bandas de los productos de PCR aparecen en los geles de agarosa como únicas y sin inespecificidades. La reacción de amplificación estandarizada para la Región Control Mitocondrial, detallado en la Tabla 5, utiliza una elevada concentración de MgCl₂ (2.5 mM) para estimular la actividad de la Taq polimerasa y tiempos extensos (1min, 1min, 2min) debido al gran tamaño del amplicón (1317pb). Para conocer si se tuvo éxito en la amplificación, los productos de PCR fueron corridos juntos al genoma digerido del

Fago Lambda con la enzima de restricción PstI (Ladder λ PstI). Se mezclaron 5 μ l de producto de PCR con 2 μ l de buffer de carga (Loading Buffer 6X) y 1 μ l de Ladder con 1 μ l de Buffer de carga, los cuales fueron sembrados en un gel de agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio, visualizados en un transiluminador UV y registrados fotográficamente.

Tabla 5. Protocolo de amplificación de la Región Control

Reactivo	Concentración inicial [] ₀	Concentración final [] _F	X 1 tubo
Agua ultrapura	-	-	14.4 μ l
10XPCR	10X	1X	2.5 μ l
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	2.5 μ l
dNTPs	10 mM	1 mM	2.5 μ l
Primer L-Serg	10 μ M	0.2 μ M	0.5 μ l
Primer HARN12S	10 μ M	0.2 μ M	0.5 μ l
Taq DNA Polimerasa	5 U/ μ l	0.5 U	0.1 μ l
ADN	25 ng/ μ l	50ng	2 μ l

V_F = 25 μ l

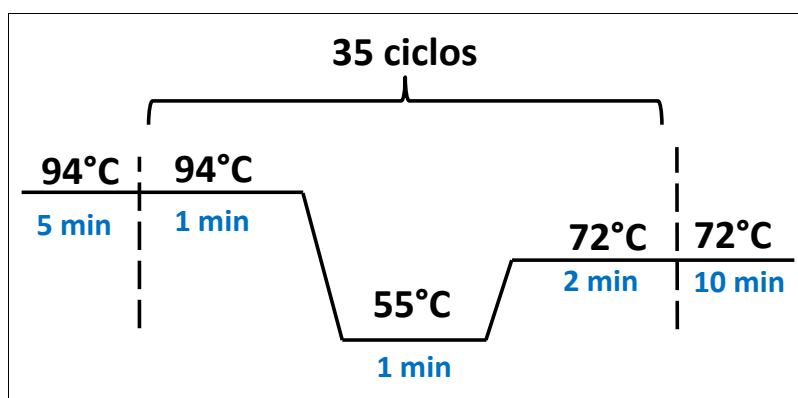


Figura 10. Programa de amplificación de la Región Control Mitocondrial

4.4.2 Secuenciamiento

Los productos de PCR que presentaron bandas sin inespecificidades y de gran intensidad fueron transferidos a tubos de 1.5 ml, rotulados, sellados con películas Parafilm y enviados a la empresa MACROGEN USA el cual ofrece los servicios de purificación y secuenciamiento. Los amplicones fueron secuenciados en dirección Forward con el cebador L-Serg.

4.4.3 Revisión de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con la Herramienta BLASTN del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para corroborar que pertenezcan a la especie esperada. Todos los electroferogramas fueron luego sometidos a una revisión minuciosa de manera manual usando el programa BIOEDIT 7.0.5.3. Los electroferogramas de aquellos individuos que presentaron altos niveles de “ruido” (presencia de múltiples picos sobrelapados en cada posición nucleotídica en vez de un único pico por nucleótido) no fueron incluidos en el análisis. Se prosiguió con el alineamiento múltiple de secuencias usando la herramienta ClustalW disponible en BIOEDIT 7.0.5.3.

4.4.4 Identificación de la Región Hipervariable I (Dominio ETAS)

La región control completa fue delimitada alineando las secuencias obtenidas con el genoma mitocondrial completo anotado de *Scomber japonicus* (AB102724.1). Se prosiguió con la identificación del dominio Hipervariable I (HVI o Dominio ETAS) siguiendo la metodología propuesta por Lee et al (1995), quien identificó los tres dominios de la Región Control Mitocondrial en diferentes especies de peces.

4.4.5 Diversidad Genética

El alineamiento múltiple correspondiente a la Región Hipervariable I (HVI) fue convertido a formato fasta (.fas) y luego a formato nexus (.nex) con el programa DnasP v5.0 (Librado y Rozas, 2009) en el cual se pudo estructurar las secuencias en poblaciones y donde se exportó un archivo en formato Arlequín (.arp). Con el software ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) se calcularon los datos moleculares y los índices de diversidad genética para cada población: número de sitios polimórficos (S), número de transiciones (Ts), número de transversiones (Tv), número de sitios polimórficos privados, composición nucleotídica, diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π) y número promedio de diferencias a pares de individuos (k).

Adicionalmente, se realizó la curación de los sitios polimórficos, el cual consiste en la revisión minuciosa de los picos de electroferograma de todas las posiciones con variación nucleotídica para descartar aquellos sitios con bases nitrogenadas incorrectamente asignadas por el secuenciador (falsos positivos) o por la presencia de dos o más picos en dicha posición.

4.4.6 Análisis filogenético

Para conocer las relaciones filogenéticas entre los haplotipos se empleó el método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood) con 1000 réplicas de bootstrap (Felsenstein, 1985) usando el modelo de sustitución sugerido por el software jModeltest v0.1.1 (Posada, 2008) siguiendo el criterio de información de Akaike (AIC) (Akaike, 1973). Adicionalmente, se construyó un árbol Neighbor Joining (NJ) empleando el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980) con 1000 réplicas de bootstrap. Para la construcción de ambos árboles filogenéticos se usó el programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007). Como grupo externo se consideró a

Scomber australasicus (Accession Number: AB102725), considerada la especie más cercana a *Scomber japonicus*.

4.4.7 Network

Las relaciones genealógicas fueron examinadas mediante una red de haplotipos construido con el software NETWORK 4.6.1.2 empleando el método Median Joining (Bandelt et al., 1999). El tamaño de cada haplotipo están en relación directa con su frecuencia en la población y las conexiones con otros haplotipos permiten visualizar la variación genética intrapoblacional.

4.4.8 Historia demográfica

Eventos de expansión poblacional en la caballa peruana fueron investigados con los test de neutralidad y la Distribución Mismatch. Los tests de neutralidad son estadísticos que evalúan si las secuencias han evolucionado al azar (neutralmente) o si han sido influenciadas por eventos de selección, contracción o expansión, es decir, detectan desviación de la hipótesis nula de evolución neutral. Los test de neutralidad más empleados son el Estadístico D de Tajima (Tajima, 1989), el estadístico F_s de Fu (Fu, 1997), el estadístico D^* de Fu y Li (Fu y Li, 1993) y el estadístico R_2 (Ramos-Onsins y Rozas, 2002).

El estadístico D de Tajima compara dos parámetros de diversidad genética: la diversidad nucleotídica (π) y el parámetro Theta S (θ_s). La diversidad nucleotídica (π) está en relación directa con la frecuencia de los haplotipos mientras que θ_s se incrementa a mayor cantidad de haplotipos raros por aparición de sitios polimórficos nuevos. Bajo la hipótesis nula de estabilidad poblacional, la diferencia estadística entre estos valores (D) puede ser usada para inferir la historia demográfica de una población. Si $D = 0$ significa que las secuencias mutan de manera aleatoria, mientras que valores

diferentes a cero permiten el rechazo de hipótesis nula de estabilidad poblacional: $D < 0$ significa que hubo una expansión poblacional reflejada en el exceso de haplotipos raros de baja frecuencia, y $D > 0$ indicaría la presencia de haplotipos frecuentes (selección positiva) y la carencia de haplotipos raros en la población.

El estadístico F_s de F_u , el cual se basa en la distribución de los haplotipos, es considerado el índice más poderoso para detectar cambios poblacionales cuando el tamaño de muestra es grande, a diferencia del estadístico R_2 de Ramos-Onsins y Rozas, considerado como el test con mayor poder estadístico para detectar expansión poblacional cuando los tamaños poblacionales son pequeños (Ramos-Onsins y Rozas, 2002). Valores negativos y significativos de F_s de F_u y de D^* de F_u y L_i , y valores positivos significativos de R_2 indican expansión poblacional.

Los índices de Tajima y F_s de F_u fueron calculados con ARLEQUIN 3.5 y los estadísticos D^* de F_u y L_i y R_2 fueron calculados con el software DnaSP v5.0. Puesto que es imposible calcular el p-value exacto asociado a estadísticos, el nivel de significancia fue estimado con 1000 simulaciones de coalescencia en el software DnaSP v5.0.

La Distribución Mismatch es un histograma que evalúa la distribución de las diferencias a pares de secuencias comparándola con una distribución esperada bajo un modelo neutro (tamaño poblacional constante o expansión poblacional). Una distribución mismatch de tipo unimodal (en forma de campana) indicaría un evento de expansión poblacional luego de un cuello de botella o un efecto fundador ancestrales, mientras que una distribución mismatch multimodal (errática) reflejaría un escenario de tamaño poblacional estacionario (equilibrio demográfico), subdivisión poblacional o un cuello de botella reciente (Rogers, 2002).

La distribución mismatch de las secuencias fue obtenida con el software ARLEQUIN 3.5 y fue comparada bajo un modelo de tamaño poblacional constante y un modelo de expansión poblacional. Con la finalidad de evaluar si la distribución observada se desvía de la esperada bajo el modelo de expansión poblacional, se realizó una prueba de bondad de ajuste (Goodness of fit) con el índice de Desigualdad de Harpending (*Harpending's raggedness index* o Hri; Harpending, 1994) y la Desviación de la Suma de Cuadrados (*sum of squared deviation* o SSD, Schneider y Excoffier, 1999) con 1000 réplicas de bootstrap usando el software ARLEQUIN 3.5. Valores bajos de Hri son típicos de una población en expansión, mientras que valores altos son observados en poblaciones en equilibrio o en cuello de botella. Si ambos índices resultan no significativos ($p > 0.05$) indica que la distribución mismatch observada se ajusta a un modelo de expansión poblacional, y si resultan significativos ($p < 0.05$) se rechaza la hipótesis nula de expansión poblacional.

Se calcularon los parámetros de expansión demográfica: θ_0 , θ_1 y tau con 1000 réplicas de bootstrap usando ARLEQUIN 3.5. Con la finalidad de estimar la fecha aproximada de la expansión poblacional se utilizó la fórmula **tau = 2ut** (Rogers y Harpending, 1992), donde **tau** es el tiempo estimado en unidades mutacionales desde que inició la expansión, **t** es el tiempo en generaciones desde que inició la expansión, y **u = $\mu \cdot k$** (Nei y Tajima, 1981) donde μ es la tasa de mutación y k es la longitud del marcador utilizado (292 pb). Debido a la carencia de una tasa de mutación (μ) reportada para la región control de escómbridos se asumieron los valores de 3.6% (3.6% sustituciones por sitio por millón de años = 3.6×10^{-8} sustituciones por sitio por año) sugerido por Donaldson y Wilson (1999) para la región control de peces del género *Centropomus*, y de 9.3% sugerido la región control de peces del género *Chromis* (Domingues et al., 2005). Se

consideró un tiempo generacional de 3.5 años que es la edad promedio de madurez sexual en la caballa.

4.4.9 Estructuración genética

La estructuración genética de *Scomber japonicus* fue evaluada usando el Análisis de Varianza molecular (AMOVA, Excoffier et al., 1992) en base a las frecuencias haplotípicas con 1000 permutaciones usando ARLEQUIN 3.5. La prueba del AMOVA establece cómo se encuentra estructurada la población y permite estimar el nivel de variación genética en cada jerarquía poblacional mediante porcentajes de varianza e índices de fijación: entre grupos de poblaciones (F_{CT}), entre poblaciones dentro de los grupos (F_{SC}) y dentro de las poblaciones (F_{ST}). Se evaluaron tres estructuraciones poblacionales: 1) Un solo grupo: Paita – Ventanilla – Ilo, 2) Dos grupos: Paita - Ventanilla vs Ilo, y 3) Dos grupos: Ventanilla - Ilo vs Paita. La diferenciación poblacional fue evaluada mediante distancias genéticas a pares de F_{ST} y con un test exacto de diferenciación poblacional con 100 000 pasos de cadenas de Markov y 100 000 pasos de depuración (del inglés: dememorization), usando ARLEQUIN 3.5

4.4.10 Test de Mantel

Se evaluó si la especie sigue un patrón de aislamiento por distancia con el Test de Mantel la cual correlaciona las distancias geográficas con las distancias genéticas (Mantel, 1967). Las distancias geográficas en Km lineales entre las tres localidades fueron calculadas con Google Earth y comparadas contra una matriz de distancias F_{ST} y contra una matriz de distancias F_{ST} linearizadas de Slatkin ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) (Slatkin y Hudson, 1991). Para calcular las distancias genéticas se usó ARLEQUIN 3.5, y la gráfica fue construida con el software GENALEX 6.5 (Peakall y Smouse, 2006) considerando 10000 permutaciones.

4.5 Microsatélites

Los microsatélites utilizados en la presente tesis fueron marcadores ya generados para la especie. El criterio de selección fue el número de alelos (N_A) y la heterocigosidad esperadas (H_e) reportadas para dichos marcadores. Los marcadores empleados se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Loci microsatélites empleados en este estudio

Locus	Motivo	Cebadores (5' → 3')	N_a	Referencia
SJT18	(CT) ₆ ⁻ (CT) ₆	F: TGCTCTGTTTCACCAATGT R: GAATCACACAGTGGGGCGA	16	Zeng y Cheng, 2012
SJT49	(GA) ₁₇	F: GTGTTGGGTGTAAAGGAGGA R: CAGAATCACGATGAAGAGCA	28	Zeng y Cheng, 2012
KSJl2	(TG) ₁₉	F: CTCCTAGTGACAAACCTCA R: CTCAACATCATCAACATTC	14	Cha et al., 2010
Scja02	(GA) ₄₀	F: CATTGCTTATGTTTCAGAGTGAAGTCC R: TGATCTGTTTTTAGTGAATGTCC	13	Yagishita y Kobayashi, 2008
Scja07	(CA) ₁₉	F: TCACCCTCACTACCAAGAGTTAGTC R: TCACCCTCACTACCAAGAGTTAGTC	28	Yagishita y Kobayashi, 2008

F: Primer Forward, R: Primer Reverse, N_a : Número de alelos reportados

4.5.1 Amplificación y Electroforesis

La amplificación por PCR del marcador microsatélite SJT18 fue estandarizada (Tabla 7). Las condiciones necesarias para la amplificación del marcador SJT49 también se estandarizaron para obtener los mejores resultados de bandas (Tabla 8).

Tabla 7. Protocolo de amplificación del locus SJT18

Reactivo	[] _o	[] _F	1 tubo
AGUA	-	-	18.64 µl
10XPCR	10X	1X	2.5 µl
MgCl ₂	25 mM	1 Mm	1.0 µl
dNTPs	10 mM	0.08 mM	0.2 µl
18F	10 µM	0.12 µM	0.3 µl
18R	10 µM	0.12 µM	0.3 µl
Taq Polimerasa	5 U/µl	0.30 U	0.06 µl
ADN	25 ng/µl	50 ng	2.0 µl

V_F = 25 µl

Tabla 8. Protocolo de amplificación del locus SJT49

Reactivo	[] _o	[] _F	1 tubo
AGUA	-	-	16.3 µl
10XPCR	10X	1X	2.5 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5 µl
dNTPs	10 mM	0.8 mM	2.0 µl
49F	10 µM	0.12 µM	0.3 µl
49R	10 µM	0.12 µM	0.3 µl
Taq Polimerasa	5 U/µl	0.50 U	0.10 µl
ADN	25 ng/µl	50 ng	2.0 µl

V_F = 25 µl

4.5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Los amplicones microsátélites fueron corridos en un sistema de electroforesis vertical de poliacrilamida denaturante al 6% usando una cámara electroforética modelo DASG-400 (C.B.S. Scientific Company, Inc. Del Mar, CA, U.S.A) y revelado mediante tinción

con nitrato de plata. La preparación del sistema de electroforesis se explica a continuación:

1. Ambos vidrios fueron minuciosamente lavados con agua corriente y detergente. Los vidrios fueron luego enjuagados con alcohol 96° para retirar todo rastro de grasa. El vidrio más grande (20 cm largo x 20 cm ancho) fue recubierto con 500 µl solución BIND (1µl BIND SILANE, 1 µl ácido acético puro y 498 µl de alcohol 96°) y el vidrio más pequeño (18cm largo x 20cm ancho) con solución REPEL. Este paso garantiza que el gel se adhiera al vidrio más grande. Luego de haber secado los vidrios, los dos separadores y el peine de dientes cuadrados (0.6 mm de grosor) fueron ensamblados y ajustados con precisión con ayuda de las abrazaderas (clamps).
2. Se vertió dentro de los vidrios 20 ml de acrilamida denaturante 6% (acrilamida 6%, TBE 1X, urea 9M grado Biología Molecular) catalizada con 100 µl de APS 10% (Persulfato de Amonio 10%) y 50 µl de TEMED puro (N, N, N', N'-Tetrametiletildiamina). Se dejó polimerizar por un tiempo de dos horas a temperatura ambiente, luego se ensambló el gel en la cámara vertical y se empezó la pre-corrída a 400 voltios durante 10 minutos. La pre-corrída lineariza las fibras de la matriz y pre-calienta el gel para recibir a los amplicones denaturados en Formamida.
3. Los productos de PCR fueron mezclados con Loading Buffer Formamida en cantidades "2ul:2ul" en tubos de PCR los cuales fueron sometidos a denaturación en el termociclador a 94°C por 5 minutos y enfriados rápidamente (shock térmico) para ser cargados finalmente en los pozos del gel.
4. Antes de cargar los productos de PCR todos los pozos fueron limpiados con la micropipeta debido a que la urea del propio gel tiende a acumularse. Una vez

iniciada la corrida a un voltaje de 400 voltios por dos horas (corrida en caliente), se anexó una plancha de aluminio detrás de uno de los vidrios para evitar el efecto sonrisa o *smiling effect*.

Finalizada la corrida, se retiró con cuidado el vidrio más pequeño (REPEL) y se inició el proceso de revelado con nitrato de plata:

1. El vidrio con el gel adherido (vidrio BIND) fue sumergido en solución fijadora (ácido acético 10% y etanol 10%) durante 15 minutos con agitación constante. Este paso permite que las bandas de ADN se fijen al gel de poliacrilamida y que los otros componentes (TBE, azul de bromofenol, xilencianol y urea) sean retirados de la matriz. Se enjuagó con agua bidestilada por 10 segundos.
2. Se sumergió en nitrato de plata 0.1% durante 30 minutos con constante agitación. Se lavó el gel rápidamente con agua bidestilada por 5 segundos.
3. El revelado se realizó con una solución de Hidróxido de sodio (NaOH) 1.5%-Formaldehído (HCHO) 1%. El revelado termina cuando la intensidad de las bandas permita la lectura de los alelos. El hidróxido de sodio otorga el medio básico necesario para que el formaldehído reduzca los iones plata (Ag^{+1}) a plata metálica (Ag^0), la cual se observa como un precipitado color marrón en las bandas y más clara en la matriz del gel.
4. El siguiente paso consistió en la neutralización de la matriz de poliacrilamida, la cual se encuentra alcalina por el hidróxido de sodio, con una Solución Stop que puede ser ácido acético o etanol. Se prefirió usar etanol 10% debido a que no “destiñe” el gel.
5. Finalmente se rehidrató el gel con agua destilada por 10 minutos. Se dejó secar el gel por un lapso de dos días antes de escanear.

4.5.3 Lectura de alelos y asignación de genotipos (genotipaje)

Los productos de de PCR fueron corridos varias veces en distinto orden para corroborar alelos y asignar genotipos a los individuos. Una vez obtenidos los genotipos, estos fueron ingresados al software GenAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2006) en el formato requerido y se exportaron archivos en formato genepop (.gen) y arlequín (.arp). Con el software Cervus 3.0.6 (Marshall, 1998) se convirtió el archivo genepop (.gen) a formato Cervus (.csv) y con el software Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002) a formato Fstat (.dat).

4.5.4 Diversidad genética

Las frecuencias alélicas, riqueza alélica (AR) y el índice Fis fueron calculadas con el software Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002). La heterocigosidad observada (H_o), la heterocigosidad esperada (H_e), la heterocigosidad esperada sin sesgo (uH_e) y el número efectivo de alelos (N_e) fueron calculadas con el software GenAlex 6.5, y el Contenido de Información polimórfica (PIC) fue calculada con Cervus 3.0.6 (Marshall, 1998)

4.5.4 Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW)

Se realizó el test de desviación de Equilibrio Hardy-Weinberg usando el test exacto de Cadenas de Markov con el software ARLEQUIN 3.5. Para el test se ajustaron 200000 pasos en la cadena de Markov más 3000 iteraciones de depuración.

4.5.5 Probabilidad de alelos nulos

La presencia de alelos nulos fue establecida con el software Cervus 3.0.6 (Marshall, 1998) el cual analiza la desviación del Equilibrio Hardy-Weinberg usando un algoritmo basado en la diferencia entre las frecuencias observadas y esperadas de los

homocigotos. Si la heterocigosidad esperada (H_e) es menor o igual a la Heterocigosidad observada (H_o), la probabilidad de alelos nulos es negativa o igual a cero. En caso contrario, la presencia de alelos nulos disminuiría la Heterocigosidad esperada y se incrementaría la homocigosidad. Los rangos de las probabilidades de alelos nulos son: $P(a.n) < 0.05$ (insignificante), $0.05 \leq P(a.n) \leq 0.20$ (moderada), $P(a.n) > 0.2$ (alta incidencia de alelos nulos).

4.5.6 Estructura genética

La estructura genética de la población fue evaluada con el test de AMOVA. Además se estimaron los niveles de diferenciación genética entre las localidades calculando los valores F_{ST} a pares y se realizó un test exacto de diferenciación poblacional con ARLEQUIN 3.5.

La distancia genética estándar de Nei (D) (Nei, 1972), definida como la lejanía genética entre dos poblaciones en base a las frecuencias alélicas, fue calculada con el software GenAlex 6.5.

4.5.7 Test de Mantel

Se realizó la correlación entre las distancias genética de Nei (D) a pares de poblaciones con las distancias geográficas para corroborar si la especie presenta un patrón de aislamiento por distancia.

5. RESULTADOS

5.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN empleando el método original de Aljanabi et al (1997) permitió obtener ADN altamente fragmentado el cual puede apreciarse en el gel agarosa 1% como un “smear” y/o una mancha inferior (Figura 11).

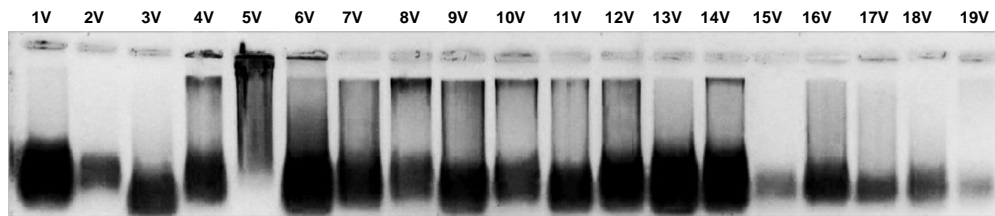


Figura 11. Extracción de ADN con el método de Aljanabi et al (1997)

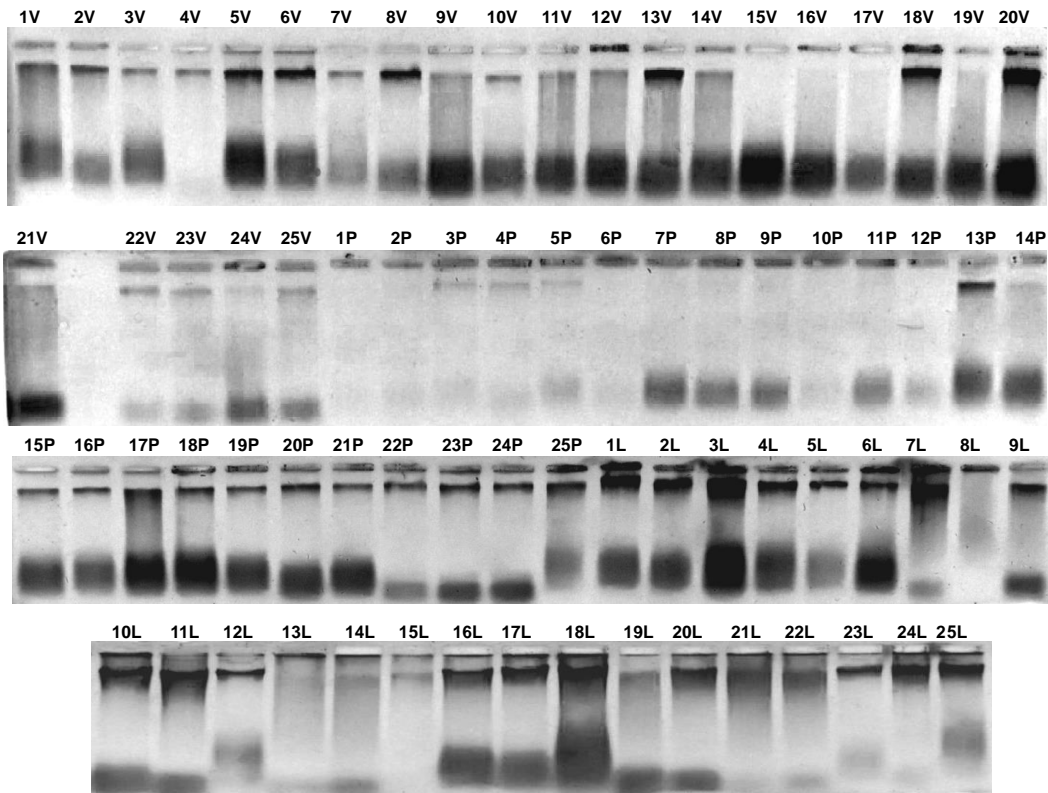


Figura 12. Extracción de ADN con la modificación propuesta (Códigos de los individuos para cada población: V (Ventanilla), P (Paita) y L (Ilo))

Con el método modificado se logró obtener ADN genómico de manera satisfactoria para todos los individuos empleados. En los geles de agarosa se observaron bandas de ADN genómico debajo del pocillo y un poco de ADN degradado como *smear* y también ARN visualizado como una mancha ovalada en la parte inferior (Figura 12). Las concentraciones de ADN en ng/μl y las purezas (A_{260}/A_{280}) se consideraron adecuadas para realizar las amplificaciones (ver Anexo 1, Tabla 27).

5.2 Región Control Mitocondrial

5.2.1 Amplificación por PCR

Los amplicones de la Región Control completa fueron visualizados como bandas únicas sin especificidades en geles de agarosa 2% y su peso (estimado en 1317 pb) corroborado con el ladder λ PstI (Figura 13).

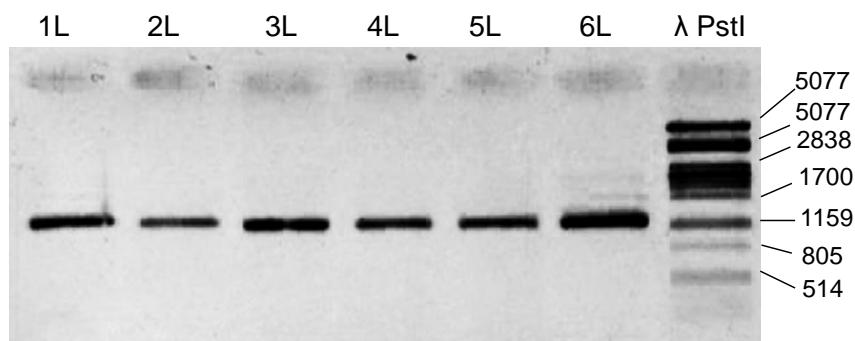


Figura 13. Amplicones de la Región Control mitocondrial (L: Individuos de Ilo)

5.2.2 Secuencias

Se obtuvieron las secuencias de todos los individuos amplificados, sin embargo tres secuencias correspondientes a la localidad de Ilo no fueron incluidas en el análisis: 1L y 15L por no presentar pico alguno en los electroferogramas y el individuo 22L por presentar exceso de “ruido” en su electroferograma (picos sobrelapados), por lo que la

población de Ilo solo tuvo 22 secuencias y el análisis bioinformático de la población total incluyó a 72 individuos con una excelente calidad de electroferograma (Figura 14).

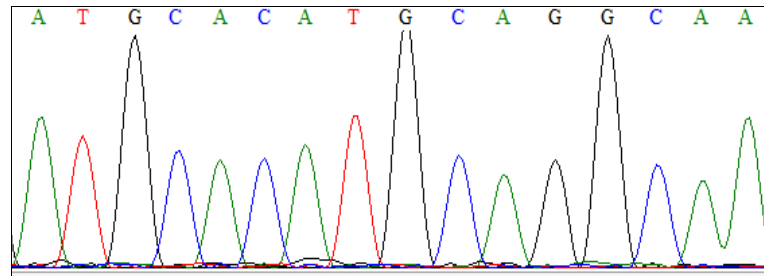


Figura 14. Fragmento de electroferograma de la HVI

5.2.3 Identificación de la Región Hipervariable I (HVI)

Se encontró que la Región Control completa de *Scomber japonicus* tiene un tamaño de 865 pb. Luego de realizar el proceso propuesto por Lee et al (1995) se identificó la Región Hipervariable I (HVI) (Figura 15), la cual tuvo una longitud de 292 pb.

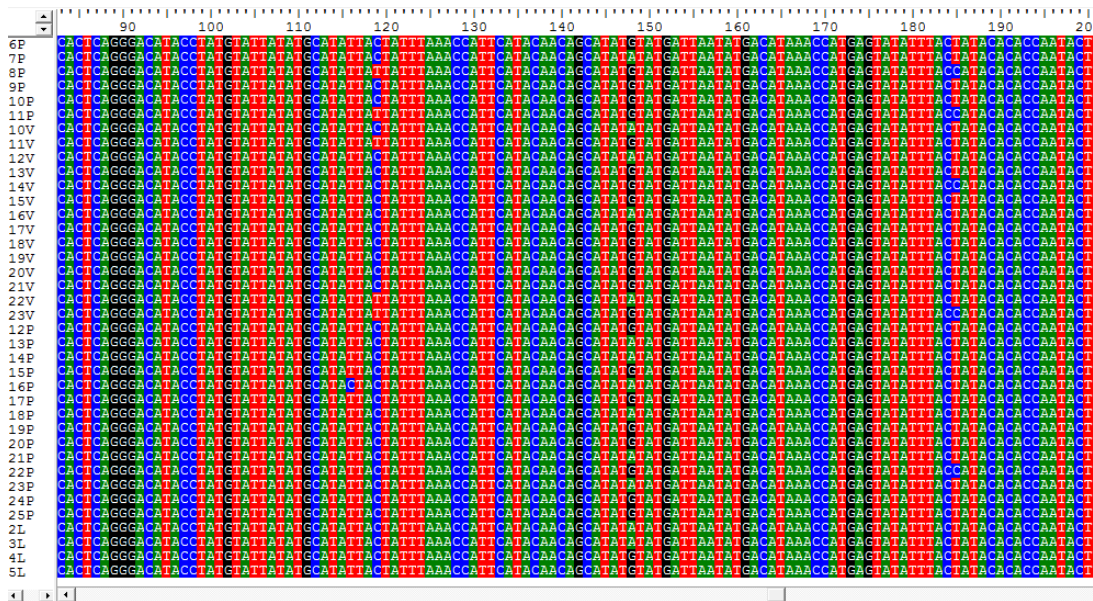


Figura 15. Porción del alineamiento múltiple de la Región Hipervariable I (HVI) de *Scomber japonicus*. Leyenda: P (Paíta), V (Ventanilla) y L (Ilo)

5.2.4 Diversidad genética

La Región Hipervariable I de *Scomber japonicus* del mar peruano presentó una composición nucleotídica promedio de 19.52% de C, 38.8% de A, 30.31% de T y 11.37% de G, evidenciando que es una región rica en AT (A+T ~ 69.11%). Al inicio se detectaron 21 sitios polimórficos pero luego de la curación (ver Anexo 2) se descartaron del análisis las posiciones 14 y 74 por ser detectados únicamente en el individuo 22L cuyo electroferograma presentó mucho “ruido” además de bases nitrogenadas incorrectamente asignadas por parte del secuenciador, por lo que estos dos sitios fueron considerados falsos y solo se trabajó con 19 sitios polimórficos restantes (Tabla 9). La distribución geográfica de los haplotipos encontrados también se resume en la Tabla 9. Para la población total se detectaron 26 haplotipos, de los cuales 4 (Haplotipos 1, 2, 3 y 4) fueron compartidos entre las tres poblaciones y se encontraron haplotipos privados para cada población. De los 19 sitios polimórficos, 17 fueron transiciones y 2 fueron transversiones siendo los sitios 18, 119, 148 y 237 los más frecuentes en la población total (Tabla 10). La población de Ilo fue la que presentó mayor número de sitios polimórficos propios y mayor número de haplotipos privados. No se detectaron indels (Tabla 11). Para el total de la población se tiene una diversidad nucleotídica muy baja ($\pi = 0.00941 \pm 0.00062$), y una alta diversidad haplotípica ($Hd = 0.859 \pm 0.032$). La población con la diversidad haplotípica más alta fue Ilo ($Hd = 0.957 \pm 0.029$), siendo la población más heterogénea aunque fue la población con menor número de secuencias incluidas en el análisis (22 secuencias) y es además la que posee la mayor diversidad nucleotídica (0.0121 ± 0.00102). La población de Paita con sólo 9 haplotipos (3 haplotipos privados) exhibe la menor diversidad haplotípica ($Hd = 0.717 \pm 0.09$) en donde el haplotipo 1 representó el 52% (13/25) de las secuencias encontradas (Tabla 9).

Tabla 9. Distribución y frecuencias de los haplotipos detectados en la Región Hipervariable I (292pb) de *Scomber japonicus* del mar peruano

Hap	Sitios de variación nucleotídica																Frecuencias haplotípicas			
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Paita (n = 25)	Ventanilla (n = 25)	Ilo (n = 22)	Total (n = 72)
H1	C	T	G	C	T	A	T	A	T	A	T	G	A	A	A	13 (0.52)	7 (0.28)	4 (0.181)	24 (0.333)	
H2	.	A	A	A	.	.	4 (0.16)	4 (0.16)	3 (0.136)	11 (0.152)	
H3	.	A	1 (0.04)	3 (0.12)	2 (0.090)	6 (0.0833)	
H4	C	2 (0.08)	2 (0.08)	1 (0.045)	5 (0.0694)	
H5	.	A	A	.	.	1 (0.04)	2 (0.08)		3 (0.0416)	
H6	.	A	A	.	.	C	A	.	.	1 (0.04)		1 (0.045)	2 (0.0277)	
H7	.	A	T	A	A	.	.	1 (0.04)	2 (0.08)	1 (0.045)	2 (0.0277)	
H8	.	A	G		2 (0.08)		1 (0.0138)	
H9	.	A	T	A	.	.		2 (0.08)		1 (0.0138)	
H10	G	.		2 (0.08)		1 (0.0138)	
H11	C		2 (0.08)		1 (0.0138)	
H12	.	A	G	.		2 (0.08)		1 (0.0138)	
H13		2 (0.08)		1 (0.0138)	
H14	.	A	A		2 (0.08)		1 (0.0138)	
H15	.	A	C	1 (0.04)			1 (0.0138)	
H16	C	1 (0.04)			1 (0.0138)	
H17	.	A	A	A	.	.	G			1 (0.045)	1 (0.0138)	
H18	A	.	.			1 (0.045)	1 (0.0138)	
H19	.	A	.	T			1 (0.045)	1 (0.0138)	
H20	.	A	.	.	C	C			1 (0.045)	1 (0.0138)	
H21	.	.	T	G	.			1 (0.045)	1 (0.0138)	
H22	.	A	G	.	.	.	A	.	G			1 (0.045)	1 (0.0138)	
H23	T	A	T	A	.	.	A	.	.			1 (0.045)	1 (0.0138)	
H24	.	A	T	A	G	.	A	.	.			1 (0.045)	1 (0.0138)	
H25	.	A	A	A	.	G			1 (0.045)	1 (0.0138)	
H26	.	A	.	.	C			1 (0.045)	1 (0.0138)	

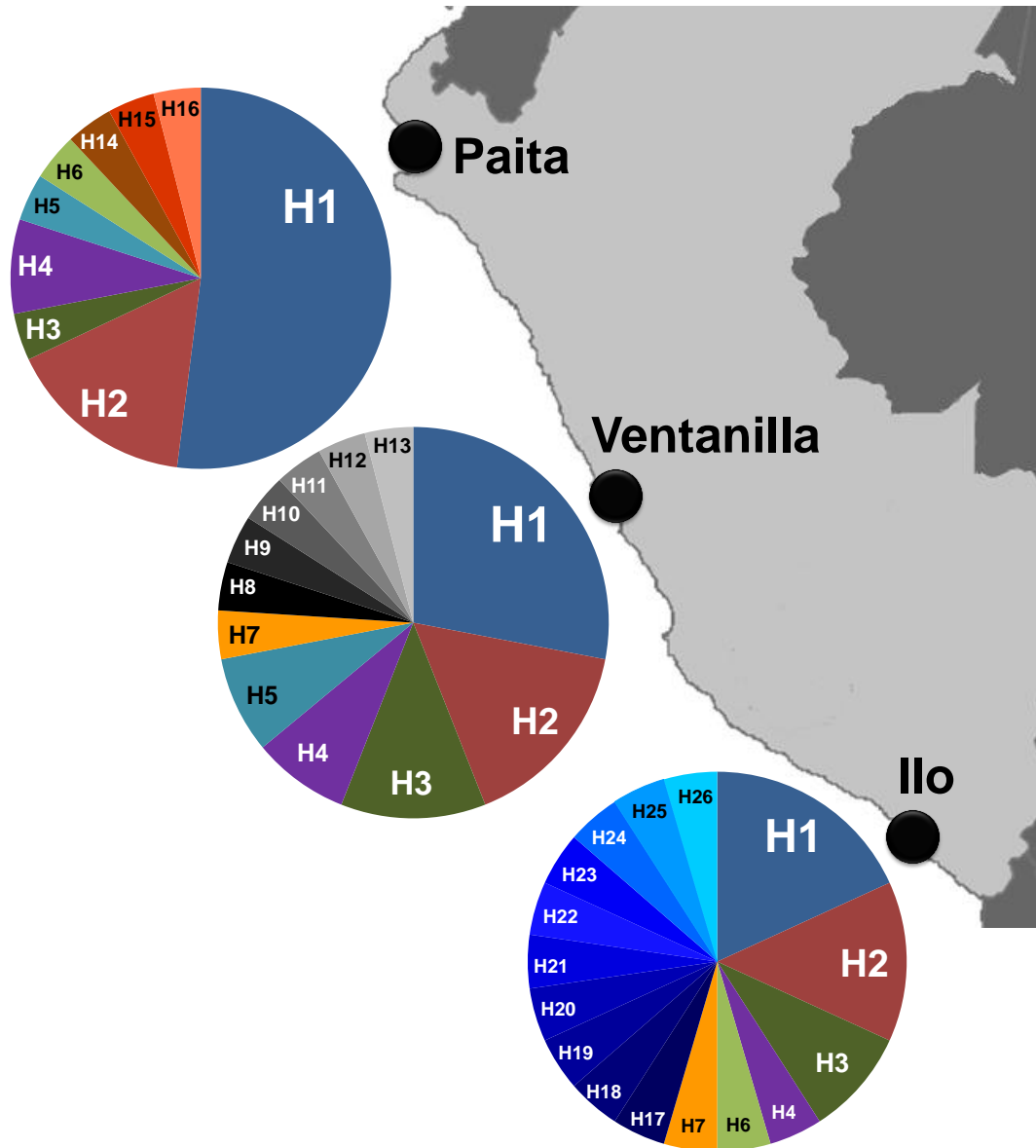


Figura 16. Distribución geográfica de los 26 haplotipos de HVI (292pb) de *Scomber japonicus* en el mar peruano. Los haplotipos privados están indicados en degradado de colores: Ilo (marrón), Ventanilla (grises) e Ilo (Azul)

Tabla 10. Frecuencias de los sitios polimórficos

					1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
	1	2	9	9	0	1	1	1	4	7	8	9	2	3	3	8	8	9	
4	8	6	7	8	5	5	6	9	8	7	5	0	7	6	7	1	2	2	
C/T	T/A	G/A	C/T	C/T	T/C	A/C	T/C	C/T	G/A	A/G	T/C	A/G	T/C	G/A	G/A	A/G	A/G	A/G	A/G
1	37	15	1	1	1	1	2	11	26	1	7	1	3	1	24	1	3	3	

Tabla 11. Caracterización molecular e índices de diversidad genética en base a la Región Hipervariable I (292 pb) en *Scomber japonicus*

DATOS MOLECULARES		Paita	Ventanilla	Ilo	Población Total
Número de secuencias (n)		25	25	22	72
Número de sitios polimórficos (S)		8	9	18	19
Número total de mutaciones (Eta)		8	9	18	19
Número de Singletons		1	2	12	9
Sitios parsimoniosamente informativos		7	7	6	10
Número de Transiciones (Ts)		7	8	16	17
Número de Transversiones (Tv)		1	1	2	2
Número de sitios polimórficos privados		0	1	7	-
Número de indels		0	0	0	0
Composición nucleotídica	% A	38.73	38.77	38.92	38.8
	% T	30.3	30.32	30.31	30.31
	% C	19.58	19.51	19.47	19.52
	% G	11.4	11.40	11.30	11.37
DIVERSIDAD GENÉTICA					
Número de haplotipos (h)		9	12	16	26
Número de haplotipos privados (Hp)		3	6	10	-
Diversidad haplotípica (Hd)		0.717 ± 0.09	0.893 ± 0.042	0.957 ± 0.029	0.859 ± 0.032
Diversidad nucleotídica (π)		0.0076 ± 0.00121	0.0058 ± 0.00087	0.0121 ± 0.00102	0.0094 ± 0.00062
Promedio de diferencias a pares de individuos (K)		2.22	2.487	3.541	2.748

5.2.5 Análisis filogenético

Para el método de Máxima Verosimilitud, el modelo de evolución nucleotídica que mejor se ajustó a las secuencias propuesto siguiendo el criterio de información de Akaike propuesto por el software jModelTest v0.1.1 fue el modelo Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa et al., 1985) con Sitios Invariables y Distribución Gamma (HKY+I+G). Este modelo de sustitución considera que los sitios tienen tasas de evolución heterogéneas, habiendo una proporción de sitios que no varían y otras cuyas tasas varían de acuerdo a la distribución gamma.

Ambos métodos de inferencia filogenética (MV y NJ) sugirieron casi la misma hipótesis evolutiva con respecto a las relaciones de ancestralidad entre haplotipos. La topología fue no resuelta y con muy bajo soporte estadístico para todos las ramas internas (<50% de bootstrap) (Figura 17 y Figura 18). El grupo externo (*Scomber australasicus*), al polarizar el árbol, permitió detectar que los haplotipos H23 y H24 propios de Ilo, H7 de Ilo-Ventanilla y H9 de Ventanilla, localizados en la parte basal del árbol, son los haplotipos más ancestrales. La posición en el árbol de cada uno de los 26 haplotipos se distribuye de manera no concordante con la localidad geográfica a la que pertenecen.

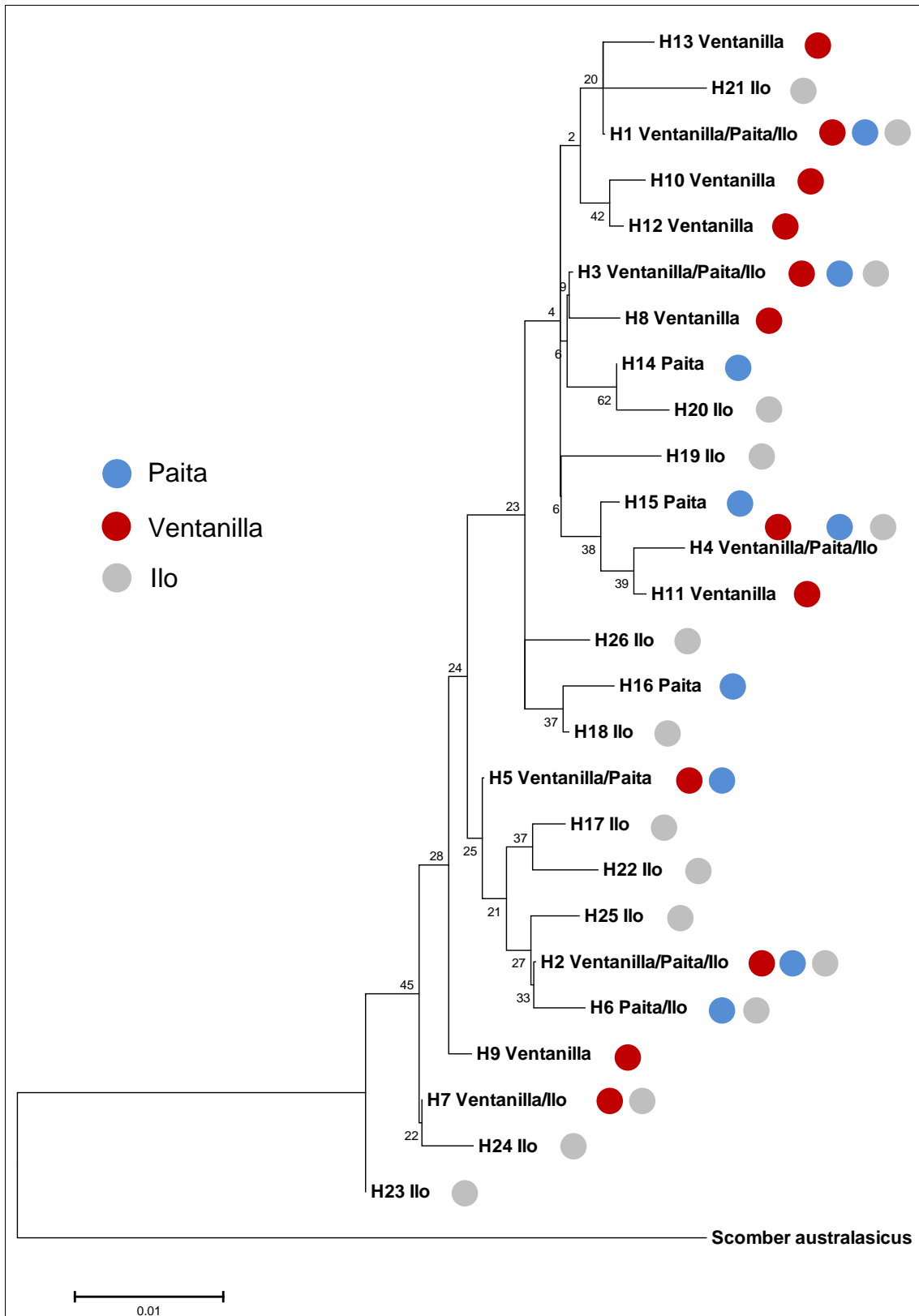


Figura 17. Árbol ML con 1000 réplicas de bootstrap bajo el modelo HKY



Figura 18. Árbol NJ con 1000 réplicas de bootstrap modelo K2P

5.2.6 Network

Una network es una herramienta de muchísima utilidad pues resume de manera gráfica las frecuencias de los haplotipos y las relaciones genealógicas entre ellos (filogenia intraespecífica). En el network de la región HVI de la caballa peruana no se observan grupos separados pues haplotipos privados de las tres localidades se encuentran bastante vinculados entre sí, típico de una población con poca diferenciación genética y escasa estructuración geográfica debido al elevado flujo génico. La distancia máxima entre haplotipos es de dos mutaciones a lo mucho, y el hecho de que las tres localidades comparten cuatro haplotipos (H1, H2, H3 y H4) también evidencia un elevado flujo génico en la población. Los haplotipos más frecuentes (H1 y H2) se encuentran distanciados por 4 eventos mutacionales, lejanía genética concordante con sus posiciones en el árbol filogenético. Se encontraron haplotipos raros de baja frecuencia la mayoría pertenecientes a la localidad de Ilo los cuales se generan por un solo paso mutacional a partir de otro haplotipo más frecuente, muy semejante a una conformación tipo estrella. Además, es posible apreciar en el network varios ciclos poligonales o “unresolved loops” las cuales son relaciones no resueltas entre haplotipos (Figura 19).

5.2.7 Historia demográfica

El estadístico D de Tajima resultó ligeramente negativo y no significativo solo para la población de Ilo, pues para Paita y Ventanilla resultaron positivos. Por el contrario, los valores del estadístico F_s de F_u resultaron negativos y significativos para Ventanilla e Ilo (p-values 0.003 y 0.00). El estadístico R^2 arrojó valores positivos, pero únicamente la localidad de Ilo resultó significativo (p-value = 0.025). Considerando la población

total, el estadístico F_s de F_u y el D^* de F_u y L_i resultaron negativos y significativos lo cual es evidencia de una expansión poblacional ancestral (Tabla 12).

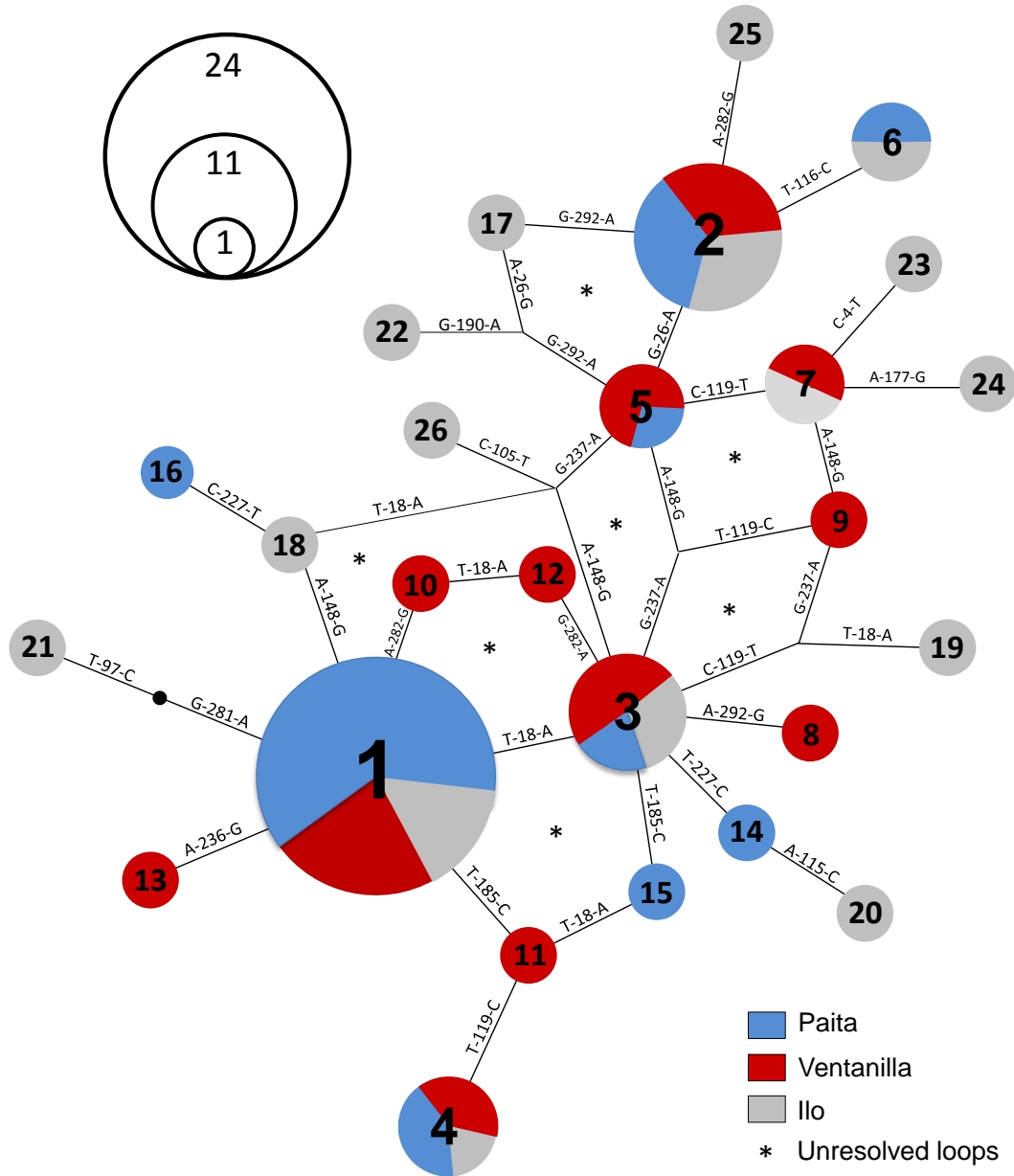


Figura 19. Red de haplotipos usando la aproximación Median Joining construido en base a la HVI de *Scomber japonicus* del mar peruano. Se indican los pasos mutacionales que distancian a los haplotipos entre sí y la escala de frecuencia de individuos. Cada número se corresponde con su haplotipo (1 = H1 = Haplotipo 1).

Tabla 12. Tests de neutralidad

Localidad	D de Tajima		Fs de Fu		Ramos-Onsins y Rozas		D* de Fu y Li	
	D	P	Fs	P	R2	P	D*	P
Paita	0.151	0.599	-2.224	0.107	0.136	0.586	0.728	0.74
Ventanilla	0.140	0.602	-5.037	0.003*	0.132	0.576	0.266	0.54
Ilo	-1.04	0.135	-9.863	0*	0.077	0.025*	-2.07	0.04*
Población Total	-0.89	0.167	-17.16	0*	0.068	0.193	-2.14	0.003*

P = p-value, * significativo (p-value <0.05)

Las distribuciones mismatch de Ventanilla e Ilo fueron unimodales a diferencia de Paita que resultó multimodal (errática). Considerando la población total, la distribución resultó unimodal, indicio de expansión poblacional lo cual es respaldado por los estadístico Fs de Fu y el D* de Fu y Li. Las pruebas de bondad de ajuste para el modelo de expansión (SSD y Hri) dieron valores pequeños y no significativos (Tabla 13), por lo que no se rechaza la hipótesis nula de expansión y se puede afirmar que la distribución observada se ajusta a un modelo de expansión poblacional y no al modelo de tamaño poblacional constante, ajuste que puede confirmarse visualmente (Figura 20).

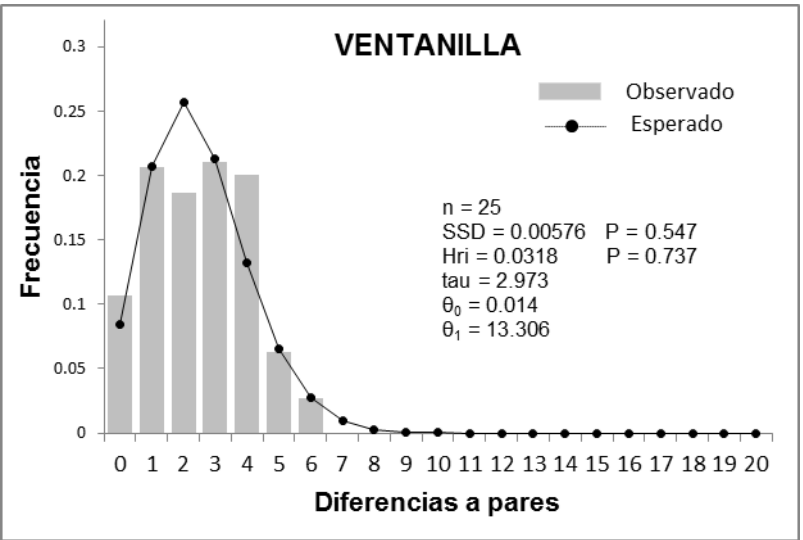
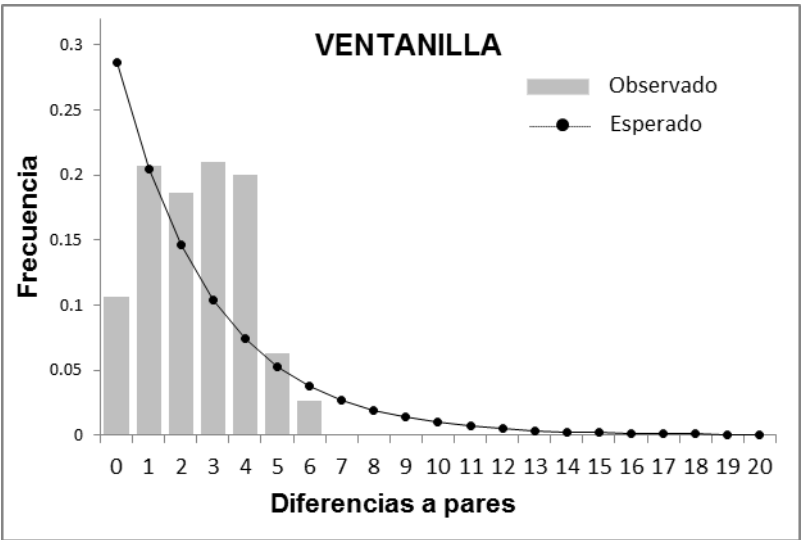
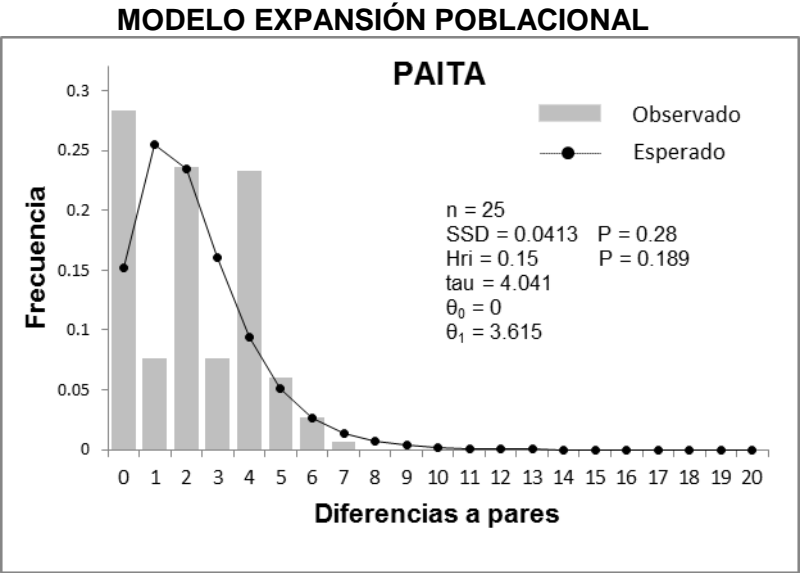
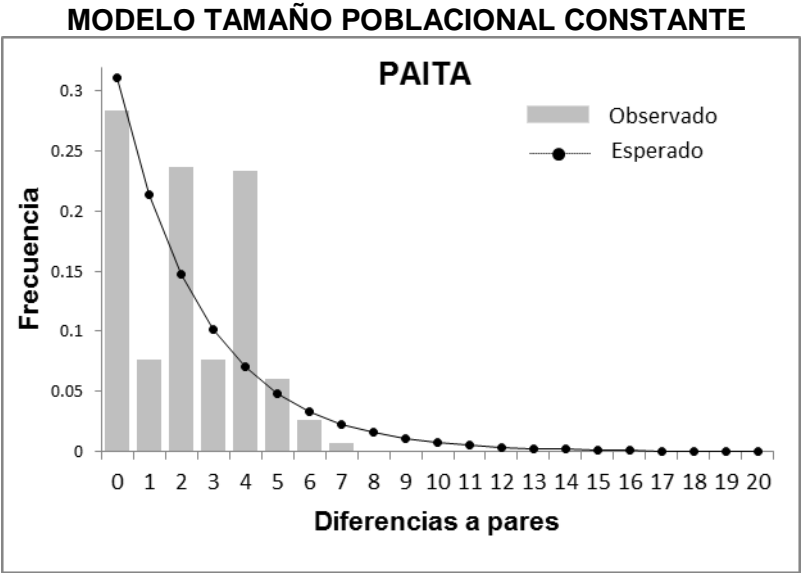


Figura 20a. Distribuciones Mismatch de Paita y Ventanilla. Se indican los valores y significancia de los estadísticos de bondad de ajuste (SSD y Hri) y los parámetros del modelo de expansión poblacional (θ_0 , θ_1 y tau)

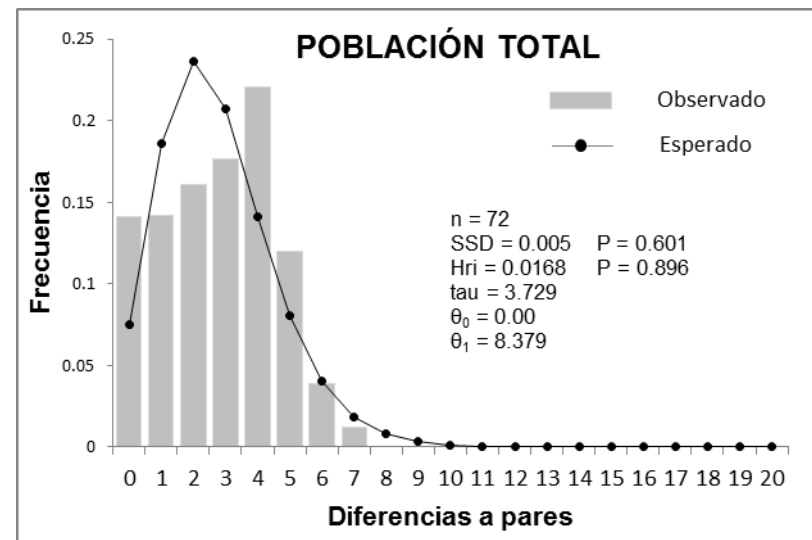
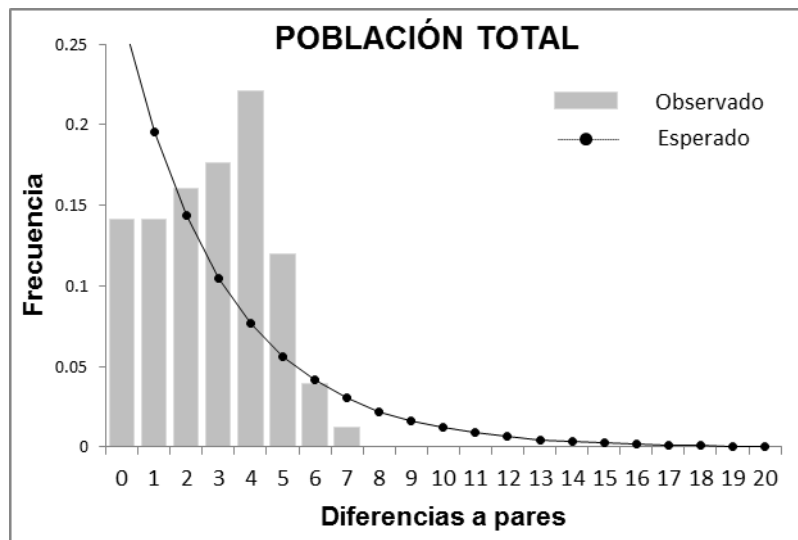
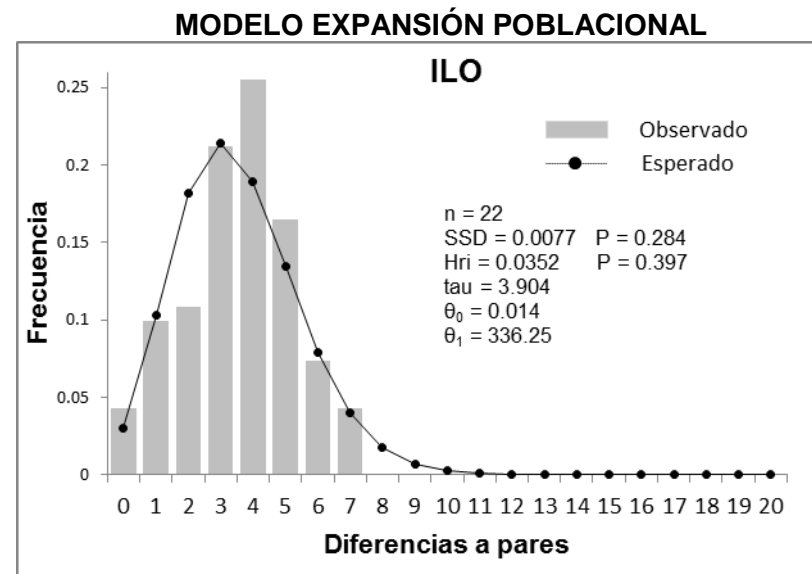
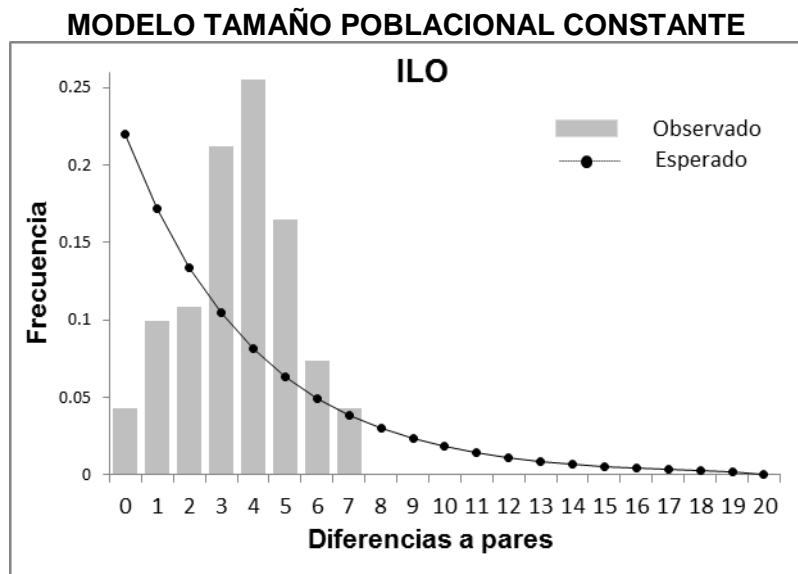


Figura 20b. Distribuciones Mismatch de Ilo y de la Población Total. Se indican los valores y significancia de los estadísticos de bondad de ajuste (SSD y Hri) y los parámetros del modelo de expansión poblacional (θ_0 , θ_1 y τ).

Tabla 13. Distribución mismatch

Localidad	Bondad de ajuste				Parámetros de expansión poblacional		
	SSD	p-value	Hri	p-value	θ_0	θ_1	tau
Paíta	0.0413	0.28	0.1501	0.189	0.00	3.615	4.041
Ventanilla	0.0057	0.547	0.0318	0.737	0.014	13.306	2.973
Ilo	0.0077	0.284	0.0352	0.397	0.014	336.25	3.904
Población Total	0.0050	0.601	0.0168	0.896	0.00	8.379	3.729

Para la estimación de la fecha aproximada de expansión poblacional se usó la fórmula $t = \tau / 2u = \tau / 2\mu k$. El valor calculado del parámetro tau para la población total es 3.729, y considerando un tiempo generacional de 3.5 años, 292pb del marcador utilizado y dos tasas de mutación diferentes (3.6% y 9.3%), los tiempos estimados de expansión poblacional para la caballa para la población total son de 620, 790 años y de 240, 306 años (Tabla 13).

5.2.8 Estructura genética

EL test de AMOVA, considerando a la población como un grupo o como dos grupos, indicaron que la mayor fuente de variación genética se encuentra dentro de las poblaciones, mientras que la variación genética entre las poblaciones y entre los grupos propuestos fue prácticamente despreciable. Ninguno de los estadísticos F fue significativo estadísticamente. La estructuración poblacional Norte vs Centro-sur (Paíta vs Ventanilla-Ilo) fue la que dio mayor diferencia entre grupos (3.72%) con un $F_{CT} = 0.3721$, a diferencia de la agrupación Norte-Centro vs Sur (Paíta-Ventanilla vs Ilo) ($F_{CT} = 0.0067$) con 1.3% de varianza genética (Tabla 14).

Tabla 14. Test de AMOVA en base a la Región Hipervariable I (HVI)

Estructura genética a probar	Partición observada			
	Varianza	% Total	Estadístico F	P-value
UN SOLO GRUPO (Paita-Ventanilla-Ilo)				
Entre poblaciones	0.00562	1.3	$F_{ST} = 0.01304$	0.15934
Dentro de poblaciones	0.42559	98.70		
DOS GRUPOS NORTE-CENTRO vs SUR (Paita-Ventanilla) vs Ilo				
Entre grupos	0.0029	0.67	$F_{CT} = 0.0067$	0.66470
Entre poblaciones	0.00378	0.87	$F_{SC} = 0.0088$	0.23851
Dentro de Poblaciones	0.42559	98.46	$F_{ST} = 0.01544$	0.15934
DOS GRUPOS NORTE VS CENTRO-SUR Paita vs (Ventanilla-Ilo)				
Entre grupos	0.01624	3.72	$F_{CT} = 0.03721$	0.32258
Entre poblaciones	-0.00544	-1.25	$F_{SC} = -0.0129$	0.85630
Dentro de Poblaciones	0.42559	97.52	$F_{ST} = 0.02475$	0.16325

* significativo si p-value < 0.05

Las comparaciones a pares de F_{ST} también fueron utilizadas para evaluar diferenciación genética entre las poblaciones. Valores cercanos a 1 indican una mayor diferenciación entre las poblaciones y valores cercanos a 0 indican poblaciones más homogéneas. Los valores obtenidos fueron bastante cercanos a cero y no significativos. Los valores negativos fueron considerados no distintos de cero. Estos resultados sugieren una escasa diferenciación genética entre las poblaciones de

caballa. Sin embargo, la mayor diferenciación genética encontrada entre dos poblaciones fue entre Paita e Ilo, si bien con un valor F_{ST} muy bajo, pero su p-value es muy cercano a la significancia (Tabla 15). El test exacto de diferenciación también sugiere la misma situación entre Paita e Ilo pues el p-value es el más reducido aunque alejado de la significancia (Tabla 16).

Tabla 15. Comparaciones a pares de F_{ST}

Estadísticos F_{ST} (por debajo de la diagonal) y p-values correspondientes (por encima de la diagonal)

	Paita	Ventanilla	Ilo
Paita	-	0.22461 ± 0.0129	0.05078 ± 0.0075
Ventanilla	0.01154	-	0.84375 ± 0.0099
Ilo	0.04443	- 0.01533	-

Tabla 16. Valores de los p-value del Test exacto de diferenciación poblacional

	Paita	Ventanilla	Ilo
Paita	-		
Ventanilla	0.57653 ± 0.0096	-	
Ilo	0.19891 ± 0.0092	0.81369 ± 0.0118	-

5.2.9 Test de Mantel

El Test de Mantel para el marcador HVI no fue estadísticamente significativo pero reveló la alta correlación existente (r) entre las distancias geográficas y las distancias genéticas tanto para F_{ST} ($r = 0.879$) como para F_{ST} de Slatkin ($r = 0.963$). La distancia genética entre Paita e Ilo concuerda con su lejanía geográfica, lo cual sugiere un aislamiento por distancia (Figura 21 y Figura 22).

Tabla 17. Matriz de distancias geográficas en kilómetros lineales entre las localidades muestreadas de *Scomber japonicus*.

	Paita	Ventanilla	Ilo
Paita	0		
Ventanilla	866.18	0	
Ilo	1754.260	897.01	0

Tabla 18. Matriz de distancias genéticas. Distancias Fst (debajo de la diagonal) y Distancias Fst linearizadas de Slatkin (encima de la diagonal).

	Paita	Ventanilla	Ilo
Paita	--	0.01168	0.04649
Ventanilla	0.01154	--	0.000
Ilo	0.04443	- 0.01533	--

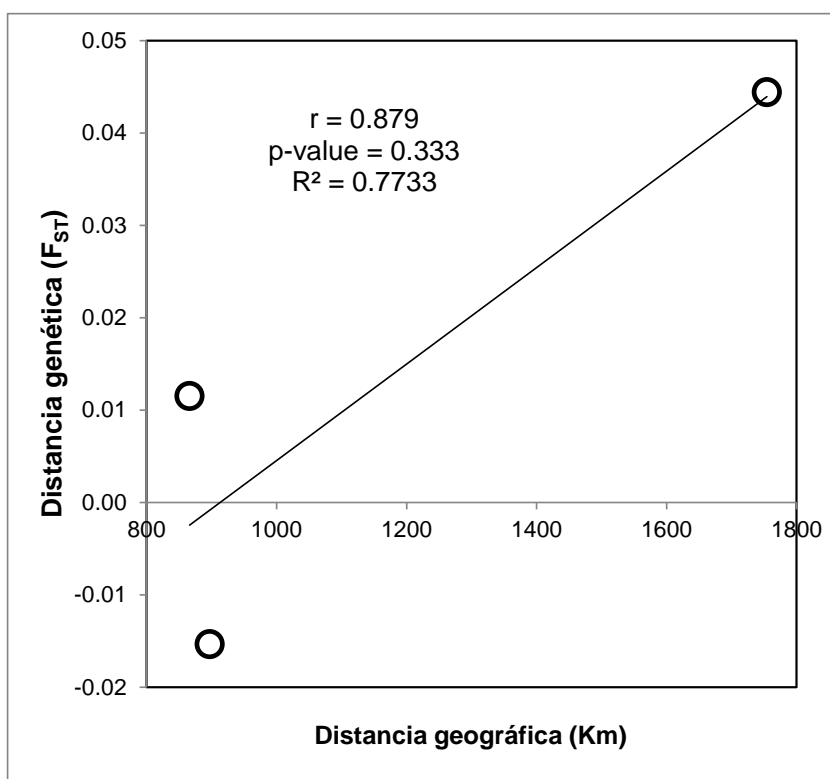


Figura 21. Test de Mantel considerando distancias F_{ST}

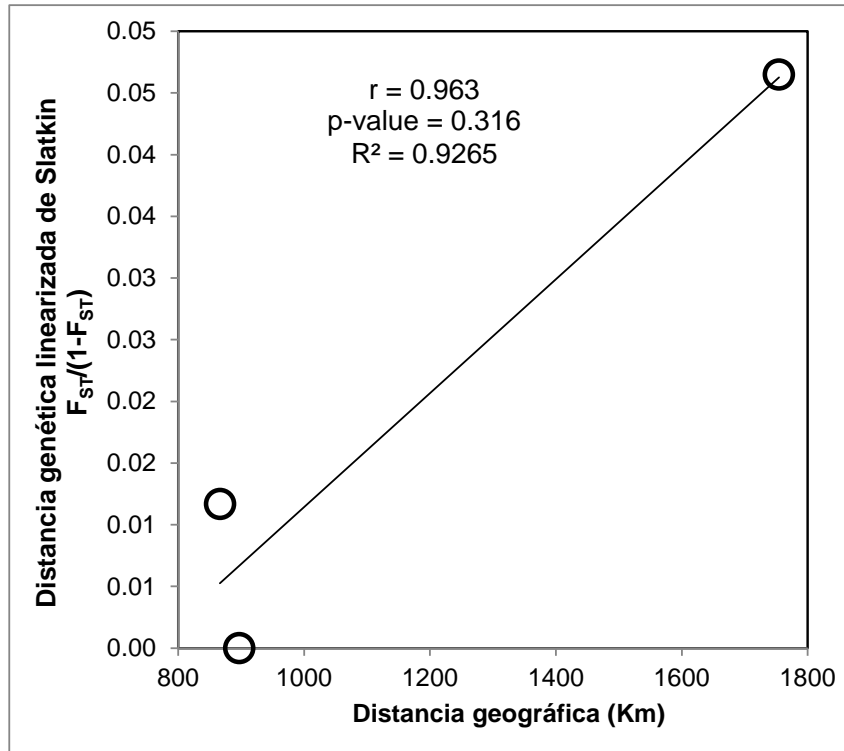


Figura 22. Test de Mantel considerando distancias F_{ST} linealizadas de Slatkin

5.3 Microsatélites

5.3.1 Marcador SJT18

El marcador SJT18 pudo ser genotipado con éxito empleando geles de poliacrilamida. En las experiencias de electroforesis iniciales se visualizaron bandas inespecíficas, pero ajustando las concentraciones finales de $MgCl_2$ y de los primers y la temperatura de hibridación (T_a), la reacción de amplificación de PCR fue estandarizada. Se encontró que la mejor concentración de $MgCl_2$ fue 1mM y que la temperatura óptima de hibridación fue de 55°C (Tabla 7) ya que temperaturas de hibridación más altas (60°C), a pesar de mejorar la especificidad, disminuyen la intensidad de las bandas (Figura 23)

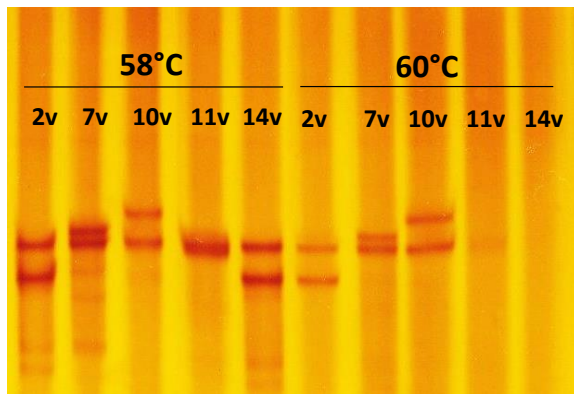
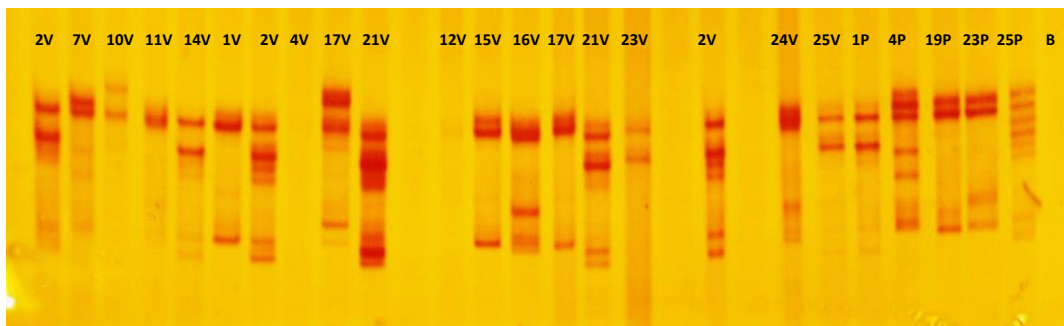


Figura 23. Estandarización del PCR locus microsatélite Sjt18

Una vez estandarizado el PCR, los amplicones fueron corridos en orden de código de individuo y para cada población (Figura 24). Luego se corroboraron los alelos juntando individuos con genotipos que compartían al menos un alelo o tenían genotipos similares. La implementación de una plancha de aluminio durante la corrida eliminó el problema del efecto smiling (Figura 25).

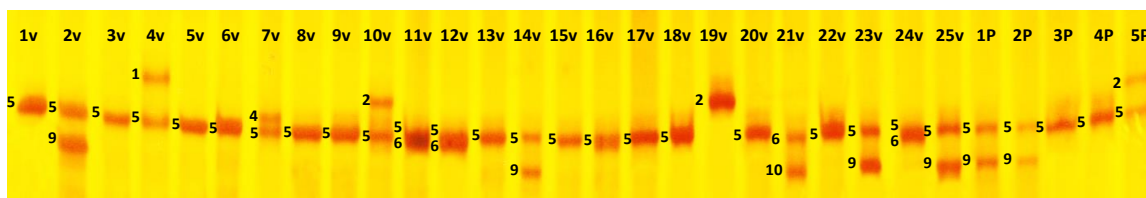
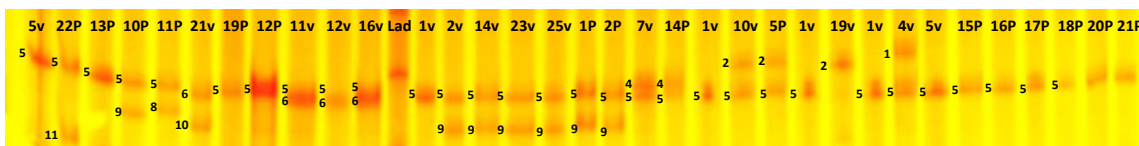


Figura 24. Corrida vertical de poliacrilamida del locus microsatélite Sjt18



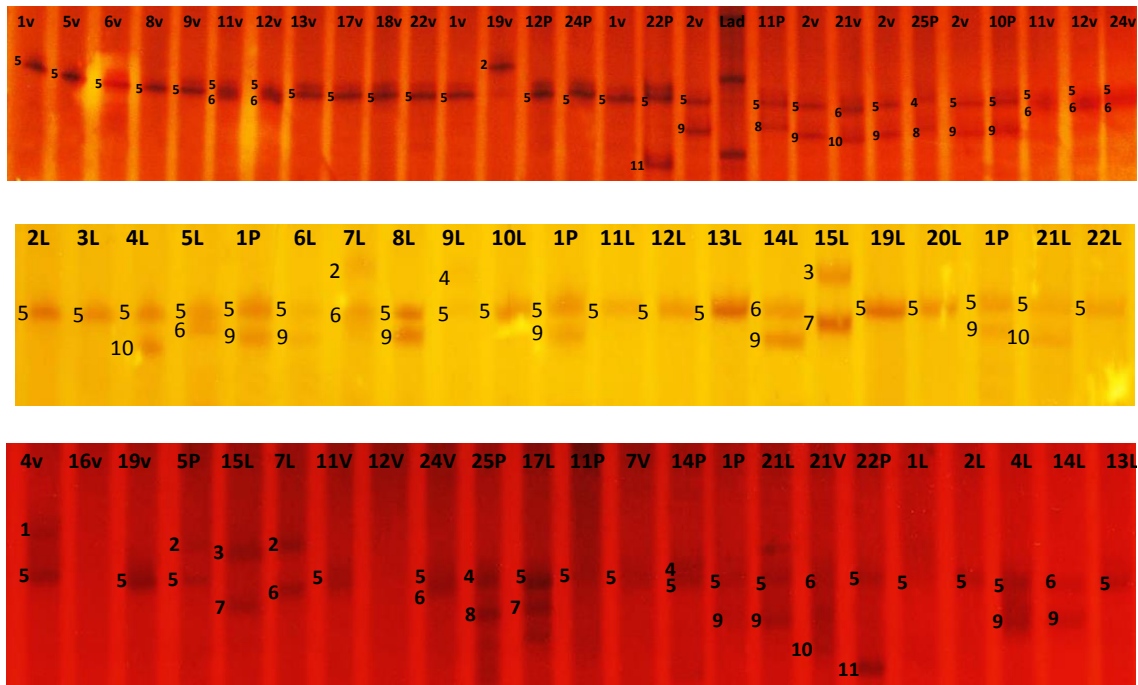


Figura 25. Verificación de alelos del marcador microsatélite SJT18. Los alelos se indican junto a su banda respectiva. Los individuos con una banda única son homocigotos para dicho alelo y los que presentan dos bandas son heterocigotos. Leyenda: P (Paíta), V (Ventanilla) y L (Ilo).

Los genotipos de los individuos se muestran en la Tabla 19, y las frecuencias alélicas calculadas se detallan en la Tabla 20 y se grafican en la Figura 26 y la Figura 27. Cuatro individuos de la población de Ilo no tuvieron éxito de amplificación por lo que esta población solo tuvo 21 individuos genotipados. El marcador SJT18 resultó ser moderadamente polimórfico ($PIC = 0.4486$) con 11 alelos en total, los cuales fueron nombrados utilizando números arábigos de manera descendente en base a su tamaño. El alelo predominante en toda la población fue el alelo 5, el cual presentó un tamaño promedio con respecto a los demás alelos y representó el 80% de las frecuencias alélicas de la población de Paíta (Tabla 20). El número de alelos diferentes encontrados en las poblaciones tiende a subir de norte a sur al igual que el Número efectivo de alelos (N_e) (Tabla 21).

Tabla 19. Genotipaje del marcador SJT18

Ventanilla		Paita		Ilo	
Ind	Genotipo	Ind	Genotipo	Ind	Genotipo
1v	005005	1P	005009	1L	005005
2v	005009	2P	005009	2L	005005
3v	005005	3P	005005	3L	005005
4v	005001	4P	005005	4L	005010
5v	005005	5P	002005	5L	005006
6v	005005	6P	005005	6L	005009
7v	004005	7P	005005	7L	002006
8v	005005	8P	005005	8L	005009
9v	005005	9P	005005	9L	004005
10v	002005	10P	005005	10L	005005
11v	005006	11P	005008	11L	005005
12v	005006	12P	005005	12L	005005
13v	005005	13P	005005	13L	005005
14v	005009	14P	004005	14L	006009
15v	005005	15P	005005	15L	003007
16v	002005	16P	005005	16L	005005
17v	005005	17P	005005	17L	005007
18v	005005	18P	005005	18L	No amplificó
19v	002005	19P	005005	19L	002002
20v	005005	20P	005005	20L	005005
21v	006010	21P	005005	21L	005010
22v	005005	22P	005011	22L	005005
23v	005009	23P	005008	23L	No amplificó
24v	005006	24P	005005	24L	No amplificó
25v	005009	25P	004008	25L	No amplificó

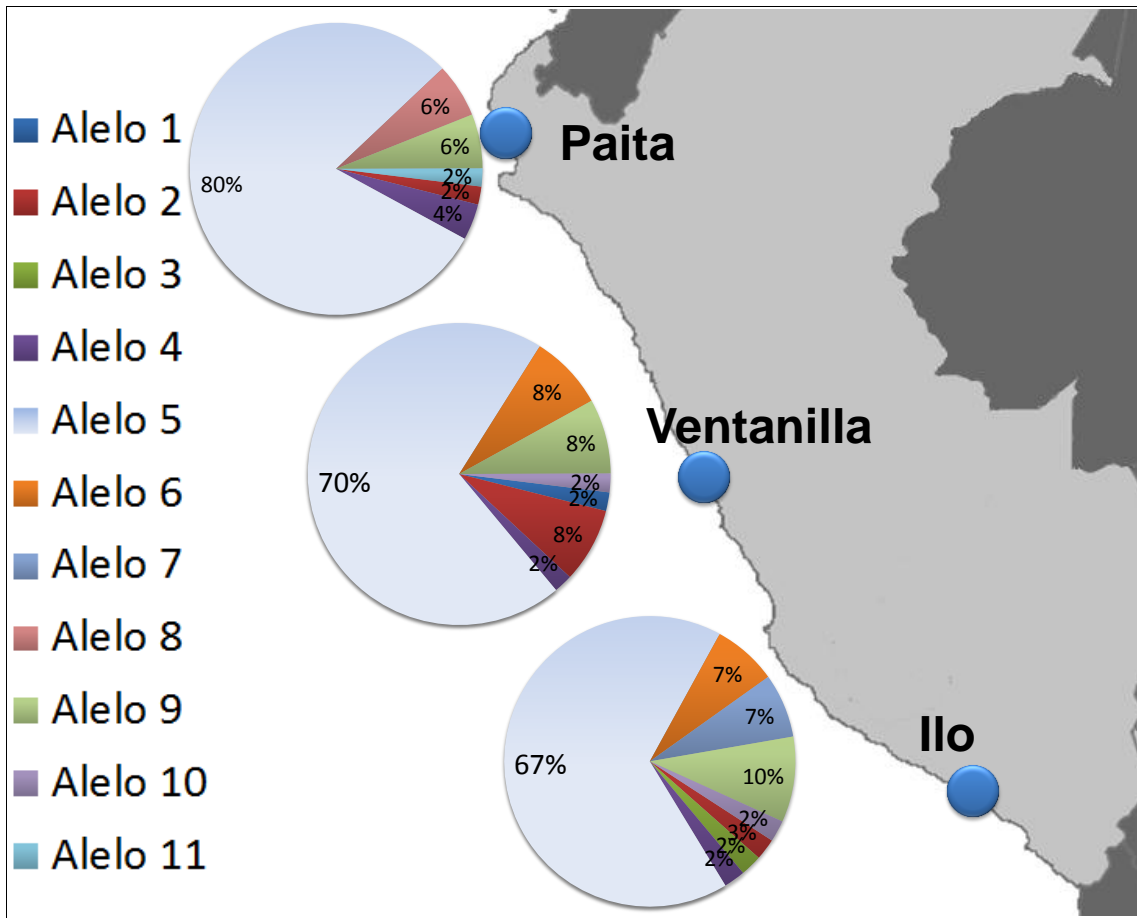


Figura 26. Frecuencias alélicas del locus microsatélite SJT18 (tipo pie)

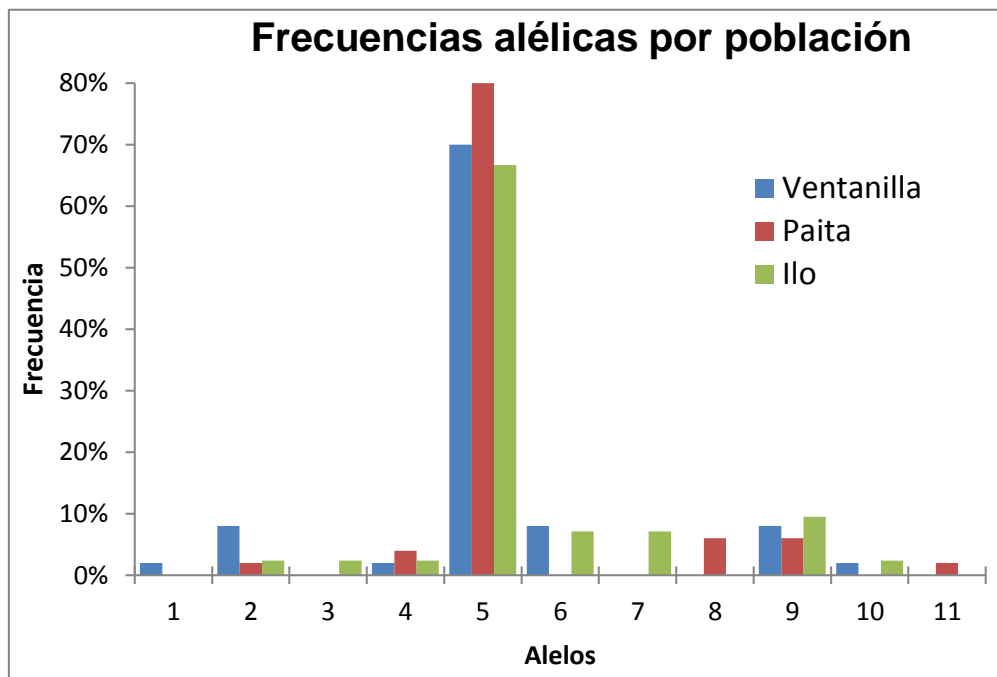


Figura 27. Frecuencias alélicas del marcador SJT18 por población (en columna)

Tabla 20. Frecuencias alélicas (p_i) del marcador SJT18 por población

Alelo	Ventanilla (n = 25)	Paita (n = 25)	Ilo (n = 21)	Pob. Total (N = 71)
1	0.020	0.000	0.000	0.007
2	0.080	0.020	0.024	0.042
3	0.000	0.000	0.024	0.007
4	0.020	0.040	0.024	0.028
5	0.700	0.800	0.667	0.725
6	0.080	0.000	0.071	0.049
7	0.000	0.000	0.071	0.021
8	0.000	0.060	0.000	0.021
9	0.080	0.060	0.095	0.077
10	0.020	0.000	0.024	0.014
11	0.000	0.020	0.000	0.007

5.3.1.1. Heterocigosidad y Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW)

Las heterocigosidad observada más pequeña fue de la población de Paita ($H_o = 0.36$) pues es la que presenta menor número de individuos heterocigotos y Ventanilla fue la de mayor heterocigosidad observada ($H_o = 0.4762$). Ilo fue la población con mayor efectividad de alelos ($N_e = 2.146$) y a su vez la población con mayor riqueza alélica ($RA = 8.00$). Con respecto a las diversidades genéticas (Heterocigosidades esperadas de Nei y las Heterocigosidades normalizadas de Nei) estas presentaron un patrón ascendente de Norte a Sur, siendo mayores a las heterocigosidades observadas (H_o) a excepción de Paita, donde la H_o fue mayor y por ende fue la única población con un Coeficiente de endogamia negativo ($F_{is} = - 0.007$). Los otros valores de F_{is} presentaron valores positivos bastante cercanos a cero. La probabilidad de alelos nulos en la población total fue insignificante ($P_{a.n} = 0.0434$). Ninguna de las poblaciones presentaron desviaciones significativas del Equilibrio Hardy-Weinberg ($p > 0.05$), al

igual que la población total (Tabla 21) consistente con los valores Fis cercanos a cero (EHW) y la bajísima probabilidad de alelos nulos, por lo cual es factible realizar el análisis de estructuración genética.

Tabla 21. Diversidad genética en base al marcador SJT18

	Paíta	Ventanilla	Ilo	Pob. Total
Número de individuos (n)	25	25	21	71
Número de alelos (Na)	6	7	8	11
Número efectivo de alelos (Ne)	1.539	1.959	2.146	1.857
Riqueza alélica (AR)	5.651	6.519	8.000	7.244
Número de alelos privados	2	1	2	-
Número de homocigotos	16	13	10	40
Número de heterocigotos	9	12	10	31
Heterocigosidad Observada (Ho)	0.3600	0.4800	0.4762	0.4366
Heterocigosidad Esperada (He)	0.3504	0.4896	0.5340	0.4649
Heterocigosidad Esperada unbiased (uHe)	0.3576	0.4996	0.5462	0.465
Contenido de Información polimórfica (PIC)	0.338	0.4693	0.515	0.4486
Coeficiente de Endogamia (Fis)	- 0.007	0.04	0.132	0.061
Probabilidad de alelos nulos (P a.n)	- 0.0050	- 0.0066	0.1056	0.0434
Test de desviación del EHW (p-value)	0.5814	0.71179	0.2436	0.245

* Si $p < 0.05$: existe desviación significativa del Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW)

Tabla 22. Probabilidad de alelos nulos (Pa.n) por población y las frecuencias de los alelos corregidas considerando alelos nulos

Localidad	P(a.n)	Alelo	Conteo	Het	Hom	Frecuencias alélicas	Frecuencias alélicas considerando alelos nulos
<u>Paíta</u> n = 25 Na = 6	-0.0050	002	1	1	0	0.020	0.0202
		004	2	2	0	0.040	0.0408
		005	40	8	16	0.800	0.7999
		008	3	3	0	0.060	0.0619
		009	3	3	0	0.060	0.0619
		010	1	1	0	0.020	0.0202
<u>Ventanilla</u> n = 25 Na = 7	-0.0066	001	1	1	0	0.020	0.0202
		002	4	2	1	0.080	0.0619
		004	1	1	0	0.020	0.0202
		005	35	11	12	0.700	0.7171
		006	4	4	0	0.080	0.0835
		009	4	4	0	0.080	0.0835
		010	1	1	0	0.020	0.0202
<u>Ilo</u> n = 21 Na = 8	0.1056	002	1	1	0	0.0238	0.0238
		003	1	1	0	0.0238	0.0238
		004	1	1	0	0.0238	0.0238
		005	28	6	11	0.6667	0.5533
		006	3	3	0	0.0714	0.0733
		007	3	3	0	0.0714	0.0733
		009	4	4	0	0.952	0.0991
		010	1	1	0	0.0238	0.0238
<u>Población total</u> N = 71 Na = 11	0.0434	001	1	1	0	0.0070	0.0071
		002	6	4	1	0.0423	0.0358
		003	1	1	0	0.0070	0.0071
		004	4	4	0	0.0282	0.0285
		005	103	25	39	0.725	0.6833
		006	7	7	0	0.04934	0.0505
		007	3	3	0	0.0211	0.0213
		008	3	3	0	0.0211	0.0213
		009	11	11	0	0.0775	0.0806
		010	2	2	0	0.0141	0.0142
		011	1	1	0	0.0070	0.0071

5.3.1.2. Estructura genética

El Test de AMOVA para el marcador microsatélite SJT18 mostró que casi toda la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones y una casi nula variación genética entre poblaciones y entre grupos de poblaciones. Sin embargo la agrupación Paita vs (Ventanilla-Ilo) tuvo un porcentaje variación de 2.04%, aunque fue no significativa ($F_{CT} = 0.02043$, $p\text{-value} = 0.333$). Los valores F_{ST} resultaron demasiado bajos y no significativos.

Tabla 23. TEST DE AMOVA para el marcador microsatélite SJT18

Estructura genética a probar	Partición observada			
	Varianza	% Total	Estadístico F	P-value
UN SOLO GRUPO (Ventanilla-Paita-Ilo)				
Entre poblaciones	0.00008	0.03	$F_{ST} = 0.0003$	0.41153
Dentro de poblaciones	0.22544	99.97		
DOS GRUPOS NORTE-CENTRO vs SUR (Paita-Ventanilla) vs Ilo				
Entre grupos	-0.0068	-0.3	$F_{CT} = -0.003$	0.67742
Entre poblaciones	0.00049	0.22	$F_{SC} = 0.0021$	0.26979
Dentro de Poblaciones	0.22544	100.08	$F_{ST} = -0.008$	0.37048
DOS GRUPOS NORTE vs CENTRO-SUR Paita vs (Ventanilla-Ilo)				
Entre grupos	0.00464	2.04	$F_{CT} = 0.0204$	0.3333
Entre poblaciones	-0.00313	-1.38	$F_{SC} = -0.0141$	0.90029
Dentro de Poblaciones	0.22544	99.34	$F_{ST} = 0.00662$	0.39394

Las distancias genéticas entre las poblaciones también arrojaron valores bastante bajos. La mayor distancia genética encontrada fue entre Paita e Ilo, concordante con su lejanía geográfica.

Tabla 24. Distancias genéticas entre poblaciones en base al marcador SJT18 (Debajo de la diagonal: Distancias F_{ST} / Encima: Distancias genéticas de Nei)

	PAITA	VENTANILLA	ILO
PAITA	-	0.015	0.018
VENTANILLA	0.0045 (ns)	-	0.010
ILO	0.01309 (ns)	- 0.01502 (ns)	-

ns: no significativo

5.3.1.3. Test de Mantel

Los niveles de correlación entre los datos de distancias geográficas y distancias genéticas resultaron altos ($r = 0.714$ y $r = 0.766$) pero no significativos.

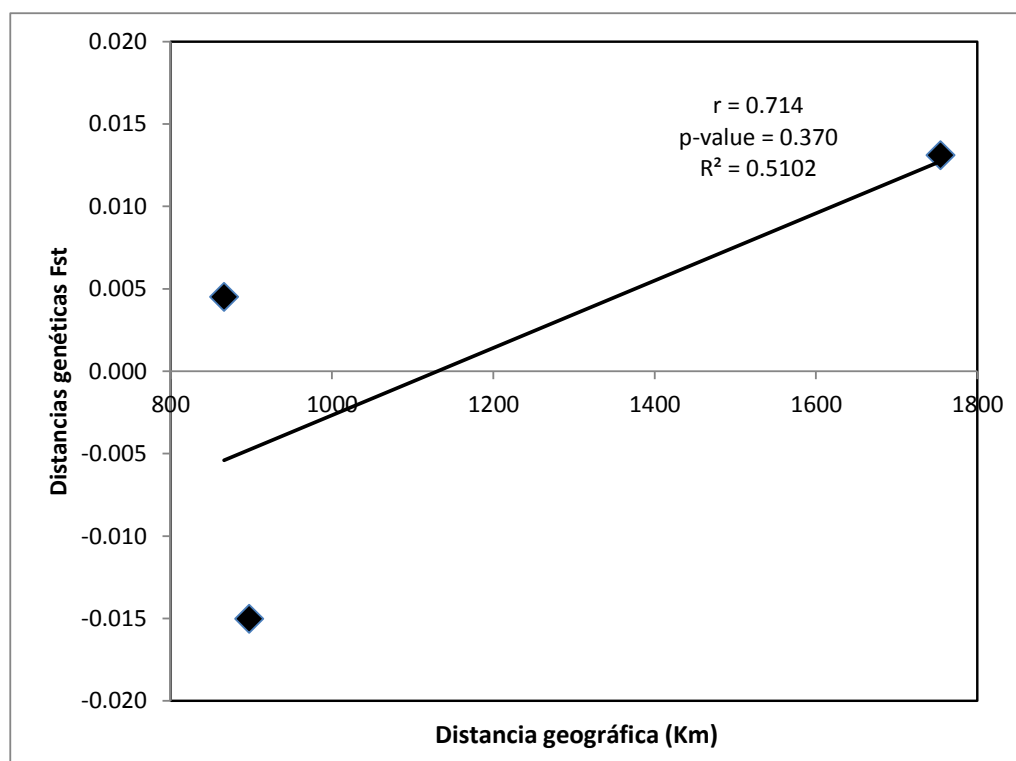


Figura 28. Test de Mantel para el marcador SJT18 en base a distancias F_{ST}

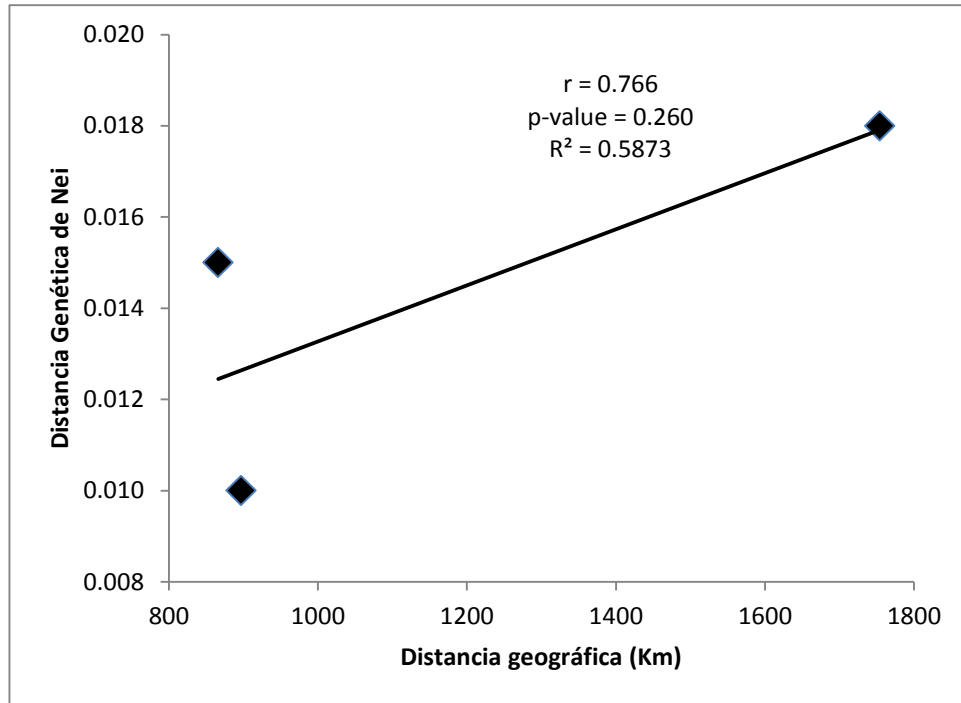
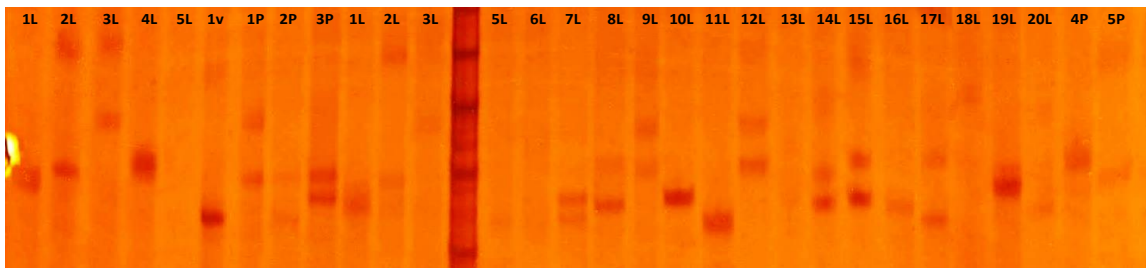


Figura 29. Test de Mantel para el marcador SJT18 en base a distancias genéticas de Nei

5.3.2 Marcadores SJT49, Scja02, Scja07 y KSjl2

Los marcadores microsatélites SJT49 (Zeng y Cheng, 2012), Scja02, Scja07 (Yagishita y Kobayashi, 2008) y KSjl2 (Cha et al., 2010) lograron ser amplificados con éxito pues las bandas fueron visibles en geles de agarosa 3% (Figura 31 y Figura 32). Sin embargo luego de correrlos en geles de poliacrilamida se vieron numerosas bandas inespecíficas de igual o menor intensidad a la principal lo cual se conoce como efecto stuttering (Figura 30, Figura 32, Figura 33) y no se pudieron genotipar los individuos.



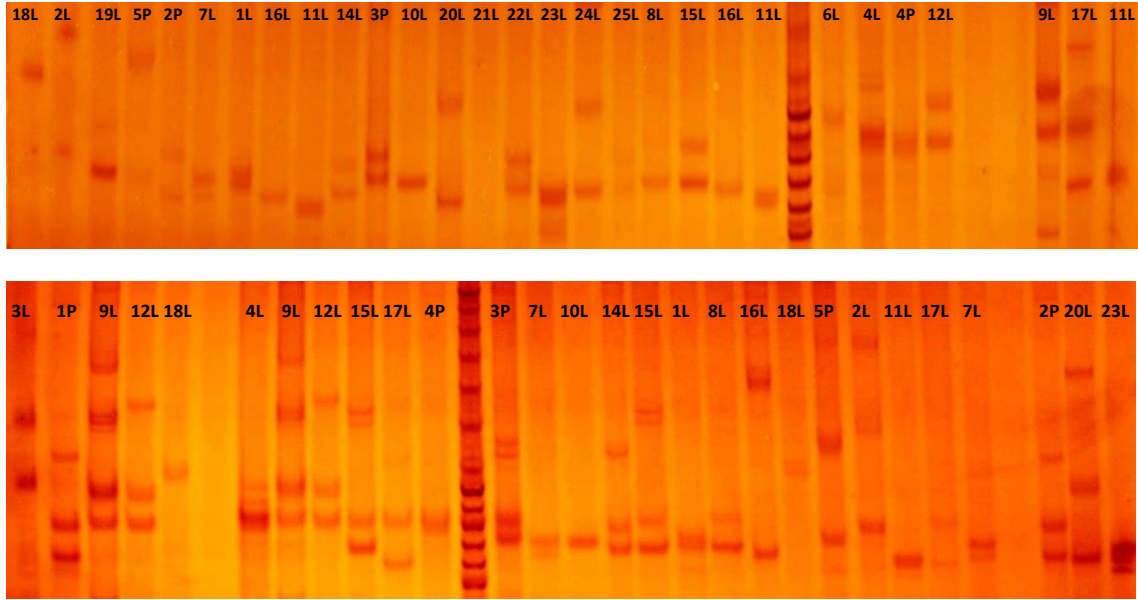


Figura 30. Corridas electroforéticas verticales del marcador microsatélite Sjt49
 Nótese la abundancia de bandas tartamudas (stuttering)

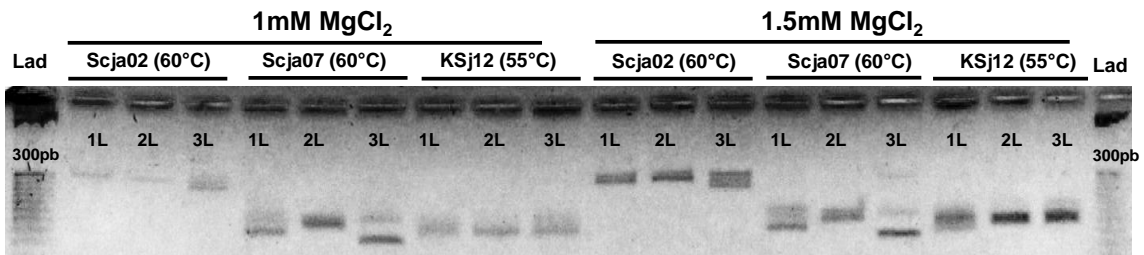


Figura 31. Marcadores Scja02, Scja07 y KSjl2. Estandarización del $MgCl_2$

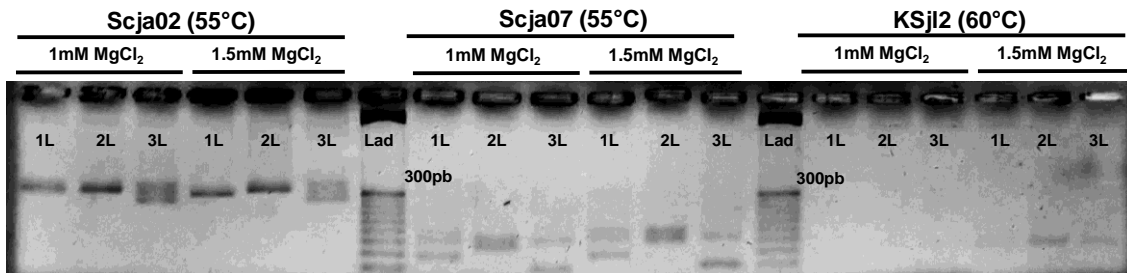


Figura 32. Marcadores Scja02, Scja07 y KSjl2. Estandarización de la T_a

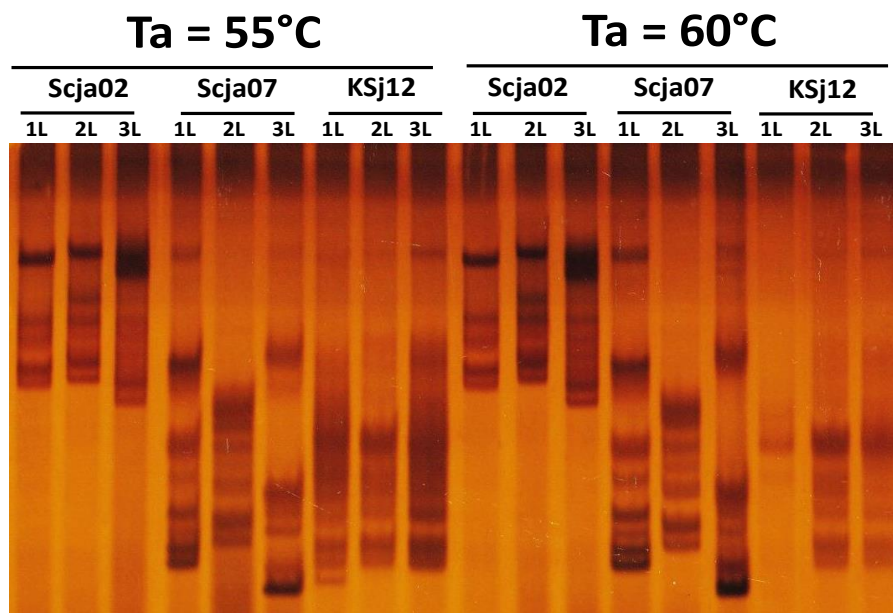


Figura 33. Electroforesis vertical de los marcadores Scja02, Scja07 y KSj12. Se aprecia claramente el efecto stuttering (Ta = Temperatura de hibridación)

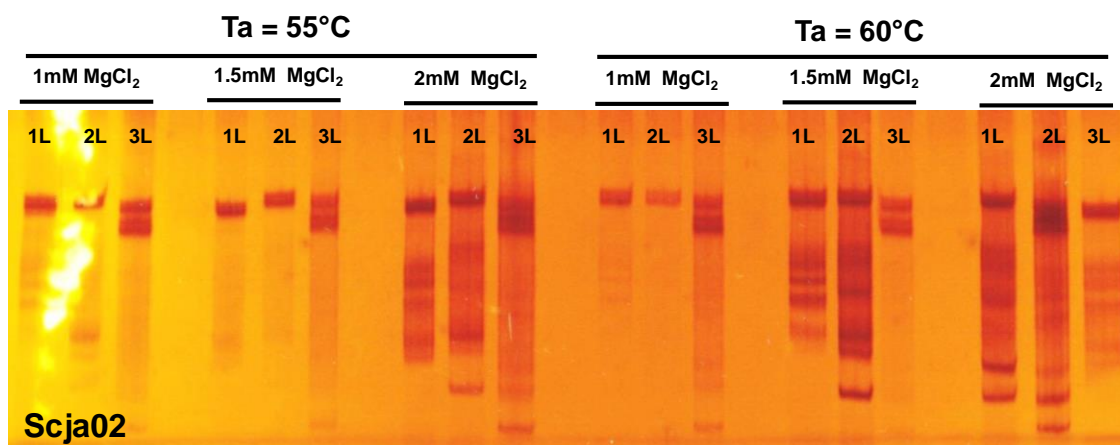


Figura 34. Electroforesis vertical para el marcador Scja02 (Ta = temperatura de hibridación)

6. DISCUSIÓN

6.1 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra para una investigación cuyo fin es detectar stocks pesqueros a nivel genético es un factor crítico pues afecta en gran medida a la precisión de la estimación de los parámetros de diversidad genética, por lo que tamaños muestrales pequeños pueden ser insuficientes para proveer conclusiones confiables. Sin embargo muestrear un número elevado de individuos por localidad es a veces inviable ya sea por el costo o por características propias de la especie. Simulaciones en computadora (Hale et al., 2012) sugieren que tamaños muestrales de 25 a 30 individuos por localidad son suficientes para este tipo de estudios en base a marcadores microsatélites pues permiten una estimación correcta de las frecuencias alélicas.

6.2 Extracción de ADN

La caballa *Scomber japonicus* es considerado un recurso altamente nutritivo por el elevado contenido proteico de su carne. Debido a esta característica la extracción de ADN fue complicada al inicio cuando se empleó protocolos como Precipitación Diferencial, pues la resuspensión de los pellets fue difícil por la abundante cantidad de proteínas (Datos no mostrados). Por ello se optó por la metodología Salting Out, porque aparte de ser rápido, económico y no contaminante, elimina casi la totalidad de proteínas durante la precipitación con sales. Aljanabi et al (1997) propusieron un método cuasi-universal basado en Salting Out para la extracción de ADN de varias especies de organismos, entre animales y plantas. Sin embargo, dependiendo del tipo de organismo a extraer y el tipo tejido disponible es necesario realizar modificaciones. Los ADNs genómicos obtenidos con el método original de Aljanabi et al (1997) a partir de tejido muscular resultaron en su mayoría degradados (Figura 11) posiblemente por

la excesiva acción de las nucleasas durante la lisis. Estos ADNs tampoco pudieron ser amplificados por PCR, presumiblemente a la elevada cantidad de NaCl residual. Por esta razón se decidió a realizar modificaciones al protocolo original los cuales se detallan en la Tabla 25, los cuales permitieron optimizar un método que permitió extraer ADN de manera satisfactoria a partir de tejido muscular de *Scomber japonicus*.

Tabla 25. Modificaciones al método de Aljanabi et al (1997) empleadas en la presente tesis

Paso	Aljanabi et al (1997)	Modificaciones realizadas
Buffer de homogenización		
• Tampón	Tris 10mM	Tris 20 mM
• NaCl	400 mM	400 mM
• EDTA	2 mM	20 mM
• Urea	-----	5 M
Eliminación de proteínas	NaCl 6M	Acetato de Amonio 10M
Precipitación de ácidos nucleicos	Isopropanol (1 volumen)	Etanol absoluto (2 volúmenes)
Resuspensión del pellet final de ADN	Agua destilada estéril	Buffer TE 20:1

Se ha observado que la actividad de la Proteinasa K es estimulada al máximo cuando está en presencia de agentes caotrópicos como el SDS (0.5 - 2%) y urea (1 - 4M) (Hilz et al., 1975), además de iones Ca^{2++} (1 - 5 mM) que le otorgan estabilidad térmica (Bajorath et al., 1988). La urea fue agregada al buffer de homogenización para estimular a la Proteinasa K y también para facilitar el proceso de disgregación del tejido (separación de células) previo a la adición del SDS. El ion Mg^{2++} , responsable de la activación de las nucleasas, es quelado por el EDTA formándose el complejo EDTA:

Mg^{2++} . Como se utiliza gran cantidad de muestra inicial y el tejido muscular es abundante en iones Mg^{2++} se elevó la concentración de EDTA de 2mM a 20mM, considerándose 20mM una concentración adecuada porque una concentración mayor podría quelar también a los iones Ca^{2++} necesarios para la actividad normal de la Proteinasa K. Con respecto a la sal para eliminar las proteínas, se cambió a acetato de amonio porque es mucho más soluble en etanol 70% que el NaCl, y por tanto más fácil de remover durante el lavado, además de ser más eficiente al momento de remover metales, detergentes y otras impurezas que pueden inhibir la acción de posteriores enzimas (Crouse y Amorese, 1987). Con respecto a la precipitación de ADN, si bien el isopropanol no requiere incubación en frío y se usa en menor volumen, no es tan volátil como el etanol absoluto y tiende a dejar residuos al final del proceso si no evapora bien durante el secado del pellet. Además las sales no son tan solubles en isopropanol, y es necesario eliminarlas con más lavados (Richards, 1988). Para el almacenamiento del ADN existe un problema con el agua destilada, pues su PH no puede ser controlado porque tiende a absorber el CO_2 atmosférico lo cual promueve su continua acidificación por formación de ácido carbónico, incrementando a su vez el riesgo de depurinación e hidrólisis del ADN (Lindahl y Nyberg, 1972). Para almacenar el ADN a largo plazo y minimizar la depurinación se recomienda el uso de soluciones que contengan Tris y EDTA. El buffer TE 20:1 (Tris 20mM, EDTA 1mM, PH = 8) a parte de garantizar el mantenimiento del PH y la quelación de iones Mg_2^{++} necesarios para la activación de las nucleasas, permite las reacciones de PCR y secuenciamiento sin problemas. Sin embargo, algunas reacciones enzimáticas como digestión, ligación y transcripción reversa donde el Mg_2^{++} también es necesario, la presencia de cantidades mínimas de EDTA puede ser un problema. Para estas reacciones se recomienda almacenar el ADN en un buffer con una concentración de EDTA diez veces menor (TE 10: 0.1 o *TE Low*) con la finalidad de reducir la interacción del EDTA con los iones Mg_2^{++} .

Cabe recalcar que el Salting Out es útil solamente si se dispone de una buena cantidad de tejido muscular inicial para la extracción, pues se pierde mucho ADN durante la eliminación de las proteínas con el acetato de amonio. Si se dispone de tejidos poco abundantes (aletas, branquias, sangre, óvulos o larvas) u obtenidos por muestreo no invasivo (escamas o mucosa bucal) es conveniente utilizar otras metodologías como sílica (Yue y Orban, 2001), Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (Wasko et al., 2003), chelex 100 (Aranishi, 2006) o kits comerciales.

6.3 Región Hipervariable I (HVI)

6.3.1 Diversidad genética

La composición nucleotídica encontrada en la Región Hipervariable I fue mayor en contenido de A+T (~ 69.11%) que en contenido de G+C (~ 30.89%), lo cual es concordante con lo reportado para la Región Control de mamíferos (Brown et al., 1986; Saccone et al., 1987) y de peces (Meyer, 1993). Meyer (1993) explica que en la Región Control es común encontrar zonas con elevada frecuencia de A/T porque son más estables que las zonas con C/G.

La diversidad haplotípica (H_d) es un índice de diversidad genética que no solo depende del número de haplotipos, sino también de sus frecuencias. Si las frecuencias de los haplotipos son más o menos equitativas, sin predominancia de un haplotipo en particular, la diversidad haplotípica será alta. Por el contrario, si un haplotipo en particular es predominante en la población, se espera que la diversidad haplotípica de dicha población sea baja. La población de Ilo presentó una diversidad haplotípica alta ($H_d = 0.957$) precisamente porque presentó varios haplotipos con frecuencias similares, sin ningún haplotipo predominante. La población de Paita, en cambio,

presentó un número reducido de haplotipos siendo el haplotipo 1 el predominante (52%), por lo que presentó una baja diversidad genética ($H_d = 0.717$). Ventanilla presentó una diversidad haplotípica intermedia ($H_d = 0.893$). A nivel de la población total, la diversidad haplotípica fue moderadamente alta ($H_d = 0.859$). Estos valores de diversidad haplotípica son ligeramente menores a los valores reportados en *Scomber japonicus* del mar mediterráneo ($H_d = 0.978$) (Zardoya et al., 2004) y del mar de Taiwán ($H_d = 0.971$) (Tzeng et al., 2007).

La diversidad nucleotídica (π) a su vez depende tanto de las frecuencias de los haplotipos como del número de diferencias que lo distinguen entre ellos, por lo que está directamente relacionado al número de sitios polimórficos (S). A mayor cantidad de sitios polimórficos presentes en una población, mayor será el número de diferencias a pares entre sus haplotipos, por lo que la diversidad nucleotídica (π) también es mayor. La diversidad nucleotídica encontrada en Ilo ($\pi = 0.0102 = 1.21\%$) es prácticamente el doble comparada con los valores encontrados en Ventanilla ($\pi = 0.0058 = 0.58\%$) y Paita ($\pi = 0.0076 = 0.76\%$). Los valores de π de Ventanilla y Paita son bastantes similares a los encontrados en la corvina amarilla *Cynoscion acoupa* (Rodrigues et al., 2011), especie con una alta explotación en el mar de Brasil, pero extremadamente bajos comparados con otros estudios en peces teleósteos de importancia pesquera (Tabla 26).

Tabla 26. Diversidad haplotípica (H_d) y diversidad nucleotídica (π) encontradas en otras especies de peces de importancia pesquera en base a la Región Control

Especie	H_d	π	Referencia
Paita	0.717	0.0076 (0.76%)	Este estudio
<i>Scomber japonicus</i> (Perú)	Ventanilla 0.893	0.0058 (0.58%)	Este estudio
	Ilo 0.957	0.0121 (1.21%)	Este estudio
Total	0.859	0.0094 (0.94%)	Este estudio
<i>Scomber japonicus</i>	>0.98	0.0170 (1.70%)	Zardoya et al., 2004
<i>Scomber japonicus</i>	0.971	0.0170 (1.70%)	Tzeng et al., 2007
<i>Sciaenops ocellatus</i>	0.980	0.0300 (3.00%)	Seyoum et al., 2000
<i>Lutjanus peru</i>	0.966	0.0323 (3.23%)	Rocha Olivares et al., 2003
<i>Lutjanus campechanus</i>	0.970	0.0180 (1.80%)	Garber et al., 2004
<i>Lutjanus erythropterus</i>	0.990	0.0300 (3.00%)	Zhang et al, 2006
<i>Cynoscion acoupa</i>	0.892	0.00288 (0.28%)	Rodrigues et al., 2011

Es interesante ver cómo la diversidad genética (H_d) de la caballa peruana no es uniforme a lo largo del litoral peruano, sino que tiende a disminuir en el norte. Sin embargo, no es fácil identificar los factores responsables de la disminución de la diversidad genética en la caballa de Paita. La sobreexplotación pesquera podría ser un factor, la cual es identificada por Dulvy et al (2003) como una de las principales causas de disminución de diversidad genética en las especies marinas. Posiblemente en el norte del Perú, debido a la amplia plataforma continental, la caballa haya sufrido un evento de cuello de botella reciente ocasionada por la fuerte presión pesquera en dicha zona en los últimos años, concordante con la distribución mismatch multimodal encontrada en la población de Paita (Figura 19). Sin embargo no es posible concluir con certeza, con los datos disponibles, que el cuello de botella fuera la causa de la menor diversidad genética de Paita, pues para eso sería necesario utilizar una cantidad no menor de 5 microsatélites y muestras de individuos antes y después de dicho

evento. Otro punto de vista, más que de una diversidad genética menor propia de la caballa del norte, sería que la población de caballa del sur (Ilo) es más diversa genéticamente porque es la población original, concordante con el hallazgo de haplotipos ancestrales propias de Ilo en el árbol filogenético, y lo cual podría ser evidencia de una migración de sur a norte no reportada para la caballa. Posiblemente los individuos del sur hayan migrado hacia al norte en busca de aguas cálidas o hubo dispersión de larvas de sur a norte debido a la corriente de Humboldt. Un punto a favor a esta hipótesis es que las poblaciones de Ventanilla y Paita presentaron una diversidad nucleotídica mucho menor que la encontrada en Ilo y a las reportadas en otras especies en otros estudios, lo cual sería una evidencia de un efecto fundador reciente.

Para el análisis filogenético, el software jmodelTest sugirió el modelo HKY+I+G, el cual fue utilizado por Cheng et al (2011) para la Región Control. Ambos métodos de inferencia filogenética (ML y MV) propusieron casi la misma hipótesis evolutiva con bajos valores de soporte estadístico (bootstrap) en los nodos internos. La topología del árbol se caracterizó por una ausencia de clados filogenéticos, lo cual ha sido también encontrado por Zardoya et al (2004) y por Tzeng et al (2007) en otras latitudes.

Las tres poblaciones estudiadas presentaron haplotipos privados (Tabla 9), sin embargo, este hallazgo no indicaría estructuración geográfica, pues para esto los haplotipos privados de una población deben estar genéticamente alejados de los haplotipos privados de otra población. Si haplotipos privados de poblaciones diferentes se diferencian por solo uno o dos pasos mutacionales y se aprecian cercanamente ligados en la red de haplotipos, como en el caso de la caballa peruana, no sería evidencia de estructuración geográfica sino más bien de altos niveles de flujo génico,

concordante con la presencia de 4 haplotipos compartidos entre las tres poblaciones (Haplotipos 1,2, 3 y 4). Adicionalmente, la presencia de tres haplotipos predominantes en la población total (Haplotipos 1, 2 y 3) de donde nacen varios haplotipos de baja frecuencia, es indicio de expansión poblacional. La presencia de “*unresolved loops*” o relaciones no resueltas entre haplotipos en el network y apreciadas como figuras poligonales cerradas, se deba probablemente a la alta frecuencia de algunos sitios polimórficos. Los sitios polimórficos más frecuentes en la HVI de la caballa peruana fueron los sitios 18, 26, 119, 148 y 237 (Tabla 10), los cuales incrementan el número de vínculos entre haplotipos cercanos (Figura 19).

6.3.2 Historia demográfica

Se ha clasificado a los peces marinos en cuatro categorías en base a los valores combinados de la diversidad haplotípica (H_d) y la diversidad nucleotídica (π) (Grant y Bowen, 1998). La categoría correspondiente a la caballa peruana (valores altos de H_d y bajos de π), lo clasifica como una especie que ha sufrido una expansión poblacional luego de un periodo de bajo tamaño poblacional efectivo. Esta categoría es consistente con los valores negativos y significativos de los estadísticos F_s de F_u y el D^* de F_u y L_i y soportado por la distribución mismatch de tipo unimodal para la población total. Los valores del estadístico D de Tajima por su parte fueron ligeramente negativos y no significativos para Ilo y Ventanilla, el cual es también indicio de expansión poblacional. Paita sin embargo tuvo un valor positivo para el D de Tajima, debido a la presencia de un haplotipo muy frecuente (Haplotipo 1). Adicionalmente, la topología de la red de haplotipos también sugiere una expansión poblacional. Se dispone finalmente de varias evidencias de que la caballa del mar peruano ha pasado por una expansión poblacional ancestral, lo cual también ha sido reportado para *Scomber japonicus* en otras latitudes (Zardoya et al., 2004, Tzeng et al., 2007).

Los tiempos de expansión poblacional de la caballa estimados con dos tasas de mutación (9.3 y 3.6%) fueron de 620, 790 y 240, 306 años, los cuales concuerdan con el periodo Medio del Pleistoceno (1.8 millones de años – 10, 000 años). En este periodo hubieron glaciaciones que generaron descensos en el nivel del mar superiores a la de la última glaciación (150 pies por debajo del nivel actual del mar) (Zellmer, 1979), los cuales provocaron la pérdida de hábitat de peces marinos por retroceso de las aguas. La caballa al ser una especie pelágica costera propia de aguas cálidas vio su hábitat reducido por estos cambios, pero luego experimentó una expansión poblacional post-glacial al aumentar el nivel del mar. También es probable que la caballa no habitara aún las aguas del Pacífico Sudoriental durante el Pleistoceno Medio, sino que la colonizó recién a lo largo de este periodo en un efecto fundador migrando desde el Pacífico Occidental (Asia). Estas fechas tentativas de la expansión poblacional de caballa son solo estimaciones que dependen básicamente de la tasa de mutación empleada y el tamaño del marcador. Usando otros marcadores de mayor longitud y tasas de mutación más altas, la fecha estimada de expansión posiblemente concuerde con la última glaciación del Pleistoceno, periodo en el que el nivel del mar del Pacífico Sudoriental también presentó bajos niveles comparado al nivel actual.

6.4 Microsatélites

6.4.1 Marcador SJT18

Este marcador fue el único exitosamente genotipificado en este estudio. Su naturaleza microsatélite de tipo simple interrumpido $(CT)_6-(CT)_6$ puede haber disminuido en gran medida la tasa de stuttering durante la PCR. En comparación a los resultados obtenidos por Zeng y Cheng (2012) donde encontraron 16 alelos, y Cheng et al (2014) donde encontraron 13 alelos para este marcador, ambos estudios en el mar de China, en el mar peruano se encontraron solamente 11 alelos. Este hallazgo puede ser

resultado de la diferente historia evolutiva de la caballa en esta parte del Pacífico, pues no hay certeza de que los alelos encontrados en Perú sean los mismos alelos que los encontrados en el mar de China. Otras causas podrían ser la no amplificación de alelos de gran tamaño (Wattier et al., 1998), homoplasia o la no amplificación de alelos por aparición de mutaciones nuevas en los sitios de hibridación de los primers en la caballa peruana (alelos nulos).

El Test Exacto de desviación del Equilibrio de Hardy-Weinberg arrojó p-values no significativos para todas las poblaciones y para el total, lo cual indica que no hay desviaciones significativas del EHW. Este es concordante con los valores de Fis cercanos a cero (no hay un déficit significativo de heterocigotos) y la insignificante frecuencia en la incidencia de alelos nulos en la población ($P_{a.n} = 0.0434$). La no desviación del EHW sugiere que el número total de individuos genotipados (71) ha sido el adecuado, que la población no presenta endogamia (es panmíctica), que el marcador no se encuentra bajo selección y que no ha habido Efecto Wahlund (Wahlund, 1928), el cual es definido como el muestreo inadvertido de dos poblaciones distintas y considerarlas como si fueran una sola. Debido a la considerable lejanía geográfica entre las localidades estudiadas y a la correlación positiva entre las distancias geográficas y distancias genéticas encontrada en el Test de Mantel, el Efecto Wahlund es muy poco probable.

6.4.2 Efecto Stuttering (Bandas Tartamudas)

Los marcadores microsatélites SJT49 (Zeng y Cheng, 2012), Scja02, Scja07 (Yagishita y Kobayashi, 2008) y KSj12 (Cha et al., 2010) exhibieron un marcado efecto stuttering muy probablemente a la naturaleza de su motivo repetitivo de tipo dinucleótido puro. Experimentos cuantitativos han demostrado que la tasa de error por slippage de la

polimerasa durante la PCR que incentiva la amplificación de artefactos o bandas tartamudas está inversamente relacionada con la longitud de la unidad repetitiva y directamente relacionada con el número de unidades repetidas (longitud del alelo) (Hauge y Lit, 1993; Hite et al., 1997; Shinde et al., 2003). Por este motivo el efecto stuttering es un problema típico de los microsatélites dinucleótidos y no es común en microsatélites tri, tetra y pentanucleótidos (Edwards et al., 1991; Estoup y Angers, 1998; Naish y Skibinski, 1998).

El objetivo inicial de genotipar todos los individuos con cinco marcadores microsatélites no se pudo concretar porque estos cuatro marcadores microsatélites de tipo simple dinucleótido puro presentaron una tasa de stuttering demasiado elevada. Sin embargo, estos resultados no indican que estos marcadores no sean de utilidad, debido a que ya han sido utilizados en otros estudios (Zeng y Cheng, 2012; Yagishita y Kobayashi, 2008; Cha et al., 2010; Cheng et al., 2014), y solo se requiere cambiar de metodología de genotipificación (electroforesis capilar). Adicionalmente, para evaluar diferenciación poblacional, microsatélites con pocos alelos (bajo polimorfismo) son mucho más valiosos que los loci altamente polimórficos, pues en ellos es más probable hallar alelos asociados a una zona geográfica en particular (Skibinski, 1994).

6.5 Estructuración genética

Las pruebas de AMOVA para los dos marcadores utilizados (Región Hipervariable I y SJT18) mostraron una escasa diferenciación genética en las agrupaciones propuestas y casi toda la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones (Tabla 14 y Tabla 23). Estos resultados concuerdan con los bajos y no significativos valores de las comparaciones a pares de F_{ST} , Distancias F_{ST} , de Slatkin, la distancia genética de Nei para el marcador SJT18 y la no significancia de los Tests Exactos de diferenciación

poblacional. Esta escasa diferenciación poblacional encontrada en la caballa peruana es muy común en los organismos marinos en especial en especies de peces pelágicos, pues el gran tamaño poblacional efectivo, la alta fecundidad, la fase larvaria de tipo pelágica, el comportamiento migratorio y la alta capacidad de dispersión sumada a la ausencia de barreras geográficas, son factores que facilitan la conectividad de los individuos (flujo génico) y reducen la diferenciación genética dentro de las poblaciones (Ward et al., 1994; Nesbo et al., 2000; Beheregaray y Sunnucks, 2001). Según Grant y Bowen (1998), un indicio de subdivisión poblacional es que la diversidad haplotípica sea baja y la diversidad nucleotídica sea alta, lo cual no se ha encontrado en la caballa peruana.

La escasa diferenciación poblacional para *Scomber japonicus* también ha sido reportada en base a la Región Control en el mar de Taiwán (Tzeng et al., 2007) y en el mar Mediterráneo (Zardoya et al., 2004). En base a marcadores microsatélites se encontró escasa diferenciación en el mar de Japón (Yagishita y Kobayashi, 2008), Korea (Cha et al., 2010) y China (Zeng y Cheng, 2012; Zeng et al., 2012) mostrando la homogeneidad genética de esta especie en dicha región. Sin embargo, Cheng et al (2014), empleando 15 marcadores microsatélites, encontraron un moderado nivel de diferenciación genética en el mar de China.

La estructura genética de una especie es el resultado de la acción de eventos biológicos y ambientales que influyen también sobre otras especies que comparten la misma región geográfica. La anchoveta peruana *Engraulis ringens* es una especie pelágica costera que presenta una extensión geográfica similar a la de la caballa y que se encuentra distribuida en dos stocks (Norte-Centro y Sur) separados ambos por Punta San Juan (Ica, Latitud 15°S). Punta San Juan es el punto geográfico donde

empieza a estrecharse la plataforma continental y es una región de fuertes y constantes afloramientos (ascensos de aguas profundas frías ricas en nutrientes hacia la superficie) y en donde no es frecuente encontrar grandes cardúmenes de anchoveta, por lo que actúa como una barrera natural que separa las dos unidades poblacionales (Pauly y Tsukayama, 1987). Esta situación es bastante similar a los dos stocks propuestos para la caballa (Serra, 1982; Dawson, 1986) pues el punto de separación de ambos stocks es básicamente el mismo: Punta San Juan. La misma situación de dos stocks separados por Punta San Juan también ha sido propuesto para el recurso pejerrey *Odontesthes regia* (Fupuy, 1999). Sin embargo, un estudio genético-poblacional en anchoveta peruana en base al marcador intrónico Ck7 (intrón 7 del gen creatin-kinasa) no encontró diferenciación poblacional que apoye a la hipótesis de los dos stocks de anchoveta sugiriendo una escasa diferenciación genética en esta especie (Rojas, 2011), situación similar a lo que se reporta con el marcador HVI y el marcador microsatélite SJT18 para la caballa en el presente estudio. La escasa diferenciación genética encontrada entre grupos de individuos muestreados en supuestos “stocks diferentes” (llo vendría a pertenecer al supuesto “stock sur” de caballa) reflejaría que los afloramientos en Punta San Juan no actúan como una posible barrera que bloquee el flujo génico en estas especies pelágicas, lo cual se vuelve evidente durante el fenómeno El Niño donde las anchovetas del Norte-Centro migran hacia el Sur. La discontinuidad en el ancho de la plataforma continental, más angosta a partir de Punta San Juan, parece tampoco limitar el flujo génico en esta especie. Adicionalmente, al no haber reportes de corrientes extrañas que desvíen la dispersión de huevos y de larvas y la inexistencia de gradientes de salinidad o de temperatura en el mar peruano signifique que muy posiblemente no existan barreras significativas al flujo génico para esta especie y que el mar peruano sea un medio

básicamente homogenizador, por lo que se espera encontrar patrones similares de estructuración genética en posteriores estudios en otras especies de peces pelágicos. La máxima diferenciación poblacional encontrada en esta especie fue al comparar localidades extremas (Paita vs Ilo), lo cual concuerda con la correlación positiva encontrada en el Test de Mantel para ambos tipos de marcadores (mitocondrial y nuclear). Además, el hecho de que las tres localidades compartan haplotipos y alelos y que al menos uno sea el predominante, es indicio de que esta especie presenta un alto nivel de flujo génico. Se puede inferir que la población de caballa peruana se comporta como una unidad panmíctica debido al elevado flujo génico y que presenta un patrón de estructuración genética de aislamiento por distancia, lo cual es típico de peces marinos pelágicos con alta capacidad de dispersión y gran tamaño de población efectiva (Hauser y Carvalho, 2008).

7. CONCLUSIONES

- Los marcadores Región Hipervariable I (mitocondrial) y microsatélite SJT18 (nuclear) no permitieron detectar diferenciación genética significativa entre las poblaciones estudiadas. Se concluye que la caballa del mar peruano constituye una población con un comportamiento panmíctico que sigue un patrón de aislamiento por distancia lo cual refuerza la hipótesis de un solo stock.
- La población total de caballa exhibió una alta diversidad genética siendo la población Sur (Ilo) la de mayor diversidad genética y la población Norte (Paita) la de menor diversidad genética.
- Las modificaciones propuestas para el método original del Salting Out permitieron optimizar la obtención de ADN genómico a partir del tejido muscular de *Scomber japonicus*.

8. RECOMENDACIONES

- Para futuros estudios genético-poblaciones en *Scomber japonicus* se recomienda incluir un mayor número de poblaciones considerando otros puntos del mar peruano y de los mares de Panamá, Colombia, Ecuador y Chile, además de incrementar el número de individuos utilizados por localidad para aumentar el poder estadístico del análisis.
- Emplear secuencias de otros marcadores mitocondriales de alta variabilidad intrapoblacional como ND2, 12SrRNA y 16SrRNA y utilizar una mayor cantidad de marcadores microsatélites desarrollados tanto para *Scomber japonicus* (mediante librerías genómicas o a partir de librerías de ESTs) como para otras especies cercanas (amplificación cruzada). Se recomienda utilizar tecnología de la electroforesis capilar para agilizar el proceso de genotipificación de microsatélites y minimizar el problema del Efecto Stuttering.
- Detectar marcadores nucleares intrónicos mediante EPIC-PCR cuyos polimorfismos de longitud (ILPs) sean de utilidad para estudiar la estructuración genética en esta especie.
- Para amplificar la Región Control completa de *Scomber japonicus* y de otros teleósteos se recomienda emplear el primer L-Serg (5' CTC AGC GTT TAG AGC ATC GGT C 3') propuesto en el presente estudio.

9. REFERENCIAS

- AKAIKE H. 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov, B. N., Csaki, F. (Eds). Proceedings of the Second International Symposium on Information Theory, Akadémia Kiado. Budapest. pp. 267 – 281
- ALJANABI SM y MARTÍNEZ I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25:4692-4693.
- ALLENDORF F, RYMAN N y UTTER, F. 1987. Genetics and fishery management: Past, present and future. N. Ryman and F.M. Utter (Eds.), *Population Genetics and Fishery Management*. Washington: University of Washington: 1-20.
- ARANISHI F. 2006. Single fish egg DNA extraction for PCR amplification. *Conservation Genetics* 7:153-156
- BAJORATH J, ET AL. 1988. The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium. *Eur J. Biochem*, 176, 441-447
- BANDELT H, FORSTER P y RÖHL A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- BEHEREGARAY LB y SUNNUCKS P. 2001. Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. *Molecular Ecology*, 10, 2849–2866.
- BÖHM C, MARTÍNEZ C, ARANDA E y KLEIMAN J. 1984. Perfiles indicativos del sector pesquero nacional. Recurso, tecnología, producción y mercado. Caballa (*Scomber japonicus peruanus*). Corporación de Fomento de la Producción; Instituto de Fomento Pesquero. 103 pp.
- BOTSTEIN D, WHITE R, SKOLNICK M y DAVIS R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331
- BROWN GG, GADALETA G, PEPE G, SACCONI C, ET AL. 1986. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 192: 503-511.
- BUROKER N, BROWN JR, GILBERT T, O'HARA PJ, ET AL. 1990. Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: an illegitimate elongation model. *Genetics* 124:157-63
- CALLEN DF, THOMPSON AD, ET AL. 1993. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am. J. Genet.* 52, 92-927.
- CANALES-AGUIRRE CB, FERRADA S y GALLEGUILLOS R. 2010. Isolation and characterization of microsatellite loci for the jack mackerel (*Trachurus murphyi* Nichols, 1920). *Conservation Genetics* 11(3): 1235-1237.
- CARVALHO GR y HAUSER L. 1994. Molecular Genetics and the stock concept in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish*, 4: 326-350
- CASTRO HERNÁNDEZ JJ. 1991. Ecología trófica de la caballa (*Scomber japonicus* Houttuyn, 1780), en aguas del Archipiélago Canario. Tesis Doctoral. Departamento de Biología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 242 pp.

- CASTRO JJ y SANTANA AT. 2000. Synopsis of biological data on the chub mackerel (*Scomber japonicus* Houttuyn, 1782). FAO Fisheries Synopsis. No. 157. FAO. Rome. 77 pp.
- CATANESE G, MANCHADO M e INFANTE C. 2010. Evolutionary relatedness of mackerels of the genus *Scomber* based on complete mitochondrial genomes: Strong support to the recognition of Atlantic *Scomber colias* and Pacific *Scomber japonicus* as distinct species
- CHA HK, AN HS, CHOI JH, KANG S, PARK J y KIM KK. 2010. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers for genetic analysis of chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Conserv. Genet. Res.* 2, 7–9.
- CHENG J, GAO T, MIAO Z y YANAGIMOTO T. 2011. Molecular phylogeny and evolution of *Scomber* (Teleostei: Scombridae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, Volume 29, Issue 2, pp.297-310
- CHENG Q, ZHU Y y CHEN X. 2014. High polymorphism and moderate differentiation of chub mackerel, *Scomber japonicus* (Perciformes: Scombridae), along the coast of China revealed by fifteen novel microsatellite markers. *Conserv Genet*,
- CHISTIAKOV DA, HELLEMANS B y VOLCKAERT FAM. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, Vol.255, (May 2006), pp.1-29, ISSN 0044-8486.
- COLLETTE BB y NAUEN C. 1983. FAO Species catalogue. Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date. FAO Fish. Synop. No. 125. 137 pp.
- COLLETTE BB. 1999. Mackerels, molecules and morphology. In: Seret B. and Sire J-Y (eds). *Proceedings of the 5th Indo-Pacific Fish Conference*, Noumea, 1997, pp. 149-164.
- COLLETTE BB. 2003. Family Scombridae-mackerels, tunas, and bonitos. In: *Annotated Checklist of Fishes No. 19*, by Calif. Acad. Sci., (ed) San Francisco. California. 28 pp.
- CREMONTE F y SARDELLA N. 1997. The parasitofauna of *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782 (Pisces: Scombridae) in two zones of the Argentine Sea. *Fish. Res.*, 31(1-2): 1-9.
- CROUSE J y AMORESE D. 1987. Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an alternative to Sodium Acetate". *Focus* 9 (2): 3–5. Retrieved 2008-09-10.
- DAWSON WA. 1986. The interpretation of otolith structure for the assessment of age and growth of some pelagic fishes from the coast of Ecuador. Mackerel (*Scomber japonicus*), pacific sardine (*Sardinops sagax*), pacific thread herrings (*Opisthonema medirastre* and *Opisthonema bullen*), and round herring (*Etrumeus teres*). *Bol. Cient. Téc. Inst. Nacnl. Pesca*, 9(1):1-24
- DI RIENZO A, PETERSON AC, GARZA JC, VALDES AM, SLATKIN M, ET AL. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3166–3170.
- DOMINGUES VS, BUCCIARELLI G, ALMADA VC y BERNARDI G. 2005. Historical colonization and demography of the Mediterranean damsel W sh, *Chromis chromis*. *Mol. Ecol.* 14, 4051–4063.

- DONALDSON KA y WILSON RR. 1999. Amphi-Panamaic geminates of snook (Percoidei: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rates in the mitochondrial DNA control region of fishes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 13: 208-213
- DULVY NK, SADOVY Y y REYNOLDS JD. 2003. Extinction vulnerability in marine populations. *Fish Fisheries* 4:25-64.
- EDWARDS A, CIVITELLO A, HAMMOND HA y CASKEY CT. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, 49, 746–756.
- ELLEGREN H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5(6):435-445.
- ESTOUP A y ANGERS B. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations, pp. 55–86 in *Advances in Molecular Ecology*, edited by G. Carvalho. NATO Press, Amsterdam
- EXCOFFIER L y LISCHER HEL. 2010. Arlequin Suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567
- EXCOFFIER L, SMOUSE PE y 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
- FELSENSTEIN J. 1985. Confidence limits on ha phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791
- FITCH JE. 1951. Age composition of the southern California catch of pacific mackerel 1939-1940 through 1950-1951. *Calif Dep. Fish Game, Fish. Bull.*, 83:1-73.
- FRESNEDA-RODRÍGUEZ A, CHASUI-VELASCO L y ALONSO-CARVAJAL D. 2013. Amplificación cruzada de microsatélites para estudios poblacionales de dos especies de camarón del género *Litopenaeus* en Colombia. *Boletín de investigaciones marinas y costeras – INVEMAR*.
- FU y LI W. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133:693-709
- FU YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147:915–925.
- FUENTES H, ANTONIETTI E y MUCK IP. 1989. Alimentación de la merluza (*Merluccius gayi peruanus*) de la zona de Paita. *Memorias del Simposio Internacional de los Recursos Vivos y las Pesquerías en el Pacífico Sudeste Viña del Mar, 9-13 de maig del 1988*. Comisión Permanente del Pacífico Sur (CPPS), *Rev. Pacífico Sur* (Número Especial).
- FUPUY, J. 1999. Dinámica Poblacional de *Odontesthes regia regia* “pejerrey” en el Litoral Peruano durante Setiembre 1986 – Agosto 1996. Tesis para optar El Título Profesional de Licenciado en Biología Pesquera. Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento Académico de Pesquería y Zoología. 65 pp.
- GANOPOULOS I, BOSMALI I, MADEISIS P y TSAFTARIS A. 2012. Microsatellite genotyping with HRM (High Resolution Melting) analysis for identification of the PGI

common bean variety Plake *Megalosperma Prespon*. European Food Research and Technology 234: 3. 501-508

- GARBER AF, TRINGALI MD y STUCK KC. 2004. Population structure and variation in red snapper (*Lutjanus campechanus*) from the Gulf of Mexico and Atlantic Coast of Florida as determined from mitochondrial DNA control region sequence. Mar Biotechnol 6:175-185.
- GONZÁLEZ EG. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. Graellsia 59(2-3):377-388.
- GOUDET, J. 2002. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2002
- GRANT WS y BOWEN BW. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. J. Hered., 89: 415-426.
- GUO X, LIU S y LIU Y. 2003. Comparative analysis of the mitochondrial DNA control region in cyprinids with different ploidy level. Aquaculture 224: 25-38. doi:10.1016/S0044-8486(03)00168-6.
- GUPTA PK, RUSTGI S, SHARMA S, ET AL. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. Molecular Genetics and Genomics, 270, 315–323.
- HALE ML, BURG TM y STEEVES TE. 2012. Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. PLoS ONE 7(9): e45170.
- HALL TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41, 95–98
- HARPENDING H. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. Human Biol. 66:591–600.
- HASEGAWA M, KISHINO H y YANO T. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. J Mol Evol 22:160-174
- HAUGE XY y LITT M. 1993. A study of the origin of shadow bands seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. Human Molecular Genetics 2, 411–415
- HAUSER L y CARVALHO GR. 2008. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. Fish Fish 9: 333–362.
- HILZ H, ET AL. 1975. Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation fo nucleic acids and the degradation of “masked” proteins, Eur. J. Biochem., 56, 103-108.
- HITE JM, ECKERT KA, CHENG KC. 1996. Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification.
- HOFFMAN JI y AMOS W. 2005. Microsatellite genotyping errors: detection, approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. Mol. Ecol., 14, 599–612.

- IMARPE ITP. 1996. Compendio biológico tecnológico de las principales especies hidrobiológicas comerciales del Perú. Callao, p. 39-41
- IMARPE. 2006. Informes Internos del Seguimiento de Pesquerías Costeras.
- INFANTE C, BLANCO E, ZUASTI E, CRESPO A y MANCHADO M. 2007. Phylogenetic differentiation between Atlantic *Scomber colias* and Pacific *Scomber japonicus* based on nuclear DNA sequences. *Genetica* 130, 1–8.
- JARNE P y LAGODA PJL. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Evolution and Ecology*, volun 11, N° 10, pag. 424-429
- KASHI Y, KING D y SOLLER M. 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics*, Vol.13, No.2, pp. 74–78, ISSN 0168-9525.
- KIMURA M y CROW JF. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725:738
- KIMURA M y CROW JF. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-38.
- KIMURA M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120
- KONCHINA YV. 1982. Feeding of the pacific mackerel, *Scomber japonicus* (Scombridae), near the Peruvian coast. *J. Ichthyol.*, 22(6):102-111.
- KOSKI V, SKRØPPA T, PAULE L, WOLF H y TUROK J. 1997. Technical guidelines for genetic conservation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy
- KOTLYAR AN y ABRAMOV AA. 1983. Some biological properties of peruvian mackerel, *Scomber japonicus peruanus* (Scombridae). *J. Ichthyol.*, 22(6):91 -101.
- KRAMER D. 1969. Synopsis of the biological data on the pacific mackerel, *Scomber japonicus Houttuyn* (northeast Pacific). U.S. Fish Wildl. Serv, Circ., 302. 18 pp.
- LAKSHMINARAYANA V.; SUNIL A y NAGARAJU, J. 2007. Capillary Electrophoresis is Essential for Microsatellite Marker Based Detection and Quantification of Adulteration of Basmati Rice (*Oryza sativa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007. 55(20). Pp. 8112-8117.
- LEE WJ, CONROY J, HOWELL WH y KOCHER TD. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution* 41(1): 54-66.
- LEVINSON G y GUTMAN GA. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 203-221
- LIBRADO P y ROZAS J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452
- LIN YY. 1998. Population genetic structure of *Scomber australasicus* and *Scomber japonicus* fisheries resources. Master thesis of Institute of Oceanography, National Taiwan University, 59pp. (In Chinese with English abstract)

- LINDAHL T y NYBERG B. 1972. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11 (19), 2610-3618
- MANTEL N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, Baltimore, v. 27. P. 209-220, 1967
- MARÍN A, FUJIMOTO T y ARAI K. 2011. Isolation and characterization of 12 microsatellite loci in the Peruvian scallop *Argopecten purpuratus* and cross-species amplification in other scallop species (family Pectinidae). *Conservation Genetics Resources*. Technical Note
- MARSHALL, TC, SLATE, J, KRUK, LEB y PEMBERTON, JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.
- MATSUI T. 1967. Review of the mackerel genera *Scomber* and *Rastregiller* with description of a new species of *Rastregiller*. *Copeia*, 1967: 71-83
- MENDO J. 1984. Edad, crecimiento y algunos aspectos reproductivos y alimentarios de la caballa *Scomber japonicus peruanus*. *Bol. Inst. Mar Perú-Callao*, 8(4):101 -156
- MENZ A y PIZARRO S. 1988. The fishery, biology and bionomic of the Pacific mackerel (*Scomber japonicus*) in Ecuador. INPE: Instituto Nacional de Pesca de Ecuador, Boln cient. tecn., Guaiacquil, v. 9, n. 10, p. 16-48.,
- MEYER A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. Hochachka and Mommsen (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Vol. 2.
- MUSTAFA S. 1999. Genetics in sustainable fisheries management. *Fishing new books*, oxford, pp: 3-23.
- NAISH KA y SKIBINSKI DOF. 1998. Tetranucleotide microsatellite loci for indian carp. *Journal Fish Biol*, In press
- NEI M y LI WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS USA* 76:5269-5273
- NEI M y TAJIMA F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97. 145-163
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106:283-292
- NEI M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590
- NEI M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY.
- NEI M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70:3321-3323.
- NESBO CL, RUENESS EK, IVERSEN SA, SKAGEN DW y JAKOBSEN BS. 2000. Phylogeography and population history of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.): a genealogical approach reveals genetic structuring among the eastern Atlantic stocks. *Proc. R. Soc. London, Ser. B*, 267: 281-292.

- ÑIQUEN M y BOUCHON M. 2004. Impact of El Niño of pelagic fisheries in Peruvian waters. *Deep-Sea Res.*, II, v. 51, p. 563-574
- O'CONNELL M y WRIGHT JM. 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, 331- 363.
- OHTA T y KIMURA M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet. Res.* 22: 201–204.
- OJEDA FP y JAKSIC F. 1979. Utilización diferencial de recursos alimenticios por dos poblaciones simpátricas de *Scomber japonicus peruanus* y *Sarda sarda chilensis* en el norte de Chile. *Medio Ambiente*, 4(1): 19-23.
- OLDEPESCA. 1986. Bases biológicas y marco conceptual para el manejo de los recursos pelágicos en el Pacífico Sur oriental. *Doc. Pesca*, n. 1, 181
- ORÉ DS. 2011. Estructura genética de la población de merluza peruana (*Merluccius gayi peruanus*) (Primavera, 2001) usando variantes de secuencia de la región de control mitocondrial. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Título Profesional de Biólogo con mención en Genética.
- O'REILLY P y WRIGHT JM. 1995. The evolving technology of DNA Fingerprinting and its application to Fisheries and aquaculture. *J. Fish Biol.* 47 (Suppl. A), 29±55.
- OSTRANDER EA, JONG PM y DUYK G. Construction of small insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proceeding National Academy of Sciences, USA.* 1992, vol. 89, p. 3419-3434.
- OYARZÚN C. 2001. Catálogo de los peces presentes en el sistema de corriente de Humboldt frente a Chile Centro-Sur. Departamento de Oceanografía. Sección pesquerías, Universidad de Concepción, Chile.
- PARDO SA y OLIVA LJ. 1992. Estimación de la talla de primera madurez sexual de la caballa (*Scomber japonicus peruanus*) en la zona norte de Chile durante el periodo de máxima actividad reproductiva. *Invest. Pesq. Santiago*, 37:97-1 06.
- PAULY D y TSUKAYAMA I. 1987. 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, Manila, Philippines. *ICLARM Studies and Reviews*, 15: 351
- PEAKALL R y SMOUSE PE. 2006. GenAlex 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: 288–295.
- PERROTTA RG y AUBONE A. 1991. De nuevo sobre la morfometría de la caballa (*Scomber japonicus*). *Frente Marít.*, 8 (A): 37-42.
- PERROTTA RG y PERTIERRA JP. 1993. Sobre la dinámica poblacional de la caballa en la pesquería de Mar del Plata. Período 1980-19 90. In: G.R. Perrotta (Ed.), *Estudio biológico y pesquero de la caballa (Scomber japonicus)* INIDEP. *Doc. Cient.*, 2: 31-44
- POSADA D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25: 1253–1256.

- POWELL W, MORGANTE M, ANDRE C y ET AL. 1995. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology*, Vol.5, No.9, (September 1995), pp. 1023-1029, ISSN 0960-9822.
- PRIMMER CR, MOLLER AP y ELLEGREN H. 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5, 365–378
- QIU X, XU L, LIU S, WANG X y MENG X. 2009. Eleven polymorphic simple sequence repeat markers from expressed sequence tags of Pacific oyster *Crassostrea gigas* EST database. *Conserv. Genet.* 10, 1773–1775.
- RAJENDRAKUMAR P, BISWAL AK, BALACHANDRAN SM, SRINIVASARAO K y SUNDARAM RM. 2007. Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. *Bioinformatics*, Vol.23, No.1, (January 2007), pp. 1–4, ISSN 1460-2059.
- RAMOS-ONSINS SE y ROZAS J. 2002 Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19:2092–2100.
- RICHARDS E. 1988. Preparation of genomic DNA from plant tissue. In: Ausubel M, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K (eds) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley, New York
- RICO C, RICO I y HEWITT G. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proc. R. Soc. Lond, B, Biol. Sci*, vol. 263, p. 549-557.
- ROCHA OLIVARES A y SANDOVAL C. 2003. Mitochondrial diversity and genetic structure in allopatric populations of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Ciencias Marinas* 29 (2), 197-209
- RODRIGUES R, SCHNEIDER H, SANTOS S, VALLINOTO M, SAINT-PAUL U y SAMPAIO I. 2011. Low levels of genetic diversity depicted from mitochondrial DNA sequences in a heavily exploited marine fish (*Cynoscion acoupa*, Sciaenidae) from the northern coast of Brazil. *Genetics and Molecular Biology*.
- ROGERS AR y HARPENDING H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9:552–569.
- ROGERS AR. 2002. The theoretical mismatch distribution. *Lecture Notes on Gene Genealogies*, 7: 30-46.
- ROJAS MÁLAGA DE. 2011. Evaluación de marcadores moleculares ILP y STRs heterólogos en la anchoveta peruana *Engraulis ringens* para estudios poblacionales. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo.
- ROJAS O y MUJICA A. 1981. Delimitación de las áreas de desove, pre-reclutamiento y estimación de la abundancia relativa de huevos y larvas de peces pelágicos de importancia económica. Informe Técnico. Subsecretaría de Pesca/Instituto de Fomento Pesquero. 82 p.
- ROLDÁN N, PERROTTA RG, CORTEY M y PLA C. 2000. Molecular and morphologic approaches to discrimination of variability patterns in chub Mackerel, *Scomber japonicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 253: 63-74.

- SACCONI C, PESOLE G y SBISA E. 1991. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. *J. Mol. Evol.* 33: 83-91
- SÁNCHEZ SILVA LG. 2013. Detección de microsatélites trinucleótidos en *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú. Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo.
- SBISA E, TANZARIELLO F, REYES A, PESOLE G y SACCONI C. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structure analysis: Identification of new conserved sequence and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205:125–140.
- SCHLÖTTERER C, AMOS B y TAUTZ D. 1991. Conservation of Polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature* 354: 63-65.
- SCHLÖTTERER C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109:365-371.
- SCHNEIDER S y EXCOFFIER L. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*. 152:1079–1089.
- SCOLEY DR, COLETTE BC y GRAVES JE. 1998. Global phylogeography of mackerels of the genus *Scomber*. *Fishery Bulletin* 96, 823–842.
- SELKOE KA y TOONEN RJ. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, Vol.9, No.5, (May 2006), pp. 615–629, ISSN 1461-0248.
- SERRA JR. 1982. Caballa (*Scomber japonicus peruanus*, Jordan y Hubbs) En: Estado Actual de las Principales Pesquerías Nacionales. Bases para un Desarrollo Pesquero. Corporación de Fomento de la Producción (CORFO)/Instituto de Fomento Pesquero (IFOP). AP 82-19. 30 p. Santiago, Chile.
- SEYOUM S, TRINGALI MD, BERT TM, MCELROY D y STOKES R. 2000. An analysis of genetic population structure in red drum, *Sciaenops ocellatus*, based on mt DNA control region sequences. *Fish Bull* 98:127-138.
- SHEDLOCK AM, PARKER JC, CRISPIN DA, PIETSCH TW y BURMER GC. 1992. Evolution of the salmonid mitochondrial control region. *Mol Phyl Evol* 1:179-192
- SHINDE D, LAI Y, SUN F y ARNHEIM N. 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 31, 974–980.
- SILVA VALLE MZ. 2010. Evaluación de marcadores nucleares por EPIC-PCR y amplificación cruzada para estudios poblacionales en *Merluccius gayi peruanus* en el mar peruano. Lima, Perú, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis para optar el título profesional de Biólogo con Mención en Hidrobiología y Pesquería.
- SKIBINSKI DOF. 1994. The potential of DNA techniques in the population and evolutionary genetics of aquatic invertebrates. In: *Proceedings of the Conference on Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*, 10–16 Sept 1992, Bangor, UK. (Beaumont, A., ed.): 177–199. Chapman and Hall, London.

- SLATKIN M y HUDSON R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562
- SLATKIN M. 1994. Gene flow and population structure. *Ecological Genetics*.
- SLATKIN M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139, 457-462
- SMITH T y WAYNE R. 1996. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press.
- SORANZO N, PROVAN J y POWELL W. 1999. An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome*, Vol.42, No.1, (February 1999), pp. 158–161, ISSN 0831-2796.
- SOUTHERN SO, SOUTHERN PJ y DIZON AE. 1988. Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome. *J Mol Evol* 28: 32-42. doi: 10.1007/BF02143495. PubMed: 3148740.
- TABERLET P. 1996. The Use of Mitochondrial DNA Control Region Sequencing in Conservation Genetics. En: *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Smith, T.B. and Wayne, R.K (Eds)
- TAJIMA F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123:585–595.
- TAMURA K, DUDLEY J, NEI M y KUMAR S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599
- TANG CY, TZENG CH, CHEN CS y CHIU TS. 2009. Microsatellite DNA markers for population-genetic studies of blue mackerel (*Scomber australasicus*) and cross-specific amplification in *S. japonicus*. *Permanent Genetic Resource Note*.
- TAUTZ D y RENZ M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12, 4127-4138
- TEMPLETON A. 2006. *Population Genetics and Microevolutionary Theory*. New Jersey, Willer-Liss.
- TORNARITIS M, PERAKI E, GEORGULLI M, ET AL. 1993. Fatty acid composition and total fat content of eight species of Mediterranean fish. *int J food Sci nutr* 45: 135-139.
- TZENG TD y YEH SY. 2007. Morphological variation in the common mackerel (*Scomber japonicus*) off Taiwan. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 34(2): 199-207.
- TZENG TD, WANG D, HAUNG HL y YEH SY. 2007. Genetic diversity and population expansion of the common mackerel (*Scomber japonicus*) off Taiwan. *J.Fish. Soc. Taiwan* 34, 281–289.
- VARSHNEY RK, GRANER A y SORRELLS ME. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23, 48–55.
- WAHLUND S. 1928. Composition of populations from the perspective of the theory of heredity. *Hereditas* 11: 65–106

- WARD RD, WOODMARK M y SKIBINSKI D. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*, 44, 213–232.
- WASKO AP, MARTINS C, OLIVEIRA C y FORESTI F. 2003. Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* 138:161-165.
- WATANABE T. 1970. Morphology and ecology of early stages of life in japanese common mackerel, *Scomber japonicus* Houttuyn, with special reference to fluctuation of population. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, 62, 1-283.
- WATTIER R, ENGEL CR, SAUMITOU P Y VALERO M. 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: Experimental evidence at the dinucleotide locus gv1ct in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Mol. Ecol.* 7: 1569–1573.
- WRIGHT J.M. 1993. DNA fingerprinting of fishes. In Hochachka, P.W. and Mommsen, T., eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 2. New York: Elsevier, pp. 57-91.
- WRIGHT JM y BENTZEN P. 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. *Reviews in FishBiology and Fisheries* 4: 384–388.
- XANTHOPOULOU A., GANOPOULOS I, ET AL. 2014. Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for genotyping and molecular characterization of an *Olea europaea* germplasm collection.
- YAGISHITA N y KOBAYASHI T. 2008. Isolation and characterization of nine microsatellite loci from the chub mackerel, *Scomber japonicus* (Perciformes, Scombridae). *Molecular Ecology Resources*. 8, 302-304.
- YUE GH y ORBAN L. 2001. Rapid isolation of DNA from fresh and preserved fish scales for polymerase chain reaction. *Marine Biotechnology* 3: 199-204.
- ZANE L, BARGELLONI L y PATARNELLO T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11, 1–16.
- ZARDOYA R, CASTILHO R, GRANDE C, FAVRE-KREY L, CAETANO S, ET AL. 2004. Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology*. 13, 1785-1798.
- ZELLMER LR. 1979. Development and application of a Pleistocene sea level to the Coastal Plain of southeastern Virginia: Williamsburg, Va., College of William and Mary, School of Marine Science, Unpub. Master's Thesis, 85p
- ZENG L y CHENG Q. 2012. Thirty novel microsatellite markers for the coastal pelagic fish, *Scomber japonicus* (Scombridae). *J. Genet* 91:e64
- ZENG L, CHENG Q y CHEN X. 2012. Microsatellite analysis reveals the population structure and migration patterns of *Scomber japonicus* (Scombridae) with continuous distribution in the East and South China Seas. *Biochemical Systematics and Ecology* vol. 42 June, p 83-93
- ZHANG J, CAI Z y HUANG L. 2006. Population genetic structure of crimson snapper *Lutjanus erythropterus* in East Asia, revealed by analysis of the mitochondrial control region. *J Mar Sci* 63:693-704

10. ANEXOS

ANEXO 1

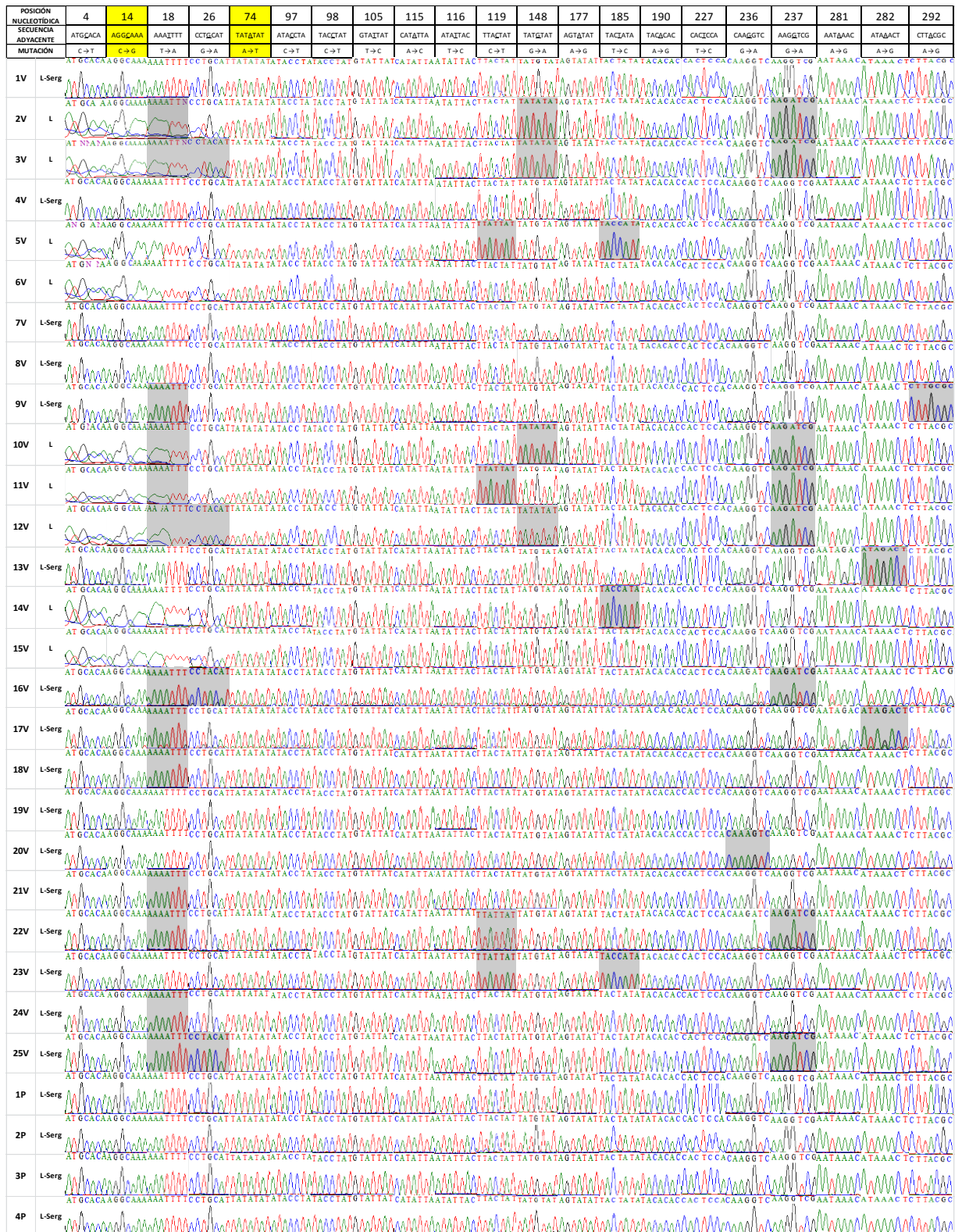
Tabla 27. Concentraciones y purzas de los ADNs obtenidos con el método Salting Out modificado de todos los individuos empleados en la tesis. Las mediciones fueron realizadas usando un Espectrofotómetro Nanodrop Thermo Scientific.

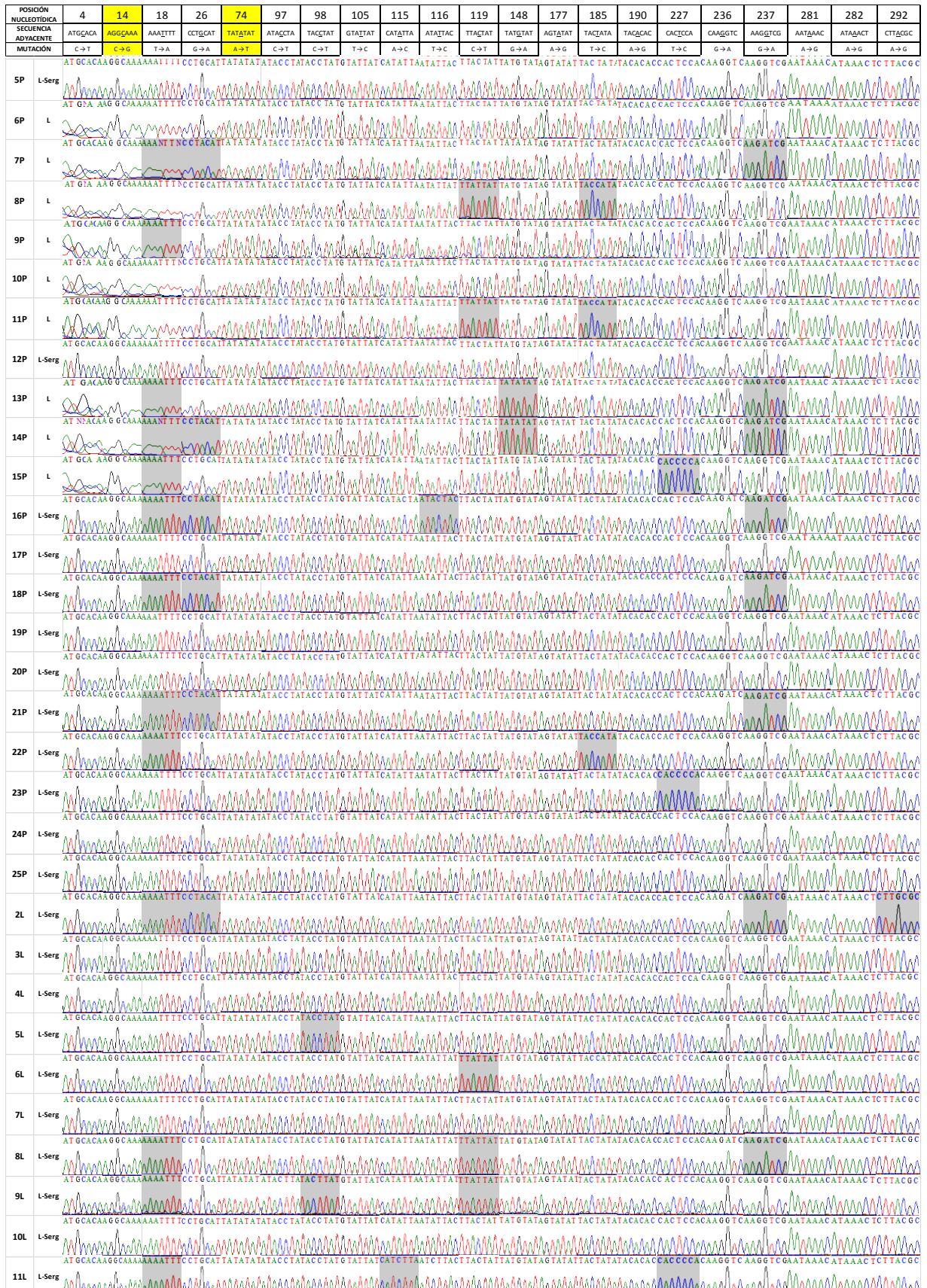
PAITA			VENTANILLA			ILO		
Individuo	Concentración (ng/μl)	Pureza* (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	Individuo	Concentración (ng/μl)	Pureza* (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	Individuo	Concentración (ng/μl)	Pureza* (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
1P	98.50	1.85	1V	272.8	2.03	1L	97.3	2.04
2P	65.10	1.97	2V	385.6	2.07	2L	250.9	2.05
3P	126.2	1.99	3V	154.6	2.08	3L	326.3	1.97
4P	119.4	1.97	4V	91.5	2.04	4L	869.1	2.08
5P	118.4	2.05	5V	452.4	2.08	5L	254.4	2.06
6P	59.40	2.03	6V	321.7	1.97	6L	195.7	2.08
7P	177.7	1.99	7V	234.9	1.72	7L	455.0	2.02
8P	159.3	1.9	8V	269.5	1.63	8L	235.9	1.97
9P	111.6	2.05	9V	410.6	2.01	9L	88.20	1.88
10P	70.90	2.00	10V	323.2	2.05	10L	329.0	2.04
11P	139.8	2.04	11V	304.0	2.04	11L	456.2	2.03
12P	181.6	2.1	12V	347.8	2.08	12L	587.2	2.02
13P	488.4	2.15	13V	340.8	2.10	13L	261.8	2.09
14P	360.3	2.11	14V	242.8	2.07	14L	237.7	1.98
15P	310.4	2.08	15V	506.2	2.08	15L	239.9	1.98
16P	277.2	2.11	16V	431.6	2.04	16L	93.00	1.94
17P	430.0	2.09	17V	197.7	2.06	17L	181.7	1.15
18P	459.0	2.11	18V	367.7	2.02	18L	489.9	2.15
19P	295.4	2.09	19V	366.8	2.05	19L	1207.5	2.05
20P	389.6	2.05	20V	828.0	2.05	20L	490.0	2.05
21P	416.3	2.11	21V	700.3	2.07	21L	441.0	2.03
22P	277.9	2.08	22V	231.2	2.04	22L	193.2	1.90
23P	432.7	2.12	23V	336.6	2.04	23L	208.3	2.00
24P	476.0	2.11	24V	871.9	1.87	24L	224.0	2.02
25P	629	2.07	25V	366.7	2.01	25L	162.8	1.93

* Para ADN valores de A₂₆₀/A₂₈₀ > 1.8 indican alta pureza

ANEXO 2

CURACIÓN DE LOS SITIOS POLIMÓRFICOS DETECTADOS EN LA HVI*, **





ANEXO 3

EQUIPO DE ELECTROFORESIS VERTICAL C.B.S. SCIENTIFIC



Figura 35. Equipo de electroforesis vertical CBS Scientific

ANEXO 4

COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA TESIS

Todas las soluciones se deben preparar con agua bidestilada, y deben ser autoclavadas antes de usar a excepción de las soluciones de acrilamida y el Buffer de carga. Verificar el PH final. Se indican a continuación las concentraciones finales de los componentes para cada solución:

1) Buffer de Lisis TNE- UREA (Método modificado)

Tris 20mM, NaCl 400mM, EDTA 20mM, Urea 5M (PH = 7.5)

2) Buffer TBE 10X

Tris 0.89M, Ácido Bórico 0.89M, EDTA 0.02M (PH = 7.5)

3) Solución Stock de Acrilamida 21% (AKA 21%)

Acrilamida 20%, Bis-Acrilamida 1%

4) Solución de Acrilamida 6% DENATURANTE (Solución de trabajo)

AKA 6%, TBE 1X, Urea Grado BM 9M

5) Soluciones TE 20:1/TE 20:5

Tris 20mM, EDTA 1Mm / Tris 20mM, EDTA 5mM (PH = 8)

6) Buffer de Carga 6X (Loading Buffer 6X)

Glicerol 30 %, Azul de bromofenol 0.25 %, Xilencianol 0.25 %, TBE 1X

7) Buffer Formamida (Loading Buffer)

Formamida 90%, Azul de Bromofenol 0.1%, Xilencianol 0.1%, TBE 1X