



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL
DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA**

**COMPARACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES SILVESTRES Y
DE CULTIVO DE *Paralichthys adspersus* “LENGUADO” (PLEURONECTIFORMES,
PARALICHTHYIDAE) DE HUARMEY, ANCASH, PERÚ, EN BASE A MARCADORES
MICROSATÉLITES**

Tesis para optar el Título de Biólogo Acuicultor

Julissa Josselyn Sánchez Velásquez

Asesor: M. Sc. Eliana Victoria Zelada Mázmela

Co-Asesor: Blg^o Perci Niver Pinedo Bernal

“El amor por todas las criaturas vivientes, es el más noble atributo del hombre”

Charles Darwin

DEDICATORIA

Para el Ser máspreciado en mi vida, mi mejor amigo, la Fuerza que poseo, el Ser que es capaz de perdonar todo cuanto hago, el aire que respiro...

“No temas pues yo estoy contigo...

*Yo te he dado fuerzas, he sido tu auxilio
y con mi diestra victoriosa te he sostenido”*

Gracias

Para mi familia, la razón por la cual sigo delante, a ustedes, a quienes debo todo cuanto soy...

Por ser la Razón de mi Vida, mi alegría cada día.

Gracias.

AGRADECIMIENTO

La culminación de esta tesis es el resultado de dedicación e ilusión. Durante este tiempo muchas personas dentro y fuera del laboratorio, me han apoyado y ayudado, y a todas ellas quiero expresar mi más sincera gratitud.

A mi asesora de tesis, la Dra. (c) Eliana Zelada, quien con paciencia y alegría me ha contagiado su pasión por la ciencia. Mi profesora Eliana, a quien siempre estaré agradecida por encaminarme, por corregirme cuando es necesario, por su apoyo incondicional en los momentos difíciles y por su interminable amor hacia quienes forma y enseña. Gracias a usted podemos tener la confianza de hacer las cosas bien, porque esperamos que vea que somos el reflejo de sus enseñanzas. Gracias por todo lo enseñado, por su apoyo incondicional. Muchas gracias profesora.

A mi co-asesor, al Biólogo Percy Pinedo, por su interminable apoyo en todo este proceso. Gracias a usted pude aprender a ser más paciente y a no rendirme cuando no se obtienen los resultados esperados, pude aprender a continuar y levantarme cada vez que algo no salía bien. Gracias por ser un amigo, alguien que escucha y enseña, por ser ejemplo de paciencia y bondad. Muchas gracias por todo lo que hizo por mí. Gracias por ser un amigo y mentor. Siempre gracias.

Al Biólogo Eduardo Reyes, por su continuo apoyo para la culminación de esta tesis, gracias por sus consejos, por su paciencia, por enseñarme a hacer las cosas bien, y por confiar tanto en mí. Le agradezco mucho por crear un ambiente de confianza y alegría en el laboratorio, siempre educándonos y encaminándonos. Gracias por ser un amigo y mentor. A usted, siempre gracias.

A mi profesora, Bióloga Carmen Izasiga, por su alegría y buen humor. Usted nos enseñó y enseña a ver la vida con optimismo, que aunque muchas cosas pueden estar contra nosotros, con fe y haciendo las cosas bien, todo puede resultar al final. Muchas gracias por ser un ejemplo, gracias por siempre acompañarnos. Yo no sabría cómo estar sonriendo siempre, sino fuera porque en usted veo ese entusiasmo y alegría. Muchas gracias profesora.

A los trabajadores de la empresa Pacific Deep Frozen S.A., especialmente al Ing° Pauro, quienes nos permitieron realizar el muestreo del stock reproductor de *P. adspersus*, brindándonos toda la ayuda y facilidades necesarias para el correcto muestreo de los organismos. Muchas gracias por su amabilidad y por su disposición para ayudar a desarrollar investigación y así caminar hacia una acuicultura sustentable.

A una de las primeras personas que fue una guía y ejemplo. A Alex, por ser un ejemplo de dedicación y esfuerzo. A todos nos enseñó que si uno en realidad desea algo, debe de esforzarse mucho para conseguirlo. Gracias por siempre ser la voz de sabiduría para con todos nosotros. A usted le debo muchas alegrías y ánimos para continuar esforzándome. Gracias por ser un ejemplo y un amigo incondicional.

A los chicos del laboratorio, por crear un ambiente de alegría y confianza. Quienes ahora forman un hermoso grupo de trabajo, Sissy, Joel, Karen, Brendita, Gustavo, Panchito, Sonia, Yarim,

Melissa, Candelita, Cesar, Rosmery, Erick, Irina. Gracias a ustedes el laboratorio es siempre ambiente de alegría y estudio. Me enseñan mucho de sus propias experiencias, viéndolos luchar siempre, esforzándose, y tomando la vida con buen humor. Gracias por hacer que los días en el laboratorio sean siempre los mejores, los más bonitos que he tenido, siempre haciéndome sentir en familia. Gracias por tanto apoyo y alegrías. Muchas gracias a ustedes, a quienes ahora se han vuelto parte mi familia.

A Lucero, Kathy y Zanny, mis amigas de la universidad, aunque no las puedo ver mucho, ustedes me han levantado cada vez que he caído, son ejemplo de vida, de fuerza y alegría. Yo no me podría sentirme más orgullosa de ustedes. Gracias por ser parte de mi vida. Muchas gracias por todo su cariño y amistad.

A mamá y papá, ustedes son mi fortaleza, gracias a ustedes puedo estar aquí, ahora. Gracias a ustedes puedo ver cumplidas mis metas. Gracias por apoyarme, por guiarme, por enseñarme que la educación es la mejor manera de salir adelante, por tanta paciencia, gracias por esperarme a pesar de todo. Gracias por la vida, gracias por formarme con amor y valentía. Gracias por ser mis padres, gracias a Dios por que los puso en mi vida.

A mi hermana Iris, por ser un ejemplo para mí. Espero tener algún día toda la bondad que reflejas y demuestras, espero algún día poder corresponder tanto amor, y tanta entrega. A mi hermana menor Gabi, gracias por ser el soporte en mi vida, por enseñarme a ser valiente, y por siempre recordarme mis metas. Hemos estado tanto tiempo juntas, que ya no puede existir más confianza entre nosotras. Gracias por tu apoyo incondicional, por estar aquí, ahora, como siempre. A ustedes, mi más sincero amor.

A todos mis familiares y amigos, gracias por siempre estar muy cerca, por nunca dejarme sola, por siempre hacerme reír. Gracias por la confianza que han puesto en mí, es el regalo más bonito que han podido darme. Todos ustedes son lo que más amo, y a quienes estaré eternamente agradecida.

Para todos ustedes, mi eterno cariño y gratitud.

ÍNDICE

Dedicatoria	i
Agradecimiento	ii
Resumen	ix
Abstract	x
1.	Introducción.....1
2.	Marco teórico.....5
2.1.	<i>Paralichthys adspersus</i> (lenguado)5
2.1.1.	Distribución y hábitat6
2.1.2.	Comportamiento y ecología.....6
2.1.3.	Situación del cultivo de lenguado6
2.2.	Diversidad genética8
2.3.	Medición de la variabilidad genética11
2.3.1.	Marcadores moleculares.....11
2.3.2.	Marcadores microsatélites12
2.3.2.1.	Clasificación de los microsatélites12
2.3.2.2.	Polimorfismo de los microsatélites.....13
2.3.2.3.	Transferibilidad de los microsatélites15
2.3.2.4.	Errores en la tipificación de microsatélites16
2.3.2.5.	Aplicación de los microsatélites17
2.3.3.	Índices utilizados en los estudios de variabilidad genética mediante el uso de marcadores microsatélites.....18
2.3.3.1.	Ley de Hardy-Weinberg19
2.3.3.2.	Alelos nulos20
2.3.3.3.	Proporción de <i>loci</i> polimórficos20
2.3.3.4.	Frecuencias alélicas21
2.3.3.5.	Número de alelos.....22
2.3.3.6.	Riqueza alélica.....22
2.3.3.7.	Número efectivo de alelos22
2.3.3.8.	Número de alelos exclusivos23
2.3.3.9.	Heterocigosidad esperada23
2.3.3.10.	Heterocigosidad observada23
2.3.4.	Relación genética entre individuos24
2.3.4.1.	Estimación de la relación genética entre dos individuos.....24
2.3.5.	Diferenciación genética entre poblaciones25
2.3.5.1.	Coefficiente de diferenciación genética26
2.3.5.2.	Coefficiente de endogamia26
2.3.5.3.	Coefficiente general de consanguinidad (F_{IT})27
3.	Objetivos28

3.1.	Objetivo general	28
3.2.	Objetivos específicos.....	28
4.	Materiales y métodos	29
4.1.	Área de estudio	29
4.2.	Muestra biológica y colecta de la muestra.....	29
4.3.	Análisis genéticos.....	31
4.3.1.	Extracción de ADN	31
4.3.2.	Cuantificación de ADN.....	31
4.3.3.	Evaluación de la calidad de ADN.....	31
4.3.4.	Elección de los <i>loci</i> microsatélites empleados para el genotipado	31
4.3.5.	Amplificación mediante PCR de los <i>loci</i> microsatélites.....	33
4.3.6.	Detección del polimorfismo.....	36
4.3.6.1.	Preparación de geles de poliacrilamida heterogéneos	36
4.3.6.1.1.	Montaje del equipo	36
4.3.6.1.2.	Preparación de las soluciones y corrida electroforética	36
4.3.7.	Tinción con nitrato de plata.....	38
4.3.7.1.	Procedimiento.....	38
4.3.8.	Genotificación de los individuos.....	39
4.3.9.	Análisis de la variabilidad genética	39
5.	Resultados	42
5.1.	Estandarización y selección de los primers utilizados en los análisis de variabilidad genética.....	42
5.2.	Niveles de diversidad genética	43
5.2.1.	Equilibrio Hardy-Weinberg.....	43
5.2.2.	Incidencia de alelos nulos.....	44
5.2.3.	Polimorfismo en los <i>loci</i> analizados	44
5.2.4.	Riqueza alélica	46
5.2.5.	Frecuencias alélicas	48
5.2.6.	Niveles de heterocigosidad en cada población.....	51
5.2.7.	Promedios para los índices de diversidad genética en cada población.....	52
5.2.8.	Análisis de relación genética.	53
Coeficiente de Relación r		53
5.2.9.	Estadísticos - F	56
5.2.10.	Análisis molecular de varianza (AMOVA)	56
6.	Discusión.....	58
7.	Conclusiones.....	67
9.	Referencias bibliográficas	70

10.	Anexos I	86
-----	----------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características externas de <i>Paralichthys adspersus</i>	5
Figura 2. Resumen de los determinantes de la aparición y desaparición de variantes génicas...	9
Figura 3. Clasificación de microsatélites según el motivo de repetición que poseen	13
Figura 4. Deslizamiento durante la replicación de las unidades de repetición.	15
Figura 5. Mapa con las posiciones geográficas y los nombres de los cinco puntos de muestreo de <i>Paralichthys adspersus</i>	30
Figura 6. Gel de agarosa al 1% sometido a electroforesis para visualizar la integridad de ADN	31
Figura 7. Migración de las moléculas e iones del buffer en un sistema de electroforesis vertical discontinuo.	38
Figura 8. Representación esquemática de la variación entre el número total de alelos y número exclusivo de alelos, en cada locus y población estudiada.....	46
Figura 9. Espectro de variación de las frecuencias alélicas en los cinco loci y poblaciones analizadas, las figuras enfrentan las frecuencias encontradas en ambas poblaciones para el mismo locus.	48
Figura 10. Espectro de variación de las frecuencias alélicas por locus en las dos poblaciones analizadas, las figuras enfrentan las frecuencias encontradas en ambas poblaciones para el mismo locus.	51
Figura 11. Representación esquemática de los niveles de variación en heterocigosidad (heterocigosidad observada y esperada) por locus analizado, y los promedios obtenidos para cada población.	51
Figura 12. Ilustración de los valores promedio de los índices de diversidad genética encontrados en cada población estudiada.	52
Figura 13. Porcentaje de distribución del estimador de relación genética r_{xy} estimado para cada población individual.	53
Figura 14. Porcentaje de distribución del estimador de relación genética r_{xy} estimado en las tres categorías de relación genética en la población F1: sin relación, medios hermanos, y hermanos completos.	54
Figura 15. Porcentaje de distribución del estimador de relación genética r_{xy} estimado en las tres categorías de relación genética en los organismos silvestres: sin relación, medios hermanos, y hermanos completos en los organismos silvestres.....	54
Figura 16. Porcentaje de variancia molecular entre la población silvestre y del Hatchery, y porcentaje de variación dentro de las dos poblaciones estudiadas.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información de las muestras recolectadas, número de individuos recolectados, en cada lugar muestreado.....	30
Tabla 2. Microsatélites seleccionados con las referencias bibliográficas de donde fueron obtenidos, y los primers a emplearse para su amplificación.	32
Tabla 3. Protocolos funcionales para los 10 loci microsatelites seleccionados.....	34
Tabla 4. Concentracion de los reactivos por locus analizado.....	35
Tabla 5. Grupos de relación genética de acuerdo a los valores generados por el índice de relación genética r_{xy}	40
Tabla 6. Patrón de bandeo en los diez loci microsatélites con amplificación positiva en <i>Paralichthys adspersus</i>	42
Tabla 7. Resumen de los resultados de Chi-cuadrado en los test de equilibrio Hardy-Weinberg, para cada locus en cada población estudiada, y el nivel de significancia encontrado.	44
Tabla 8. Frecuencias de alelos nulos encontradas en cada locus, y promedios calculados para cada población estudiada.....	44
Tabla 9. Niveles promedio de polimorfismo en los organismos F1 y silvestres, en base al porcentaje de loci polimórficos, número de alelos, número medio de alelos, número efectivo de alelos, y número de alelos exclusivos.	45
Tabla 10. Análisis del polimorfismo en cada locus y población analizada, en base al número de alelos por locus, número efectivo de alelos por locus, y número de alelos exclusivos por locus.	45
Tabla 11. Niveles de riqueza alélica en cada locus analizado, calculado igualando el tamaño de cada población a 42, que corresponde al número más bajo de individuos muestreados.....	47
Tabla 12. Principales parejas formadas en el análisis de parentesco dentro de la población de reproductores F1, indicando el grado de relación genética entre individuos: organismos no relacionados (U), medios hermanos (HS) y hermanos completos (FS). Solo se muestra el cruce entre hembras (H) y machos (M).....	55
Tabla 13. Valores promedios para F_{ST} , F_{ST} máximo y F_{IT} , calculados entre ambas poblaciones así como el nivel de significancia encontrado.	56
Tabla 14. Resumen del análisis molecular de varianza (AMOVA), enfrentando los niveles de variación interpoblacional e intrapoblacional, entre los organismos F1 y silvestres.	57
Tabla 15. Nivel de significancia en base a la entrada binaria como matriz de distancia para el cálculo de PhiPT.	57

RESUMEN

El lenguado *Paralichthys adspersus* es una especie nativa de gran importancia económica para la acuicultura en el Perú. Sin embargo, para establecer un plan de manejo adecuado es necesario un monitoreo constante de la estructura del pedigrí. Por este motivo, el objetivo de este estudio fue identificar marcadores microsatélites y comparar la variabilidad genética entre poblaciones silvestres y de reproductores de cultivo (generación F1) de *Paralichthys adspersus*. Los análisis de amplificación cruzada con 14 marcadores microsatélites resultaron en un 71.43% de amplificación positiva, demostrando el grado de transferibilidad de los marcadores microsatélites entre especies cercanamente relacionadas. De los diez marcadores con amplificación positiva, cinco marcadores altamente polimórficos se utilizaron en los análisis de diversidad genética. Se realizaron pruebas de equilibrio Hardy Weinberg, se estimó la presencia de alelos nulos, y se determinó el nivel de variabilidad genética expresada en número de alelos (N_a), número efectivo de alelos (N_e), número exclusivo de alelos (N_{ex}), heterocigosidad observada (H_o), riqueza alélica (RA), coeficiente de endogamia (F_{IS}), coeficiente general de consanguinidad (F_{IT}), y se realizaron pruebas de relación genética (r). Finalmente, se calcularon los valores del índice de fijación (F_{ST}) para detectar estructura genética poblacional, y se realizó un análisis molecular de varianza (AMOVA) para comprobar si existían diferencias significativas en los niveles de diversidad entre la población F1 y los organismos silvestres. Los resultados mostraron que ninguna población se encontraba en equilibrio génico indicando presencia de apareamiento selectivo positivo en la población de cultivo F1 y un exceso de homocigotos en las poblaciones silvestres. Sin embargo, los parámetros que caracterizan la variación genética en las poblaciones estudiadas mostraron un elevado polimorfismo ($N_a = 88 / 154$, $N_e = 9.16 / 20.08$, $N_{ex} = 22 / 88$, RA = 12.527 / 22.519, $H_o = 0.675 / 0.736$, $r = 0.008 / -0.001$, en la población F1 de cultivo y población silvestre, respectivamente), sin observarse diferencias significativas para el F_{ST} , ni AMOVA, lo que indicó una baja tasa de diferenciación entre ambas poblaciones, estadísticamente similares. No obstante, la población F1 de cultivo mostró una tendencia a presentar los menores niveles de diversidad genética en todos los parámetros evaluados. Estos resultados enfatizan la importancia de tener en cuenta la dispersión de los parámetros que determinan la presencia y pérdida de diversidad genética en poblaciones de cultivo, como primer paso para la evaluación de una eventual recuperación de la riqueza alélica mediante flujo génico.

Palabras Clave: lenguado, *Paralichthys adspersus*, microsatélites, variabilidad genética.

ABSTRACT

The flounder *Paralichthys adspersus* is a native benthic specie of great economic importance for the aquaculture in Peru. However, to establish a proper management plan is necessary a constant monitoring of the pedigree structure. For this reason, the objective of this study was to identify microsatellite markers and compare the genetic variability among a wild population and a set of broodstock (F1 generation) of *Paralichthys adspersus*. The analysis of cross amplification with 14 microsatellite markers resulted in a 71.43% of positive amplification, showing the degree of transferability of microsatellite markers between closely related species. From the ten positive amplification markers, five highly polymorphic markers were used in the genetic diversity analysis. In these analysis, Hardy Weinberg equilibrium test was performed, the presence of null alleles was estimated, and the level of genetic variability was determined through the calculation of the number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e), unique number of alleles (N_{ex}), observed heterozygosity (H_o), allelic richness (RA), inbreeding coefficient (F_{IS}), overall fixation index (F_{IT}), and test of genetic relation (r). Finally, the fixation index (F_{ST}) values were calculated in order to detect population genetic structure. Likewise, the molecular analysis of variance (AMOVA) was performed to check whether there were significant differences in the levels of diversity between the F1 population and the wild samples. The results showed that any population was in genetic equilibrium indicating the presence of positive selective mating in the F1 culture population and an excess of homozygotes in the wild populations. However, the parameters that characterize genetic variation in the populations studied showed a high polymorphism ($N_a = 88 / 154$, $N_e = 9.16 / 20.08$, $N_{ex} = 22 / 88$, $RA = 12.527 / 22.519$, $H_o = 0.675 / 0.736$, $r = 0.008 / -0.001$, in the F1 and wild population, respectively), without showing significant differences in the F_{ST} and AMOVA analysis, indicating a low rate of differentiation between the two populations, statistically similar. Nevertheless, the population F1 showed a trend to present the lowest levels of genetic diversity in all the evaluated parameters. These results emphasize the importance of taking into account the dispersion of the parameters that determine the presence and loss of genetic diversity in cultivated populations, as a first step for the evaluation of an eventual recovery of allelic richness through gene flow.

Keywords: flounder, *Paralichthys adspersus*, microsatellites, genetic variability.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura viene presentando un gran avance a nivel mundial, principalmente, debido a los trabajos de investigación e innovación tecnológica desarrollados por diversas instituciones de investigación, impulsada por la gran demanda de productos hidrobiológicos de calidad en los mercados internacionales (FONDEPES, 2015). En los últimos años, todos los continentes han mostrado una tendencia general de aumento en el porcentaje de la producción acuícola, respecto al total de la producción pesquera, en donde el pescado de piscifactoría representó las tres cuartas partes del volumen de la producción total de la acuicultura (FAO, 2016); mostrando la acuicultura una tendencia mundial, según la cual su desarrollo en el suministro total de pescado se ha mantenido de forma ininterrumpida (FAO, 2014).

Por ejemplo, para 2014, la producción de animales acuáticos procedentes de la acuicultura ascendió a 73,8 millones de toneladas, representada por el cultivo de peces con 49.8 millones de toneladas, una cifra superior a los 44.2 millones de toneladas alcanzada en 2012 y a los 28.17 millones de toneladas registrada en 2004 (FAO, 2016). Para el 2015, la FAO (2016) señala que la contribución de la acuicultura a la producción pesquera mundial superará a la pesca de captura en 2021. Esta circunstancia pone de relieve el inicio de una nueva etapa e indica que la acuicultura se convertirá en el principal impulsor del cambio en el sector pesquero y acuícola (FAO, 2016).

En Perú, desde mediados de los años ochenta, se ha venido haciendo referencia a un enorme potencial del país para el desarrollo de la acuicultura, citando como elemento demostrativo, la disponibilidad de una gran variedad de especies nativas y condiciones favorables para la acuicultura marina y de agua dulce (PRODUCE, 2009). La acuicultura peruana en la actualidad, está orientada principalmente al cultivo de camarones peneidos (*Litopenaneus vannamei*), concha de abanico (*Argopecten purpuratus*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis spp.*), siguiendo la tendencia de los principales cultivos que se tiene en la región de América Latina y El Caribe (Mendoza, 2013); y ha experimentado un crecimiento elevado en años recientes con el apoyo de la investigación, la transferencia y la innovación tecnológica. En particular, ha sido notable el trabajo realizado por la iniciativa privada con apoyo de instituciones como IMARPE y FONDEPES, para adaptar tecnologías y consolidar los cultivos comerciales existentes (PRODUCE, 2012).

Respecto a los antecedentes de producción, éstos reflejan un crecimiento importante frente a otros sectores de producción de alimentos en el país. Por ejemplo, se ha determinado que el crecimiento de la acuicultura peruana en el período 2000 – 2009 fue a una tasa anual del 20.86% (Mendoza, 2013); en 2010 alcanzó poco más de 89 mil toneladas, donde el 81% provino de cosechas del ámbito marino y el 19% del ámbito continental (Mendoza, 2011); y

en 2013 el volumen de cosechas fue de 105.158 toneladas, lo que indica que en veinte años se dio un crecimiento de 22 veces su valor (Baltazar & Palacios, 2015; PRODUCE, 2015).

En este contexto, y con la finalidad de impulsar el crecimiento y desarrollo de la acuicultura peruana, el Gobierno aprobó en 2015, la Ley General de Acuicultura a través del Decreto Legislativo N° 1195, cuyo objetivo es el de fomentar, desarrollar y regular la actividad acuícola en sus diversas fases productivas, en ambientes marinos, estuarinos y continentales del país. De esta forma el Estado Peruano declaró también, el interés nacional en el desarrollo de una acuicultura sostenible, lo que ha motivado que diversas instituciones privadas y estatales estén desarrollando investigaciones en diversos aspectos de cultivo en especies marinas y continentales emergentes, de las cuales muchas ya se encuentran en etapa comercial (Baltazar & Palacios, 2015).

Ejemplo de estos avances se refleja en el cultivo del lenguado nativo *Paralichthys adspersus*, especie bentónica que cumple un papel preponderante en términos de abundancia y valor comercial en los mares peruanos, y que debido a su distribución y alto valor comercial, es posible su producción mediante la acuicultura (FONDEPES, 2015; Norbis & Galli, 2004; Bell *et al.*, 2003). *P. adspersus* posee una carne blanca y magra, por lo que es muy apreciado, y entre los peces marinos es uno de los que tiene mayor valor, pudiendo comercializarse hasta en 120.00 soles el Kg de filete (Estratex, 2015), siendo similar al "hirame" *P. olivaceus*, que en el mercado de Tokio está valorado entre 20.00 y 25.00 dólares el kg en estado fresco y hasta 60.00 dólares el kg, si se trata de un pez vivo (PRODUCE, 2007).

Con relación a su nivel de producción, el reporte del Ministerio de la Producción refleja un aumento de 1.02 toneladas en 2012, a 4.41 toneladas en 2015 (PRODUCE, 2015a), siendo Ancash el único departamento en Perú que posee cifras de producción acuícola de lenguado. A pesar de que estos valores aún son bajos en comparación con cifras de producción de otras especies acuícolas, evidencian el crecimiento que ha tenido su cultivo en los últimos años, dado que en fechas anteriores a 2012 no se reportan datos de producción de la especie. Estos resultados y los niveles de producción de la acuicultura en el Perú y a nivel mundial, reflejan el crecimiento acelerado de este sector.

No obstante, paralelo al desarrollo de la acuicultura, debe considerarse un monitoreo constante de la estructura del pedigrí, que en poblaciones cautivas se ve afectada por diversos factores, como el número de reproductores que contribuyen a la generación siguiente, el cociente de sexo de los padres y a las variaciones en el tamaño de la familia; factores que podrían evaluarse con precisión a través del examen de la estructura de pedigrí en la población de interés (Sekino *et al.*, 2003). Además, con un manejo genético intensivo en la suplementación y conservación dentro de los centros de cultivo, muchos de los cambios genéticos negativos, debido a la introducción de peces de cultivo en el medio natural, podrían

ser mitigados. En consecuencia, un plan de manejo genético basado en el pedigrí, y diseñado para maximizar la diversidad genética y limitar la endogamia, puede ser capaz de conservar la diversidad genética fundadora de la población cautiva (Fisch *et al.*, 2013).

En tal sentido, los estudios de variabilidad genética son esenciales, dado que la pérdida de variabilidad en poblaciones cultivadas trae consigo el fenómeno conocido como depresión consanguínea. La depresión consanguínea está definida como la reducción de la eficacia biológica que ocurre en la descendencia de apareamientos consanguíneos, como consecuencia del aumento de la proporción de homocigotos para aquellos genes que presentan dominancia direccional con respecto a atributos comerciales (crecimiento rápido, mejor peso, talla, etc.) (López & Toro, 2007). Este aumento de homocigotos puede dar lugar a la pérdida de la capacidad de adaptación de la población y de su riqueza potencial para la obtención de una mejor explotación de los recursos. De este modo, los estudios de variabilidad genética se constituyen en la materia prima para poder explicar y predecir cómo las diversas poblaciones de una especie se adaptan a los cambios de su medio ambiente (Aranguren & Jordana, 2001).

Con el fin de aplicar este concepto en la población de cultivo de *Paralichthys adspersus*, un pedigrí basado en marcadores microsatélites puede proveer el camino más eficiente para alcanzar este propósito. Los microsatélites son los marcadores de ADN más utilizados en genética acuícola (FAO, 2010a), debido a que son sensibles indicadores de la homocigosis resultante de cruzamientos endogámicos y, de esta forma, aplicables a la distinción de pequeñas diferenciaciones poblacionales (Povh *et al.*, 2008). Sin embargo, debido a que son necesarios extensos trabajos moleculares preliminares para desarrollar los PCR-primers para *loci* individuales (para cada población particular estudiada), actualmente no existen marcadores microsatélites específicos para el lenguado nativo de Perú *P. adspersus*, una circunstancia que obstaculiza su aplicación. A pesar de este primer obstáculo, estas regiones a menudo son altamente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas. Esta característica permite que puedan utilizarse marcadores microsatélites desarrollados para especies del género *Paralichthys*, en la especie *P. adspersus*.

La información generada con los marcadores microsatélites permitirá diseñar mejores formas de conservar la variabilidad genética y la propia biodiversidad (Pérez, 2000), de vital importancia para la interpretación, entendimiento y manejo de las poblaciones de peces (Leuzzi *et al.*, 2004). Además, permitirá la comprensión de cómo la diversidad se distribuye entre las poblaciones (Leuzzi *et al.*, 2004), información necesaria para la selección del stock reproductor, que forma parte de la población base, y establecer sitios posibles para la reposición del mismo; una manera de hacer que el cultivo sea sustentable y rentable en el tiempo.

En último término, la identificación de marcadores microsatélites, y el conocimiento de los procesos implicados en la estructuración genética de las poblaciones, especialmente a pequeña escala, serán por consiguiente, imprescindibles para comprender la distribución de la variabilidad genética entre individuos y poblaciones, proporcionando pautas de manejo que favorezcan la conservación de la diversidad (De Lucas, 2009).

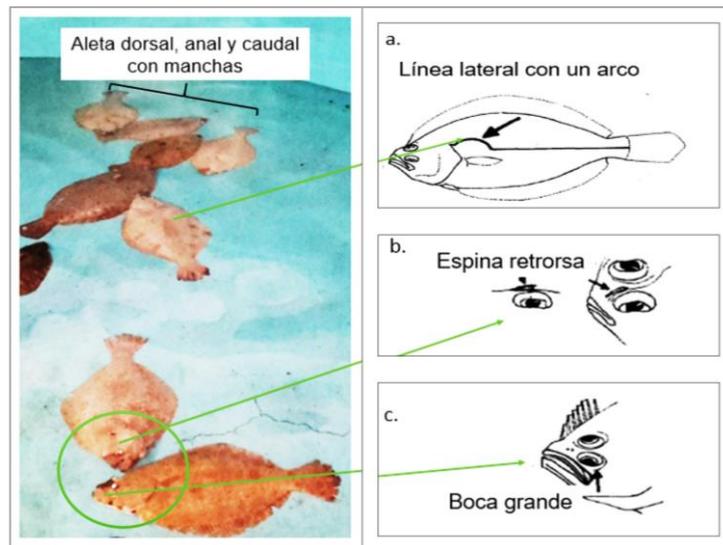
2. MARCO TEÓRICO

2.1. *Paralichthys adspersus* (lenguado)

Paralichthys adspersus (Steindachner, 1867) es una de las principales especies que sustentan la pesquería artesanal en el Perú (FONDEPES, 2015). Pertenece al orden Pleuronectiformes, que incluye un grupo valioso de peces comestibles conocidos como “platija” y “lenguado” (Figura 1), y son considerados como uno de los grupos de peces marinos comerciales más importantes de aguas templadas y frías de todo el mundo (Bardach *et al.*, 1990; Coll, 1983).

Para la costa de Perú, Chirichigno (1974) reporta 42 especies de peces planos, de las cuales 3 pertenecen al género *Paralichthys*: *P. adspersus*, *P. woolmani* y *P. microps*, destacando de entre ellas *P. adspersus*, debido a que es la única especie de peces planos que actualmente se cultiva en Perú.

Paralichthys adspersus es un pez de crecimiento moderado, bentónico, capaz de mimetizarse con el fondo, y soportar tenores bajos de flujo de agua y oxígeno (PRODUCE, 2007). Maduran sexualmente a partir de los tres años de edad, a una longitud aproximada de 24 cm de longitud total (220 g) (Zúñiga, 1988), tamaño que de acuerdo a observaciones en cultivo, se alcanzaría a los 21 meses de edad (Silva & Oliva, 2010; Ángeles & Mendo, 2005).



2.1.1. Distribución y hábitat

Su distribución abarca desde Paita (Perú) hasta Lota e Islas Juan Fernández (Chile) (Acuña & Cid, 1995; Chirichigno, 1974), aunque Silva & Oliva (2010) lo distribuyen desde la localidad de Paita (norte de Perú) hasta el golfo de Arauco (Chile), incluyendo el archipiélago de Juan Fernández.

Su hábitat común corresponde a golfos y bahías someras con fondos blandos arenosos, al igual que el hábitat de otras especies de lenguados como *P. dentatus* y *P. californicus*, buscando protección frente a la depredación, temperaturas más adecuadas y abundancia de alimento (Packer *et al.*, 1999).

2.1.2. Comportamiento y ecología

Paralichthys adspersus tiene hábitos gregarios-sedentarios, y puede encontrarse en una variedad de hábitats, gracias a que los adultos pueden camuflarse a través de cambios en la pigmentación y reflejar cualquier tipo de sustrato (Packer *et al.*, 1999; Powell & Schwartz, 1977). Los juveniles habitan normalmente en aguas costeras poco profundas, sobre fondos suaves en la plataforma continental (Guartatanga, 1997), mientras que los adultos permanecen en el fondo oceánico, entre 30 y 100 m de profundidad, en donde las temperaturas oscilan entre los 14°C y 20°C (Grosslein & Azarovitz, 1982).

Con relación a su alimentación, el lenguado es un cazador innato, enterrándose para capturar peces y crustáceos (PRODUCE, 2007). Las diferencias en sus dietas dependen de los hábitats o lugares, y a la disponibilidad de presas; encontrándose en su dieta la anchoveta, merluza, pejerrey, cangrejos de roca, calamares, camarones, pequeños bivalvos, gasterópodos, pequeños crustáceos y gusanos marinos (Curran & Abel, 1998; Langton & Bowman, 1981).

2.1.3. Situación del cultivo de lenguado

Actualmente, el cultivo de lenguado es una realidad en varias regiones del mundo, especialmente en Europa y en Asia, en donde el turbot (*Psetta maxima*) y el hirame (*Paralichthys olivaceus*) son las especies de mayor producción (FAO, 2009).

Debido a su importancia económica, se desarrollaron una serie de estudios, tanto en Chile como en Perú, para impulsar y mejorar el cultivo de lenguado, entre los que se pueden mencionar, entre otros, el trabajo realizado por Samamé & Castañeda (1999) sobre la biología y pesquería del lenguado *P. adspersus*, con especial

referencia al área norte del litoral peruano, Departamento de Lambayeque; el de Zelada *et al.* (2002) sobre aspectos de su biología reproductiva; el de Ángeles & Mendo (2005) sobre crecimiento, fecundidad y diferenciación sexual, y el de Silva & Oliva (2010) sobre aspectos biológicos y de cultivo.

La disminución en las capturas también incentivaron a algunos investigadores y empresas privadas a realizar investigaciones sobre la factibilidad de su cultivo; los resultados han demostrado que esta especie se adapta fácilmente al cautiverio y a las condiciones abióticas del medio (Chinchayán *et al.*, 1997). Chile se incorporó a este proceso, adaptando tecnología para el cultivo del turbot (*Psetta maximus*) y el hirame (*P. olivaceus*), desarrollando también investigaciones tecnológicas para el cultivo de *P. microps* y *P. adspersus*, contando actualmente con tecnología para realizar su cultivo a nivel piloto, como paso previo para iniciar su cultivo comercial (Silva & Oliva, 2010).

En Perú, el cultivo de peces planos fue iniciado por FONDEPES en 1997 en el Centro de Acuicultura Morro Sama en Tacna, con la introducción de Turbot *Scophthalmus maximus*, posteriormente se llevó a cabo el proyecto experimental con el lenguado nativo *Paralichthys adspersus* para lograr la tecnología de su cultivo en la zona sur del país, y en la última década ha desarrollado estrategias para su tecnología integral, cubriendo aspectos como: manejo de reproductores, desove, cultivo larvario, alevines, cultivo de juveniles y engorde (FONDEPES, 2015). De la misma manera, en el Departamento de Ancash se ubica actualmente la empresa Pacific Deep Frozen S.A., la cual realiza el cultivo del lenguado *P. adspersus* desde el 2009, convirtiéndose en la primera y única empresa que desarrolla el cultivo de lenguado con fines de exportación, desarrollado investigaciones orientadas al mejoramiento de la calidad y cantidad de desoves, ensayo de sustitución de la harina de pescado y el estudio de algunas enfermedades (RNIA, 2012).

En relación a estudios genéticos realizados, solo Brasil presentó al 2012, en el Taller Regional de Tecnología y Escalamiento Productivo del Cultivo de Peces Planos en América Latina, los avances en investigación en su lenguado nativo *P. orbignyanus*, en los cuales priorizan la necesidad de su mejoramiento genético (RNIA, 2012). No obstante, Chile ha realizado diversas investigaciones moleculares utilizando como modelo de estudio a *P. adspersus*, destacando el trabajo de Fuentes *et al.* (2008) quienes evaluaron el patrón de dinámica de expresión del receptor de la hormona de crecimiento; el de Delgado *et al.* (2008) quienes evaluaron el patrón temporal y espacial de la expresión del gen de la miostatina; el de Escobar *et al.* (2011) sobre el rol del factor de crecimiento insulínico tipo I; y por último, el de Valenzuela *et al.* (2015) quienes evaluaron las moléculas involucradas

en la respuesta al estrés, incluyendo los receptores de glucocorticoides, FOXO1 y 3, y los genes target para estos. Estas investigaciones fueron realizadas con el objetivo de generar investigación básica, y poder aplicarla en los estudios de mejoramiento genético.

2.2. Diversidad genética

La diversidad genética o polimorfismo de una especie, es la base del cambio evolutivo, vital para la adaptación de las poblaciones a condiciones ambientales cambiantes, y corresponde a las diferencias entre los distintos individuos de una especie dada (Ellegren & Galtier, 2016; Loo, 2011; Fleuriet *et al.*, 1988; Su *et al.*, 1996).

Desde un punto de vista teórico, las nuevas variaciones surgen en el seno de las poblaciones, a partir de mutaciones espontáneas de un gen, o por inmigración de individuos desde poblaciones genéticamente distintas (Ellegren & Galtier, 2016; FAO, 1980). La diversidad genética es considerada además, como el reflejo del equilibrio entre la aparición y desaparición de variantes génicas, debido a procesos como: mutaciones, la historia de vida de los organismos, el tamaño efectivo de la población, el sistema de reproducción, demografía, y debido a la selección natural [Figura 2] (Ellegren & Galtier, 2016).

De entre estos procesos, la selección natural está basada en la disponibilidad de la variación génica vinculada con los caracteres relacionados al éxito reproductivo (Graur & Li, 2000), y es el proceso mediante el cual pueden aumentar las frecuencias de los alelos que mejoran la supervivencia y reproducción; haciendo que una población, progresivamente, sea más capaz de sobrevivir y reproducirse en el medio ambiente (Hartl & Clark, 2007; Graur & Li, 2000). La selección natural junto a los procesos de deriva genética, mutación y migración, hacen que las frecuencias génicas de una población, en la naturaleza, permanezcan relativamente estables (Nei, 1975).

No obstante, como se mencionó anteriormente, el nivel de variación genética dentro de una población es dinámico: refleja un equilibrio cambiante entre procesos aleatorios y no aleatorios, que en último término podrían eliminar la variación; y en algunos casos, la reducción de la variación podría ocurrir a niveles tan bajos, que no podría ser reconstituido sobre escalas de tiempo ecológicas (Kliman *et al.*, 2008). En este contexto, el principal proceso que conduce a una pérdida de variación en la naturaleza es la deriva genética, considerada como el cambio aleatorio en las frecuencias alélicas que es causado por un error de apareamiento en la producción de una nueva generación (Fred *et al.*, 1980), y es la razón por la que es importante conocer el proceso de pérdida de variación en poblaciones pequeñas, ya que la deriva genética es más pronunciada en esas poblaciones (Kliman *et al.*, 2008). Por ejemplo, si un individuo con una nueva

mutación no se reproduce, el nuevo alelo se perderá inmediatamente, incluso, si el individuo con la mutación produce dos generaciones, hay una posibilidad del 25% (basado en la segregación mendeliana) de que la nueva mutación se pierda (Allendorf, 2013).

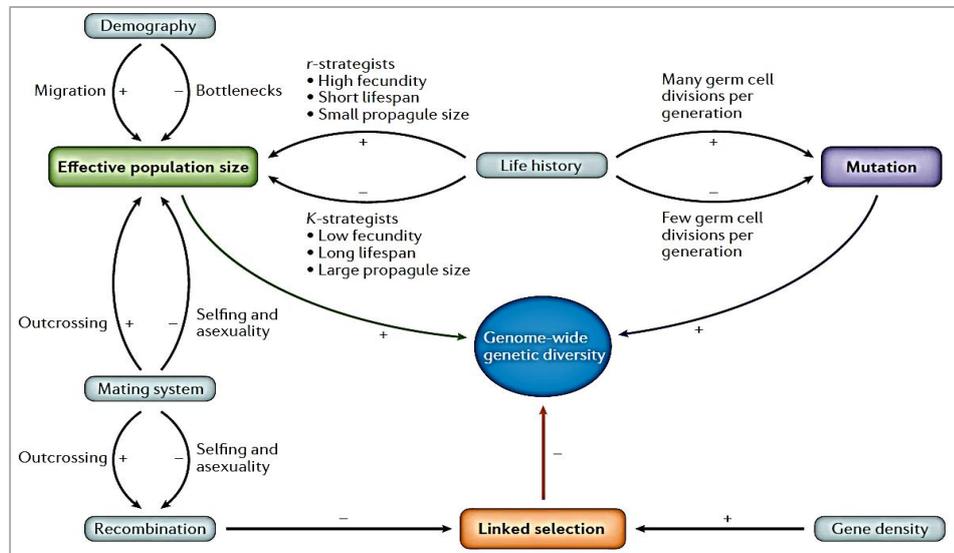


Figura 2. Resumen de los determinantes de la aparición y desaparición de variantes génicas. El tamaño efectivo de la población, tasa de mutación y selección, son los principales factores que afectan a la diversidad genética. Estos factores a su vez, están gobernados por otros parámetros que determinan un aumento o pérdida de diversidad. Figura tomada de Ellegren & Galtier (2016). Se indica la dirección de la correlación con los símbolos + / -. Selfing = autofecundación.

Referente a los organismos sometidos a selección y cultivo, se han realizado una serie de estudios para comparar los niveles de variabilidad genética entre poblaciones silvestres y de cultivo, comprobándose que la reproducción de un gran número de peces, en un centro de cultivo, no garantiza que su descendencia posea una alta variabilidad (Povh *et al.*, 2008). La disminución de la variabilidad genética se debe a que el método utilizado en la formación de nuevos lotes es la selección de individuos con las características más favorables, lo que puede dar lugar al fenómeno denominado *cuello de botella*, si la selección implica la elección de un número reducido de reproductores y, además, estrechamente emparentados (Aho *et al.*, 2006). Un cuello de botella poblacional produce una disminución de la reserva genética de la población, debido a que se pierden muchos de los alelos o variantes génicas que estaban presentes en la población original; y como consecuencia, la población restante termina con un nivel muy bajo de diversidad genética.

Asimismo, otra de las principales causas de pérdida de variabilidad genética es el fenómeno conocido como depresión consanguínea, definida como la reducción de los valores promedios de los caracteres ligados a la aptitud reproductiva o eficacia biológica, que ocurre en la descendencia de apareamientos consanguíneos, como consecuencia

del aumento de la proporción de homocigotos, para aquellos genes que presentan dominancia direccional con respecto a atributos comerciales como mejor peso, talla, etc. (López & Toro, 2007; Infante & Manchado, 2007).

Según Charlesworth & Willis (2009), existen dos formas genéticamente distintas en que la calidad de homocigoto puede disminuir la aptitud de los organismos: un aumento en la homocigosis para mutaciones perjudiciales parcialmente recesivas, y para alelos en *loci* con ventaja de heterocigosidad (sobredominancia). En el caso de un incremento en la frecuencia de homocigotos dominantes, este tendría un escaso efecto sobre la media del carácter, debido a que su valor genotípico difiere poco o nada del de los heterocigotos; sin embargo, un aumento en la frecuencia de homocigotos recesivos, debido a sus efectos deletéreos, traería una considerable diferencia en el valor genotípico (Infante & Manchado, 2007).

Como resultado de estos procesos, la variabilidad genética dentro de la población en un centro de cultivo se caracteriza por reducciones sustanciales de su diversidad alélica en términos del número de alelos por *locus* (Piñero *et al.*, 2008). Actualmente, la participación de pocos reproductores puede explicar la pérdida de variabilidad genética de hasta un 50% en una generación, no solamente en relación a los alelos raros, sino también de los alelos más frecuentes (Porta *et al.*, 2006). Este comportamiento reproductivo, agregado a otros factores, como una alta fecundidad, presión en la selección diferencial entre familias, efectos del manejo, y selección por parte de los cultivadores, puede presentar un conjunto de circunstancias responsables de la drástica reducción de la variabilidad genética de los grupos F1 (de la primera generación) (Porta *et al.*, 2006).

Debido a que los procesos antes mencionados ocurren de manera dinámica y continua, organismos internacionales como la FAO priorizan la necesidad de mantener la diversidad genética en la gestión de los recursos genéticos en la acuicultura, para evitar procesos que disminuyan la variabilidad genética, y así poder mantener la integridad genética de los stocks y reducir la transferencia entre stocks diferenciados genéticamente (Welcomme & Barg, 2005). En tal sentido, la evaluación de los recursos genéticos debe ser el soporte esencial para la acuicultura, cuyo desarrollo debe de ir en paralelo con la preservación de los recursos genéticos naturales, dado que la mayoría de reproductores en los hatcheries proceden de capturas del medio natural (Martínez & Huerta, 2007; Infante & Manchado, 2007; Martínez, 2005).

Es así como el desarrollo de estudios genéticos en poblaciones naturales y de cultivo, y en la acuicultura en general, llevan a proponer el desarrollo de una acuicultura sostenible, la cual se da siempre que la selección en el programa de cría se inicie con una población

que posea una amplia diversidad genética (Ponzoni *et al.*, 2009). Asimismo, se constituyen en la materia prima para poder explicar y predecir cómo las diversas poblaciones de una especie se adaptan a los cambios en su medio ambiente (Aranguren & Jordana, 2001). Finalmente, la pérdida de variación genética, por cualquier causa (selección prolongada, endogamia, etc.) dará lugar a la pérdida de la capacidad de adaptación de la población, y de su riqueza potencial para la obtención de una mejor explotación de los recursos a través de la selección artificial.

2.3. Medición de la variabilidad genética

2.3.1. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares permiten estudiar y entender a la naturaleza desde diferentes perspectivas, proporcionando información sobre la variación alélica en un *locus* dado (Cornejo *et al.*, 2014; Schlötterer, 2000). Durante varias décadas, los marcadores moleculares más utilizados en la ecología fueron las isoenzimas; sin embargo, en la actualidad se han desarrollado diversas técnicas basadas en ADN. Un marcador genético es un segmento de ADN con una ubicación física conocida en un cromosoma (*locus*) (NIH, 2010) relacionado normalmente con sitios de heterocigosidad para algún tipo de variación no asociada a una variación fenotípica medible (Griffiths *et al.*, 2000).

Los marcadores de ADN, son útiles tanto en la investigación básica (análisis filogenético y búsqueda de genes útiles) como aplicada (selección asistida por marcador, pruebas de paternidad y trazabilidad de los alimentos) (FAO, 2010; Martínez & Huerta, 2007), sosteniendo la identificación de genes involucrados con rasgos adaptativos, polimorfismos que causan variación genética funcional, así como los estudios de patrones de herencia, fenómenos de selección evolutiva, vínculos entre alelos, y asociaciones entre alelo-fenotipo (Hayward *et al.*, 2015; FAO, 2007). Además, han permitido determinar el origen poblacional de individuos migrantes, estudiar sistemas de apareamiento, cuantificar la escala de interacciones interespecíficas, y obtener información esencial para analizar patrones y procesos ecológico-evolutivos, a escalas espaciales y temporales (Cornejo *et al.*, 2014; Robledo & Gonzales, 2009; Selkoe & Toonen, 2006).

En las últimas décadas, ha habido un notorio aumento en los marcadores genéticos disponibles para estudiar la diversidad genética, entre ellos se encuentran: los polimorfismos de ADN mitocondrial (mtADN), polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), polimorfismo de la longitud de los fragmentos de amplificación

(AFLP), marcadores de repetición variable de secuencia (VNTR, principalmente microsatélites MS), y polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) (Becerra & Paredes, 2000). De ellos, son los marcadores microsatélites, los marcadores más utilizados en genética acuícola (FAO, 2010a).

2.3.2. Marcadores microsatélites

Los microsatélites son repeticiones en tándem de secuencias simples de ADN con motivos de repetición de 1 a 6 pares de bases (Wang *et al.*, 1994), encontrándose tanto en las regiones codificantes como no codificantes del genoma (Zane *et al.*, 2002). Los microsatélites fueron clasificados inicialmente como ADN basura, y como marcadores de ADN neutrales; sin embargo, han sido encontrados y caracterizados dentro de genes involucrados en mecanismos como proteólisis mediada por ubiquitina, degradación del ARN, espliceosoma, y biosíntesis de terpenoides en la columna vertebral; proveyendo nuevas múltiples líneas de evidencia para su función y evolución (Liu *et al.*, 2016).

Los análisis con microsatélite emergieron gracias a su gran sensibilidad para detectar variaciones genéticas dentro y entre poblaciones, debido a su alto polimorfismo, codominancia, y a que están ampliamente distribuidos a través de los genomas; considerándose como los marcadores más eficientes para revelar altos niveles de variación alélica, y frecuentemente, detectar diferencias entre poblaciones cercanamente relacionadas (Castillo *et al.*, 2014; Kartavtsev & Lee, 2006; Sakamoto *et al.*, 2000).

2.3.2.1. Clasificación de los microsatélites

Los microsatélites se clasifican según el número de repeticiones, por su localización en el genoma y según el tipo de unidades de repetición (Figura 3).

En la primera clasificación los microsatélites son definidos por el número de nucleótidos por unidad de repetición; así, los microsatélites han sido clasificados como mono-, di-, tri-, tetra., penta- o hexanucleótidos.

En la segunda clasificación, debido a que los microsatélites también se encuentran distribuidos en el ADN de las mitocondrias y cloroplastos, se clasifican como microsatélites nucleares (nuSSR), mitocondriales (mtSSR) o cloroplásticos (cpSSR) (Teneva *et al.*, 2014).

Por último, la tercera clasificación es según el motivo de repetición que poseen. Según este criterio, los microsatélites se clasifican como perfecto, imperfecto, interrumpido o compuesto (Oliveira *et al.*, 2006).

- Microsatélite perfecto: la secuencia de repetición no se encuentra interrumpida con bases que no pertenecen al motivo (ej. TATATATATATATATA).
- Microsatélite imperfecto: dentro del motivo de repetición existen pares de bases que no coinciden con la secuencia motivo (ej. TATATATACTATATA).
- Microsatélite interrumpido: existen pequeñas secuencias dentro de la secuencia de repetición que no coincide con la secuencia motivo (ej. TATATACGTGTTATATATATA).
- Microsatélite compuesto: la secuencia motivo contiene dos secuencias distintivas de repetición adyacentes (ej. TATATATATAGTGTGTGTGT)

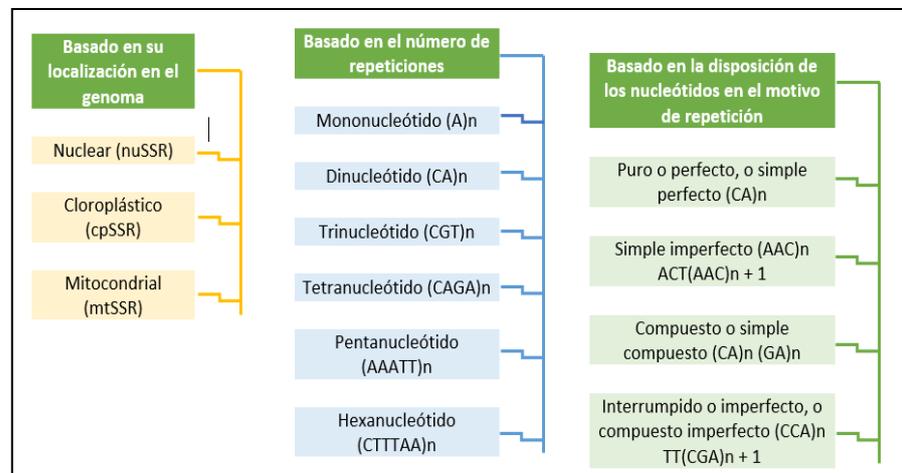


Figura 3. Clasificación de microsatélites según el motivo de repetición que poseen. Elaboración propia.

2.3.2.2. Polimorfismo de los microsatélites

El polimorfismo de los microsatélites está fundamentado en las diferencias de tamaño que presentan, debido a la variación en el número de repeticiones en un *locus* dado. Se ha demostrado que el origen de estas variaciones se debe a dos mecanismos principales: una elevada tasa de mutación en las regiones microsatélites, y debido al deslizamiento de una de las hebras de ADN durante el proceso de replicación (Ellegren, 2000; Akagi *et al.*, 1998).

En el primer mecanismo, en comparación con las secuencias únicas de ADN eucarionte que mutan a una velocidad de aproximadamente 10^{-9} nucleótidos por generación, la tasa de mutación en los microsatélites es de varios órdenes

superior, citados en el rango de 10^{-3} a 10^{-4} nucleótidos por *locus*, por generación (Ellegren, 2000).

Sin embargo, el mecanismo debido al deslizamiento de una de las hebras de ADN durante el proceso de replicación (*replication slippage*, Figura 4a); es el proceso más aceptado que causa el polimorfismo de los marcadores microsatélites. Este proceso es una forma de mutación que puede conducir a una expansión o reducción en la secuencia de ADN, y se produce normalmente cuando una secuencia de nucleótidos repetitivos se encuentra en el sitio de replicación (Akagi *et al.*, 1998).

El deslizamiento implica una pausa de la ADN polimerasa, durante la cual la polimerasa se disocia del ADN. En la disociación, sólo la porción terminal de la cadena recién sintetizada se separa de la hebra molde, y puede hibridarse con otra unidad de repetición posterior (Ellegren, 2004). Se asume que sólo dos nucleótidos son agregados antes de que el complejo ADN/polimerasa se vuelva inestable nuevamente, lo que permite que un segundo evento de deslizamiento se produzca, antes de que comience una nueva reacción de adición de nucleótidos, o que el nucleótido restante sea colocado después que el complejo ADN/polimerasa se haya restablecido (Akagi *et al.*, 1998).

El deslizamiento durante la replicación también se produce *in vitro*, durante la amplificación de secuencias microsatélites por PCR (Figura 4b). Un rasgo característico de tales amplificaciones, es la presencia de bandas de tartamudeo, es decir, productos menores que difieren en múltiplos de la longitud de la unidad de repetición (Hile & Eckert, 2004). Debido al corrimiento durante la replicación, son posibles pequeñas diferencias de tamaño entre alelos en un *locus* dado, tan pequeñas como dos nucleótidos en un *locus* compuesto de repeticiones de dinucleótidos (Teneva *et al.*, 2014).

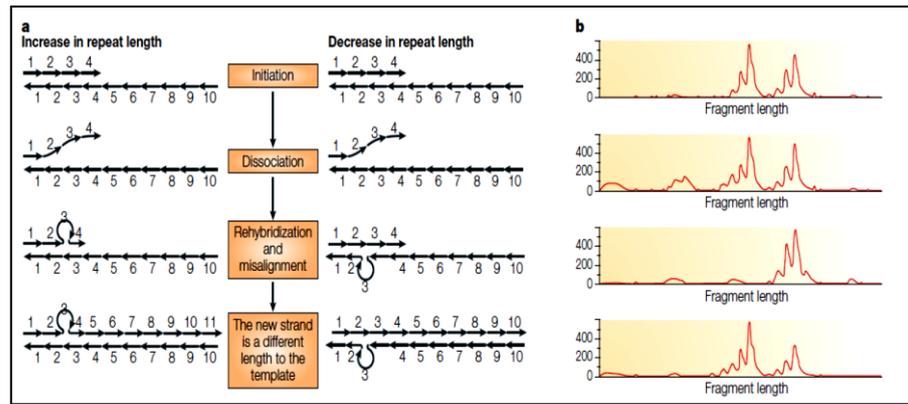


Figura 4. Deslizamiento durante la replicación de las unidades de repetición. Representación tomada de Ellegren (2004).

La Figura 4 representa el proceso de deslizamiento que sufre la hebra de ADN durante el proceso de replicación de secuencias repetidas. **a.** Después de que se ha iniciado la replicación del fragmento, las dos hebras pueden disociarse. Si la desalineación introduce un bucle en la cadena naciente, el resultado final sería un aumento en la longitud de repetición, en cambio si el bucle se forma en la cadena molde, conducirá a una disminución en la longitud de la secuencia de repetición. **b.** El deslizamiento durante la replicación también se produce durante la amplificación *in vitro* de los microsatélites, en este caso sobre todo en forma de contracciones repetidas.

2.3.2.3. Transferibilidad de los microsatélites

Una característica importante de los microsatélites es su transferibilidad o propiedad de amplificación entre especies relacionadas (*cross-species amplification*). Esta propiedad se da gracias a la naturaleza homóloga de la secuencia de ADN en las regiones que flanquean los microsatélites (Oliveira *et al.*, 2006). Estas secuencias se encuentran conservadas dentro de una especie en particular y entre especies dentro de un mismo género dada su naturaleza ortóloga, es decir, presentan homología entre dos especies diferentes (Chatrou *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2006; Gupta & Varshney, 2000).

La transferibilidad es un factor importante, debido a que facilita el uso de los microsatélites entre especies relacionadas, reduciendo los costos cuando se trabaja en taxas con frecuencias microsatélites muy bajas o desde los cuales, son muy difíciles de aislar (Oliveira *et al.*, 2006).

2.3.2.4. Errores en la tipificación de microsatélites

Existen varios pasos entre el proceso de extracción de ADN y la base resultante de genotipos (muestreo, extracción de ADN, amplificación y análisis de los datos); y en cada punto, puede darse una variedad de errores. En base a estas consideraciones Pompanon *et al.* (2005) agruparon estos errores en cuatro categorías principales: errores relacionados con la secuencias del ADN, secuencia de errores debido a la baja calidad o cantidad del ADN, artefactos bioquímicos y factores humanos.

Un error relacionado con la secuencia de ADN es el generado por una mutación cerca del marcador, siempre que esta región esté involucrada en el proceso de detección del marcador. En los estudios de microsatélites, el error más común de este tipo es la ocurrencia de alelos nulos, es decir, la no amplificación de los alelos. La presencia de alelos nulos puede ser causada por mutaciones en las secuencias que flaquean la región microsatélite, como sustituciones cerca del extremo 3' terminal, inserciones, o deleciones, que pueden causar problemas en la amplificación del segmento de repetición (Pompanon *et al.*, 2005; Dakin & Avise, 2004). En peces, Jones *et al.* (1998), en un estudio sobre las bases moleculares de los alelos nulos en marcadores microsatélites de *Cyprinodon tularosa*, demostraron que los alelos nulos son el resultado de una deleción de cuatro pares de bases dentro del sitio original de unión al primer, lo que causa que alelos previamente no detectados y de tamaño diferente sean genotipados como únicos.

La presencia de alelos nulos en frecuencias superiores a 0.05, pueden resultar problemáticos e inducir falsas asignaciones o estimaciones erróneas, convirtiéndose en una de las cuestiones más importantes a considerar en la aplicación de estos marcadores en análisis de parentesco, debido a que son los sitios de unión a los primers; haciendo que algunos heterocigotos sean genotipados como homocigotos (Espinoza *et al.*, 2007; Selkoe *et al.*, 2006).

Aún pese a ello, la presencia de alelos nulos puede obtenerse de forma simple a partir del análisis de las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg (HW) producidas por defecto de heterocigotos, utilizando diversos programas disponibles en la red (Marshall *et al.*, 1998; Brookfield, 1996). Aunque de forma más precisa y fiable, los alelos nulos se estiman a partir de análisis de genealogías, detectándose su presencia por la aparición de incompatibilidades homocigoto-homocigoto (Castro *et al.*, 2004; Marshall *et al.*, 1998).

Algunos aspectos técnicos que también pueden inducir a error en el genotipado de microsatélites, es en particular, el denominado *dropout* (amplificación de únicamente uno de los dos alelos presentes en un *locus* heterocigoto), producido por la amplificación diferencial durante la PCR de los alelos más largos en heterocigotos con gran distancia interalélica (Martínez, 2005).

Por último, una inserción o delección en las regiones que flanquean los microsatélites puede generar homoplasia de tamaño, que conduce a la calificación de dos alelos diferentes como uno (Pompanon *et al.*, 2005). La homoplasia se define como el enmascaramiento de la aparente similitud de fragmentos con diferencias evolutivas; es decir, fragmentos que tienen el mismo tamaño en pares de bases pero no la misma secuencia, y para un carácter genético, se produce cuando diferentes copias de un *locus* son idénticos en el estado, pero no idénticos por descendencia (Angers *et al.*, 2000).

2.3.2.5. Aplicación de los microsatélites

Los marcadores microsatélites son sensibles indicadores de la homocigosis resultante de cruzamientos endogámicos y, de esta forma, aplicables a la distinción de pequeñas diferenciaciones poblacionales (Povh *et al.*, 2008). Los microsatélites han cobrado gran importancia en estudios que van desde la caracterización individual y medición de la variabilidad intraespecífica (Henshaw, 2000), hasta la elaboración de mapas genéticos de ligamiento y construcción de genealogías (Muñoz *et al.*, 2008; Becerra & Paredes, 2000; Bowcock *et al.*, 1994; Estoup *et al.*, 1993), como los usados para elaborar mapas genéticos para diferentes especies como *Salmo salar* (Cairney *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2000), *Campostoma anomalum* (Dimsoski *et al.*, 2000), *Danio rerio* (Kelly *et al.*, 2000), *Oncorhynchus mykiss* (Rexroad *et al.*, 2008), *Cyprinus carpio* (Zheng *et al.*, 2011), entre otros.

Respecto al género *Paralichthys*, diversos autores han aportado información valiosa para análisis genéticos con la utilización de microsatélites. Los estudios realizados hasta ahora, muestran una amplia gama de marcadores microsatélites disponibles para este género, habiéndose caracterizado y aislado cientos de estos marcadores, enriqueciendo principalmente las bibliotecas genómicas de *P. olivaceus* (Sekino & Hara, 2000; Sekino *et al.*, 2002a, b; Kim *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2008).

Dentro de estos estudios, entre otros, se encuentran el realizado por Chang *et al.* (2005), quienes crearon una biblioteca genómica rica en secuencias microsatélites CA/GT para *P. olivaceus* con 133 *loci* microsatélites, el de Shao *et al.* (2008a) quienes identificaron 39 nuevos microsatélites para *P. lethostigma*, el de Shao *et al.* (2008b) quienes identificaron 12 nuevos marcadores microsatélites para *P. dentatus*, el de Yu *et al.* (2010) quienes realizaron un análisis bioinformático de 11 111 ESTs (Expressed sequence tag) identificando 751 SSR incluyendo 440 dinucleótidos, 53 tetranucleótidos, 95 pentanucleótidos y 40 hexanucleótidos, con las repeticiones CA/TG y GA/TC, como las más abundantes., en *P. olivaceus*.

Asimismo, también se han construido mapas genéticos de ligamiento sobre la base de 180 microsatélites y 31 etiquetas de secuencias expresadas derivadas de marcadores-EST (Kang *et al.*, 2008), mapas de ligamiento genético específicos por sexo, incluyendo un total de 1375 marcadores, dentro de ellos, 1268 microsatélites (34% de ellos polimórficos) (Castaño *et al.* 2010).

Como puede observarse, aunque no existen marcadores microsatélites específicos para la especie *P. adspersus*, debido a que son necesarios extensos trabajos moleculares preliminares para desarrollar los PCR-primers para los *loci* individuales [para cada población particular estudiada] (Zardoya *et al.*, 1996), pero al ser estas regiones a menudo altamente variables, son consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas, debido a dos razones principales: las repeticiones de los microsatélites por sí mismos no codifican para formar ninguna proteína y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias (Phillips *et al.*, 1995).

2.3.3. Índices utilizados en los estudios de variabilidad genética mediante el uso de marcadores microsatélites

Los índices utilizados en los estudios de variabilidad genética comprenden, entre otros, el test exacto de desviación del equilibrio Hardy Weinberg, como modelo para deducir las frecuencias genotípicas en poblaciones con apareamiento aleatorio (Finkeldy & Hattermer, 2007); la presencia y frecuencia de alelos nulos, la proporción de *loci* polimórficos, el número de alelos (N_e), la riqueza alélica (A), el número efectivo de alelos (N_e), el número de alelos exclusivos (N_{ex}),

frecuencias alélicas, heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e). Los valores obtenidos con estos parámetros son esenciales para predecir los cambios en la composición genética de las poblaciones y realizar comparaciones entre ellas (Frankham *et al.*, 2009).

2.3.3.1. Ley de Hardy-Weinberg

El principio Hardy Weinberg es el modelo más simple en genética de poblaciones, el cual asume que en una población con apareamiento al azar no existen factores que puedan causar cambios genéticos de generación en generación (Allendorf *et al.*, 2013). Este modelo se basa en la segregación mendeliana para organismos diploides que se reproducen sexualmente, y en los principios fundamentales de la probabilidad.

Para la construcción de este modelo se hacen las siguientes asunciones (Allendorf *et al.*, 2013; Hartl & Clark, 2007):

- Los organismos son diploides
- La reproducción es sexual
- Las generaciones no se solapan
- El gen bajo consideración tiene dos alelos
- Las frecuencias alélicas son idénticas en hembras y machos
- La reproducción es al azar
- El tamaño de la población es muy grande (en teoría, infinita)
- La migración es despreciable
- Las mutaciones pueden ser ignoradas, y la
- La selección natural no afecta los alelos bajo consideración.

Las consecuencias importantes de este principio son: primero, que las frecuencias genotípicas permanecerán constantes de generación en generación, por lo tanto la variación genética se mantendrá en el tiempo. Segundo, que las frecuencias genotípicas estarán en proporciones binomiales (Hardy-Weinberg), es decir, las frecuencias genotípicas después de una generación de apareamiento aleatorio estarán en función binomial de las frecuencias alélicas (Allendorf *et al.*, 2013). Finalmente, otra consecuencia importante es que, si la población presenta alelos raros, la población contendrá muchos más heterocigotos que homocigotos para el alelo (Hartl & Clark, 1997).

Estas asunciones simplifican la tarea de describir las características genéticas de las poblaciones, permitiendo describir a una población por las frecuencias de los alelos en un *locus*, en lugar de describir los muchos genotipos diferentes que podrían producirse en un *locus* diploide. Además, permiten determinar cómo las frecuencias genotípicas de una población divergen de las frecuencias genotípicas en equilibrio (Allendorf *et al.*, 2013; Loo, 2011).

2.3.3.2. Alelos nulos

Un alelo nulo es cualquier alelo en un *locus* microsatélite que no amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa, siendo propensos a encontrarse en poblaciones con un gran tamaño efectivo, y con una tasa de mutación inusualmente alta en las regiones que flanquean el marcador microsatélite (Chapuis & Estoup, 2007; Dakin & Avise, 2004).

Determinar la presencia de alelos nulos es importante, debido a que pueden distorsionar los resultados de las investigaciones en genética de poblaciones. Los alelos nulos disminuyen la heterocigosidad aparente en una muestra, debido a que si sólo un alelo en un organismo heterocigoto es amplificado entonces será genotipado erróneamente como un homocigoto, lo que conducirá a sobrestimaciones de las frecuencias alélicas, e interferirá con las medidas de diversidad genética y con las estimaciones sobre la estructura genética en una población (Kalinowski & Taper, 2006).

2.3.3.3. Proporción de *loci* polimórficos

Una población es polimórfica, si dos o más alelos coexisten en esa población. No obstante, si uno de los alelos tiene una frecuencia muy alta (un 95% o más), los alelos aparecen como uno, a menos que el tamaño de la población sea muy grande (Graur & Li, 2000); por lo que un *locus* es definido como polimórfico, si la frecuencia de alelo más común es menor al 95% (Allendorf *et al.*, 2013; Graur & Li, 2000; Hartl & Clark, 1997; Nei, 1975). Además, la definición de polimorfismo de 0.95 indicada (y si los alelos están mezclados al azar dentro de los genotipos) indican que al menos el 9.5% de la población es heterocigota para el alelo más común (Hartl & Clark, 1997).

2.3.3.4. Frecuencias alélicas

En un organismo diploide, cada célula tiene dos copias de la mayoría de los genes, uno heredado de la madre y otro del padre; y cada copia de un gen puede no contener exactamente la misma secuencia de ADN, si la secuencia de ADN en un gen es diferente entre las dos copias, entonces se trata de diferentes alelos para ese gen (Losos *et al.*, 2014). Teniendo en consideración esta definición, la unidad básica en la descripción de la variación genética es la frecuencia de un alelo, la cual se define como la abundancia relativa o rareza de un determinado alelo en un *locus* (Lossos *et al.*, 2014; Futuyma, 2005).

La importancia de este parámetro radica en que la frecuencia de cualquier alelo puede aumentar o disminuir de una generación a la siguiente, debido a la deriva génica; y aunque no se puede predecir la dirección del cambio, se puede describir la magnitud esperada, es decir, cuanto menor sea la población, se espera un mayor cambio en las frecuencias alélicas (Allendorf *et al.*, 2013). Otra razón de su importancia, es que el nivel de heterocigosidad es dependiente de las frecuencias alélicas. Por ejemplo, en condiciones de EHW, dos alelos (iguales o diferentes) pueden contribuir al azar a la formación de un individuo diploide en la próxima generación, lo cual ocurrirá con una probabilidad igual a la frecuencia de este alelo (Losos *et al.*, 2014).

Así, en equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) la probabilidad de que un individuo sea homocigótico para un alelo que se encuentra a una frecuencia $p = 0.3$ sería p^2 $(0.3)^2 = 0.09$, mientras que la probabilidad de un individuo heterocigoto para dos alelos que se encuentran en frecuencias de 0.3 y 0.6, respectivamente, sería de $2*(0.3)*(0.6) = 0.36$. Entonces, si se suman las frecuencias esperadas de los posibles heterocigotos en una población, se obtendrá la heterocigosidad esperada (Lossos *et al.*, 2014). La heterocigosidad esperada incrementa con un mayor número de alelos, y es mayor si las frecuencias de esos alelos son similares (Losos *et al.*, 2014).

Finalmente, cualquier variación de las frecuencias genotípicas en una generación cambiará las frecuencias de los alelos llevados por los gametos en la reproducción, por lo que las frecuencias genotípicas de la generación siguiente se verán alteradas (Futuyma, 2005). Tal variación de generación a generación, es el proceso central de cambio evolutivo. Sin embargo, las frecuencias de genotipos y alelos no cambian por sí mismos; algo tiene que

hacerlas cambiar, los factores causantes de tales cambios en las frecuencias son las causas de la evolución (Futuyma, 2005).

2.3.3.5. Número de alelos

El número de alelos se calcula determinado el número total de alelos (N_a) en cada *locus* (L), para finalmente sumar los alelos de todos los *loci* (Finkeldy & Hattemer, 2007). Sin embargo, debido a que la probabilidad de observar un alelo raro en una población, depende fuertemente del tamaño de la muestra, las comparaciones del número de alelos pueden llevar a falsas conclusiones si el tamaño de las muestras difiere entre las poblaciones estudiadas. Por esta razón, para evaluar el efecto de diferentes tamaños de muestra, se toma en consideración el cálculo de riqueza alélica (Finkeldy & Hattemer, 2007).

2.3.3.6. Riqueza alélica

El concepto de riqueza alélica conduce a la diversidad de los alelos, la cual depende de la existencia de alelos específicos dentro de una población (Van der Werf *et al.*, 2009). En un *locus*, la riqueza alélica se define como el número esperado de alelos diferentes en una muestra, si el tamaño de la muestra son g genes (generalmente el tamaño de muestra más pequeña) (Toro *et al.*, 2009). La riqueza alélica observada, sin embargo, necesita una corrección del tamaño de la muestra, debido a que las posibilidades para descubrir un nuevo alelo aumentan cada vez que se observa un nuevo individuo (Van der Werf *et al.*, 2009).

Este es un problema general en ecología molecular, y para solucionarlo se han propuesto diversos métodos que toman en consideración el tamaño de la muestra. Uno de ellos consiste en estimar la riqueza alélica utilizando la metodología de rarefacción, en donde todas las poblaciones son comparadas de acuerdo al tamaño de la población más pequeña (Freelan *et al.*, 2011). Mientras que una segunda metodología es la extrapolación, en la cual se añade al número real de alelos observado en cada población, el número de alelos que faltan, el cual va depender del tamaño de la muestra (Van der Werf *et al.*, 2009).

2.3.3.7. Número efectivo de alelos

El número efectivo de alelos (N_e) es una medida equivalente al número de alelos que se necesitarían para obtener el mismo nivel de heterocigosidad

esperada, si todos los alelos estuvieran en la misma frecuencia. Por ejemplo cinco alelos, cada uno a una frecuencia de 0.2, contribuirá mucho más a la heterocigosidad esperada ($H_e = 0.8$) que cinco alelos a frecuencias de 0.92, 0.02, 0.02, 0.02 y 0.02 ($H_e = 0.152$) (Frankham *et al.*, 2009).

2.3.3.8. Número de alelos exclusivos

El índice del número de alelos exclusivos (N_{ex}) hace referencia a los alelos que se encuentran exclusivamente en una población, de entre una amplia colección de poblaciones (Kalinowski, 2004).

2.3.3.9. Heterocigosidad

Cada individuo de una especie diploide lleva dos copias de cada *locus* autosómico, uno de cada uno de sus padres. Por lo tanto, el genotipo del individuo en ese *locus* debe ser descrito mediante el seguimiento de los dos alelos que lleva. Si hay sólo dos alelos en la población, hay tres genotipos posibles: dos organismos que llevan dos copias de un determinado alelo, y organismos con dos alelos diferente. Si ambas copias del mismo alelo están en un *locus*, entonces decimos que el individuo es homocigoto en ese *locus*; por el contrario, si las dos copias son diferentes, entonces el individuo es heterocigoto (Losos *et al.*, 2014).

2.3.3.9.1. Heterocigosidad esperada

El parámetro de heterocigosidad esperada (H_e), denominada también como sinónimo de diversidad génica, representa la frecuencia de heterocigotos que se esperaría si una población se encuentra en equilibrio génico (Allendorf *et al.*, 2013; Finkeldy & Hattemer, 2007). Los únicos datos requeridos para el cálculo de heterocigosidad esperada son las frecuencias alélicas dentro de una población, en donde el cálculo de H_e se basará en múltiples *loci*, en cuyo caso la H_e será calculada para cada *locus* y luego promediada sobre todos los *loci*, para presentar una sola estimación para cada población (Freelan, 2005).

2.3.3.9.2. Heterocigosidad observada

La heterocigosidad observada (H_o) estima la probabilidad, en organismos con cruzamiento al azar, de que dos alelos sean diferentes

(Frankham *et al.*, 2009). Para una población, la heterocigosidad observada es el número de heterocigotos en un *locus*, dividido entre el número total de individuos muestreados (Frankham *et al.*, 2009).

2.3.4. Relación genética entre individuos

Las medidas de parentesco juegan un rol importante en la conservación de variabilidad genética en los programas de cría y reproducción, donde se realizan esfuerzos sustanciales para asegurar que los cruzamientos entre hermanos se minimicen y, así, reducir la pérdida de diversidad genética (Lynch & Ritland, 1999). En este contexto, el uso de marcadores moleculares ha permitido realizar inferencias sobre el grado relativo de relación genética entre individuos (Awise, 1994). Por ejemplo, han permitido determinar el grado de relación genética de padres potenciales que derivan del medio silvestre, o de descendientes con relaciones genéticas desconocidas (Lynch & Ritland, 1999; Awise, 1994).

Los estudios de relación genética están expresados en la probabilidad de que conjuntos de genes sean idénticos por descendencia. Por ejemplo, hay una probabilidad de *uno en cuatro*, de que un individuo reciba copias idénticas de un gen de sus padres, si los padres eran hermanos (Weir *et al.*, 2006). Es así, como estas probabilidades, que derivan a partir de genotipos observados, pueden utilizarse para hacer inferencias estadísticas sobre el grado de parentesco (Weir *et al.*, 2006).

2.3.4.1. Estimación de la relación genética entre dos individuos

Para realizar los análisis de paternidad se deben considerar dos aspectos principales: el tipo de marcador molecular que se va a utilizar y la forma en que se va a analizar mediante un modelo o una técnica computacional. Para que un marcador molecular sea efectivo es necesario considerar lo siguiente: (i) que los marcadores utilizados no estén ligados; (ii) que cada marcador sea específico para un solo *locus*, de preferencia uno que este caracterizado en el cromosoma; (iii) que el marcador detecte un número grande de alelos de manera constante y (iv) que pueda crear patrones de bandeo en geles que sean fácilmente interpretables (Eguiarte *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta estas consideraciones, los marcadores microsatélites son los marcadores genéticos más adecuados y sensibles, y son a través de los cuales, puede calcularse en coeficiente de relación para la estimación del grado de parentesco entre diferentes organismos.

- Coeficiente de relación

Las relaciones genéticas, en su sentido más general, involucran la identidad por descendencia de alelos homólogos entre individuos (relaciones genéticas) (Ritland, 1996). La medida fundamental de la relación entre dos individuos x y y se denomina coeficiente de relación. Esta probabilidad denotada como r , es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de cada individuo sean idénticos por descendencia (Ritland, 1996).

La definición tradicional de r para parejas de individuos diploides es $r_{xy} = 2\theta_{xy}$, donde el coeficiente de coancestría θ_{xy} , es la probabilidad de que para un *locus* autosómico, un alelo tomado al azar desde un individuo x sea idéntico por descendencia al alelo tomado al azar desde un individuo y . Para gemelos monocigóticos (clones) el valor de r_{xy} es 1; para relaciones padre-hijo y relaciones entre hermanos completos $r_{xy} = 0.5$; y para relaciones de segundo y tercer orden $r_{xy} = 0.25$ y 0.125 , respectivamente (Lynch & Ritland, 1999; Ritland, 1996).

2.3.5. Diferenciación genética entre poblaciones

La diferenciación genética hace referencia a las diferencias en las frecuencias alélicas que surgen entre las subpoblaciones, debido a la selección natural que puede favorecer diferentes genotipos en subpoblaciones diferentes; a procesos aleatorios en la transmisión de alelos de una generación a la siguiente; o debido a las diferencias de oportunidad en las frecuencias alélicas entre los fundadores iniciales de la subpoblación (Hartl & Clark, 2007).

En una población, el nivel de diferenciación genética puede obtenerse a través del cálculo del índice de fijación, herramienta que de manera independiente fue propuesta por Wright y Malécot en la década de 1940 y 1950, respectivamente. Este estadístico es una herramienta que utiliza las frecuencias alélicas obtenidas de diferentes localidades geográficas para estudiar el flujo génico o para cuantificar la subdivisión de la población, ya que muestra una relación no lineal entre la cantidad de flujo génico y el grado de diferenciación genética entre las subpoblaciones (Eguiarte *et al.*, 2007).

En 1931 y 1951 Wright mostró que la cantidad de diferenciación genética entre poblaciones tiene una relación predecible a las tasas de importantes procesos evolutivos, como migración, mutación y deriva genética. Por ejemplo, grandes poblaciones entre las que hay una elevada migración tienden a tener poca

diferenciación, mientras que pequeñas poblaciones con poca migración, tienden a estar altamente diferenciadas (Holsinger & Weir; 2009).

2.3.5.1. Coeficiente de diferenciación genética

El índice de fijación se encuentra entre los estadísticos descriptivos más ampliamente utilizados en la genética de poblaciones y genética evolutiva, debido a que es uno de los índices más exactos para calcular la tasa de diferenciación genética. El índice de fijación (F_{ST}) permite una comparación objetiva de los efectos generales de la estructura genética de la población, sin entrar en detalles de frecuencias alélicas, o niveles de heterocigosidad observada (Hartl & Clark, 2007); además, es la medida más inclusiva de subdivisión en una población, debido a que se obtiene a partir del promedio de la heterocigosidad esperada de las subpoblaciones, en comparación con heterocigosidad esperada para el total de la población (Hamilton, 2009).

Los valores del coeficiente de diferenciación genética varían entre cero y uno. Un valor de cero indica que la población se encuentra en equilibrio (no existe subdivisión), dándose apareamientos aleatorios sin divergencia genética en la metapoblación; mientras que un valor de uno, indica aislamiento completo, una subdivisión extrema de la metapoblación (Sans, 2004). En la práctica, valores por debajo de 0.15 representan una escasa diferenciación genética, valores entre 0.15 y 0.25 indican que las poblaciones se encuentran considerablemente diferenciadas, mientras que valores superiores a 0.25 indican poblaciones fuertemente diferenciadas (Sosa *et al.*, 2002).

2.3.5.2. Coeficiente de endogamia

El coeficiente de endogamia (F_{IS}) se define como la probabilidad de que dos alelos en un *locus*, en un individuo endogámico, sean idénticos por descendencia (Hartl & Clark, 2007). Su valor es obtenido comparando el promedio de la heterocigosidad observada en cada subpoblación, con el promedio de la heterocigosidad esperada para todas las subpoblaciones (Hamilton, 2009); donde un valor menor a cero indica un exceso de heterocigotos, mientras que un valor mayor a cero indica una reducción en la heterocigosidad como consecuencia de apareamientos no aleatorios o incidencia de alelos nulos (Barbosa *et al.*, 2014; Barahona, 2014).

2.3.5.3. Coeficiente general de consanguinidad (F_{IT})

El coeficiente de consanguinidad compara el promedio de la heterocigosidad observada de las subpoblaciones, con la heterocigosidad esperada para el total de la población (Hamilton, 2009). Este parámetro corresponde al F_{IT} de Wright, y es un indicador de si dos alelos de un mismo *locus*, en un individuo, son idénticos por descendencia, respecto a la metapoblación (Sans, 2004). Al igual que F_{IS} , un valor mayor a cero indica una desviación de las frecuencias génicas esperadas, debido a la combinación de apareamiento no aleatorio dentro de las subpoblaciones, y a la divergencia de las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones (Hamilton, 2009).

2.3.5.4. Relación entre los F-estadísticos

El valor del índice de fijación F_{ST} entrega medidas de autocigosidad en una subpoblación finita, resultantes de la deriva genética al azar; el valor del coeficiente de endogamia F_{IS} entrega medidas de autocigosidad resultantes de endogamia; y el valor del coeficiente general de consanguinidad F_{IT} es la probabilidad de autocigosidad tomando en cuenta ambos procesos (Hartl & Clark, 2007). Si se conocen los valores de F_{IS} y F_{ST} , entonces se puede obtener el valor para F_{IT} (Nei, 1977).

Finalmente, en base a todo lo expuesto, se plantea el siguiente problema de investigación
¿Existen diferencias en la variabilidad genética entre poblaciones silvestres y de cultivo de *Paralichthys adspersus* “lenguado” de Huarmey, Perú, en base a marcadores microsatélites?

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Identificar marcadores microsatélites y comparar la variabilidad genética entre poblaciones silvestres y de cultivo de *Paralichthys adspersus* "lenguado" de Huarney, Ancash, Perú.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar marcadores microsatélites para las poblaciones silvestres y de cultivo de *P. adspersus*, a partir de secuencias ya establecidas para el género *Paralichthys*.
- Determinar el equilibrio genético en la población silvestre y de cultivo de *P. adspersus* a través del test exacto de desviación del equilibrio Hardy-Weinberg.
- Determinar la presencia y frecuencia de alelos nulos en los marcadores microsatélites seleccionados.
- Calcular los parámetros que caracterizan las variaciones genéticas en la población silvestre y de cultivo de *P. adspersus*, a través del cálculo del número de alelos, número medio de alelos, número efectivo de alelos, número exclusivo de alelos, riqueza alélica y frecuencias alélicas.
- Determinar el nivel de heterocigosidad en la población silvestre y de cultivo de *P. adspersus*, mediante el cálculo de la heterocigosidad esperada, heterocigosidad observada y heterocigosidad imparcial.
- Determinar la deficiencia de heterocigotos en la población silvestre y de cultivo de *P. adspersus*, mediante el cálculo del índice de endogamia y el coeficiente general de consanguinidad.
- Calcular el grado de diferenciación genética existente entre la población silvestre y de cultivo de *P. adspersus*.
- Determinar diferencias significativas de variabilidad genética entre la población silvestre y de cultivo de *P. adspersus*.
- Determinar el grado de relación genética entre los organismos que forman la población F1, y entre los organismos que forman la población silvestre, a través del coeficiente de relación r .

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Área de estudio

Los individuos silvestres fueron colectados de cuatro diferentes lugares: Playa Gramita y Culebras, Provincia de Huarmey, Departamento de Ancash; Playa Vila Vila y Morro Sama, Provincia de Tacna, Departamento de Tacna; mientras que las muestras de los individuos manejados en cautividad fueron proveídas por la empresa Pacific Deep Frozen, empresa productora y comercializadora de productos hidrobiológicos ubicada en el Distrito de Culebras, Provincia de Huarmey, Departamento de Ancash (Figura 5).

4.2. Muestra biológica y colecta de la muestra

Se analizaron un total de 112 individuos, 70 organismos manejados en cautividad y utilizados como reproductores, provenientes de una primera generación (F1) de una reproducción en cautiverio en Tacna; y un grupo de organismos silvestres: 30 organismos silvestres provenientes de la Provincia de Huarmey, Departamento de Ancash, y 12 organismos silvestres provenientes de la Provincia de Tacna, Departamento de Tacna (Tabla 1).

El tamaño de las muestras de la población de cultivo y la población silvestre de Huarmey fue escogido de acuerdo a las recomendaciones dadas por Hale *et al.* (2012), quienes indican que un tamaño de muestra entre 25 y 30 individuos por población, asegura que se muestreen la mayoría de alelos informativos a frecuencias que reflejen los de la población total.

Los ejemplares del hatchery y silvestres fueron capturados de forma aleatoria utilizando redes circulares. De cada uno de los individuos capturados se colectó un fragmento de aleta caudal con la ayuda de pinzas y tijeras, previamente esterilizadas, y se colocó en envases de plástico de 15 ml de capacidad, con alcohol al 96%.

Finalmente, las muestras fueron rotuladas y transportadas al Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción de la Universidad Nacional del Santa, en donde se realizó un recambio total de alcohol y se almacenaron a -20°C.

Tabla 1. Información de las muestras recolectadas, número de individuos recolectados, en cada lugar muestreado.

Especie	Grupos	Localidad	Empresa/Playa	Número de Individuos
<i>Paralichthys adspersus</i>	F1	Cultivo	Empresa Pacific Deep Frozen	70
	SILVESTRES	Huarmey	Playa Gramita	12
			Playa Culebras	18
		Tacna	Playa Vila Vila	6
			Playa Morro Sama	6



Figura 5. Mapa con la ubicación geográfica y nombres de los cinco puntos de muestreo de *P. adspersus*. Se muestra la ubicación de los puntos de muestreo en Huarmey, playas la Gramita y Culebras; los puntos de muestreo en Tacna, playas Morro Sama y Vila Vila; así como la ubicación de la empresa proveedora de los organismos manejados en cautividad.

4.3. Análisis genéticos

4.3.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de las 112 muestras se realizó mediante el método de digestión a 37°C con SDS-proteinasa K/Fenol (Taggart *et al.*, 1992), utilizando como muestra los fragmentos de aleta caudal recolectados (de aproximadamente 0,5 cm).

4.3.2. Cuantificación de ADN

El ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría, utilizando un cuantificador marca Epoch, valorándose la calidad del extracto midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda. Posteriormente, cada muestra se alicuotó hasta la obtención de una concentración final de 25 ng/μl de ADN. Las alícuotas se almacenaron a 4°C y las soluciones madre (Stock) se conservaron a -20°C.

4.3.3. Evaluación de la calidad de ADN

Se evaluó el estado del ADN por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando una solución amortiguadora TBE 0.5X (Tris-HCL, Ácido Bórico, EDTA), con un voltaje de 90 voltios durante 30 minutos; y la calidad de las muestras solo fueron aceptadas como válidas, cuando no se detectó presencia de ARN, y el ADN genómico apareció íntegro, observándose bandas definidas y de alto peso molecular al inicio del gel (Figura 6).

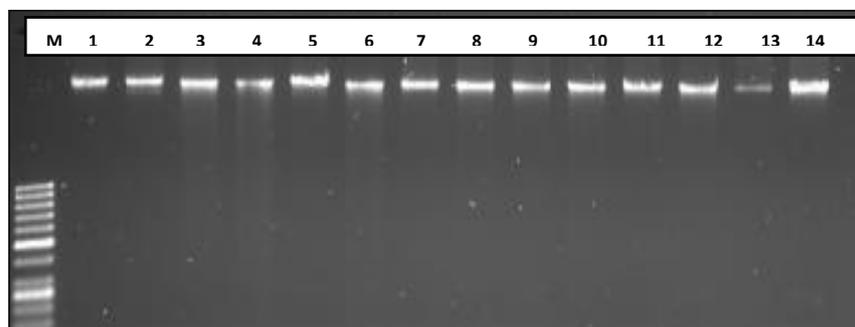


Figura 6. Gel de agarosa al 1% sometido a electroforesis para visualizar la integridad de ADN. Del carril 1-14 ADN genómico extraído, Carril M: Marcador

4.3.4. Elección de los *loci* microsatélites empleados para el genotipado

Los *loci* microsatélites se obtuvieron a partir de los marcadores generados para la especie *P. olivaceus*, descritos en la literatura (Sekino & Hara, 2001; Takagi *et al.*,

1999; Kim *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2008; Coimbra *et al.*, 2001). Los marcadores microsatélites reunieron todas las características deseadas para el desarrollo de los objetivos del trabajo: polimorfismo elevado, ausencia de alelos nulos, fácilmente reproducibles en el laboratorio, y consensuados a nivel internacional.

En la Tabla 2 se describen los 14 marcadores microsatélites seleccionados y evaluados.

Tabla 2. Microsatélites seleccionados con las referencias bibliográficas de donde fueron obtenidos, y los primers a emplearse para su amplificación.

Microsatélites			
Especie	Locus	Secuencia de los primers (5'-3')	Referencia
	<i>Po35F</i>	TGGTTCTAGTGTGGTCTGGTGA	Sekino & Hara, 2001
	<i>Po35R</i>	CCTACAGCACAGATATGACCTTT	Sekino & Hara, 2001
	<i>Po56F</i>	TCGAGCGTAAACAAACCAGCTAACA	Sekino & Hara, 2001
	<i>Po56R</i>	GCTGAAAATCGCTTTAGCTTCCCAT	Sekino & Hara, 2001
	<i>Po91F</i>	AGGTTTCAAGGTGTTTCATTGCGAGTC	Sekino & Hara, 2001
	<i>Po91R</i>	TAAAGGAAGTGCCTCACTGTGGAGAA	Sekino & Hara, 2001
	<i>Pol-1F</i>	TAGGAGGATTGATAGGAT	Takagi <i>et al.</i> , 1999
	<i>Pol-1R</i>	CCCGACTTTTAGATGTTC	Takagi <i>et al.</i> , 1999
	<i>Pol-4F</i>	GTGTGCTCTGGGCTTTTG	Takagi <i>et al.</i> , 1999
	<i>Pol-4R</i>	TTACCTGTCCTGTTACTC	Takagi <i>et al.</i> , 1999
	<i>KOP5F</i>	CACCCACTGCACCTCTCAATG	Kim <i>et al.</i> , 2003
	<i>KOP5R</i>	CGATTTCGGACATGTGATACGTTCA	Kim <i>et al.</i> , 2003
	<i>KOP45F</i>	GTTGTTCTGAGGATAAATGCC	Kim <i>et al.</i> , 2009
	<i>KOP45R</i>	CCACCGAAAATGTTTTGAATC	Kim <i>et al.</i> , 2009
	<i>KOP49F</i>	TTCTTCAAGCAGAAATGATTAAG	Kang <i>et al.</i> , 2008
	<i>KOP49R</i>	CAGCAACACTGAGATAGATCC	Kang <i>et al.</i> , 2008
	<i>KOP51F</i>	ACTCTCTGTTTCTCATAGGCA	Kang <i>et al.</i> , 2008
	<i>KOP51R</i>	ATTCCTTCTTGACATGACAC	Kang <i>et al.</i> , 2008
<i>P. olivaceus</i>	<i>Poli2TUF_F</i>	ACAATAGGATGCAGCTGCCT	Coimbra <i>et al.</i> , 2001
	<i>Poli2TUF_R</i>	AAGCGCAAATTGTTATCCG	Coimbra <i>et al.</i> , 2001
	<i>Poli9TUF_F</i>	GATCTGCAGAAACACACACTCA	Coimbra <i>et al.</i> , 2001
	<i>Poli9TUF_R</i>	GCGAGTTCTTCTCAAATGC	Coimbra <i>et al.</i> , 2001
	<i>Poli13TUF_F</i>	CACCTCCAGGTTCTACAGTCG	Coimbra <i>et al.</i> , 2001
	<i>Poli13TUF_R</i>	TCCTGCACAGAGGATGAAAA	Coimbra <i>et al.</i> , 2001
	<i>Poli23TUF_F</i>	CACAGTGTCAAAAGTGGTGG	Coimbra <i>et al.</i> , 2001
	<i>Poli23TUF_R</i>	GGGTGTTCTGTGTCATGCTG	Coimbra <i>et al.</i> , 2001
	<i>Poli28TUF_F</i>	ATCTCCCAACTGTCAATCATCA	Coimbra <i>et al.</i> , 2001
	<i>Poli28TUF_R</i>	GTCGAGTCCAGTATCACTGCC	Coimbra <i>et al.</i> , 2001

4.3.5. Amplificación mediante PCR de los *loci* microsatélites

Para la amplificación de los *loci* microsatélites, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la *estandarización inicial*, la reacción tuvo un volumen final de 6 µl, y una composición de: 4,32 µl de agua grado PCR, 0.66 Taq buffer+KCl-MgCl₂ (12X); 0,51 µl de MgCl, 0,33 µl dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0.06 µl de *Taq polimerasa*; 1 µl de ADN; 0.06 µl del cebador forward y 0.06 µl del cebador reverse. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystem–Veriti 96 pocillos, e iniciaron con un proceso de *desnaturalización* a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos, los cuales consistieron de: 95°C por 25 segundos, *temperatura de hibridación* durante 20 segundos, *extensión* a 72°C por 20 segundos, y una *extensión final* a 72°C durante 7 minutos.

Finalmente, los productos de amplificación obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 1% para comprobar la especificidad del microsatélite y si este presentaba el peso molecular correspondiente al descrito en la bibliografía.

Los protocolos finales para cada marcador microsatélite, son presentados de manera individual en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Protocolos funcionales para los 10 *loci* microsatelites seleccionados

ETAPA	Po35			Po91			KOP45			Poli28TUF			Poli9TUF		
	T°C	T	nº ci	T°C	t	nº ci	T°C	t	nº ci	T°C	t	nº ci	T°C	t	nº ci
Desnaturalización inicial	95	5 min	1	95	5 min	1	95	3 min	1	95	3 min	1	95	3 min	1
Desnaturalización inicial	95	20 s	29	95	25 s	25	95	30 s	30	95	30 s	25	95	30 s	28
Hibridación	59	20 s	29	60	20 s	25	56	20 s	30	60	30 s	25	55	20 s	28
Extensión	72	20 s	29	72	12 s	25	72	12 s	30	72	12 s	25	72	12 s	28
Extensión final	72	7 min	1	72	7 min	1	72	7 min	1	72	7 min	1	72	7 min	1

ETAPA	Poli23TUF			KOP5			Po56			Poli2TUF			Poli13TUF		
	T°C	T	nº ci	T°C	t	nº ci	T°C	t	nº ci	T°C	t	nº ci	T°C	t	nº ci
Desnaturalización inicial	95	3 min	1	95	3 min	1	95	5 min	1	95	3 min	1	95	5 min	1
Desnaturalización inicial	95	30 s	35	95	30 s	35	95	25 s	35	95	30 s	35	95	25 s	42
Hibridación	62	30 s	35	56	30 s	35	60	20 s	35	55	30 s	35	55.5	20 s	42
Extensión	72	1 min	35	72	1 min	35	72	20 s	35	72	1 min	35	72	20 s	42
Extensión final	72	7 min	1	72	7 min	1	72	7 min	1	72	7 min	1	72	7 min	1

T°C: temperatura en grados Celsius, t: tiempo, nº ci: número de ciclos.

Tabla 4. Concentración de los reactivos por *locus* analizado

REACTIVO	Po35		Po91		KOP45		Poli28TUF		Poli9TUF	
	Volumen X1 (µl)	<i>Cc final</i>								
Agua PCR	4.32		4.35		4.59		4.32		4.32	
Taq Buffer KCl-MgCl ₂	0.66		0.66		0.66		0.66		0.66	
MgCl ₂ (25mM)	0.51	2.12 mM	0.48	2mM	0.24	1 mM	0.51	2.12 mM	0.51	2.12 mM
dNTPs (2.5 mM)	0.33		0.33		0.33		0.33		0.33	
Forward (12.5 µM)	0.06		0.06		0.06		0.06		0.06	
Reverse (12.5 µM)	0.06		0.06		0.06		0.06		0.06	
TaqPoli (5U/ µl)	0.06		0.06		0.06		0.06		0.06	
DNA (25 ng/ µl)	1		1		1		1		1	

REACTIVO	Poli23TUF		KOP5		Po56		Poli2TUF		Poli13TUF	
	Volumen X1 (µl)	<i>Cc final</i>								
Agua PCR	6.94		0.94		6.94		6.94		6.94	
Taq Buffer KCl-MgCl ₂	1		1		1		0.76		1	
MgCl ₂ (25mM)	0.76	2 mM	0.76	2 mM	0.76	2 mM	0.5	2 mM	0.76	2 mM
dDNTP (2.5 mM)	0.5		0.5		0.5		0.1		1	
Forward (12.5 µM)	0.1		0.1		0.1		0.1		0.2	
Reverse (12.5 µM)	0.1		0.1		0.1		0.1		0.2	
TaqPoli (5U/ µl)	0.1		0.1		0.1		0.1		0.2	
DNA (25 ng/ µl)	1		1		1		1		1	

TaqPoli: DNA polimerasa, dNTPs: desoxiribonucleótidos, cc: concentración.

4.3.6. Detección del polimorfismo

El polimorfismo de longitud de los marcadores microsátélites permite que los alelos puedan ser separados por su tamaño mediante electroforesis de poliacrilamida o mediante electroforesis capilar. Para este estudio, los productos amplificados fueron visualizados en geles de poliacrilamida para su posterior genotificación.

4.3.6.1. Preparación de geles de poliacrilamida heterogéneos

Los marcadores microsátélites fueron visualizados en un sistema de electroforesis vertical de poliacrilamida (PAGE) al 10%. La preparación del sistema de electroforesis se detalla a continuación:

4.3.6.1.1. Montaje del equipo

El primer paso consistió en limpiar los cristales formadores del gel, evitando cualquier material que pueda afectar una uniforme polimerización.

El siguiente paso consistió en agregar silicona líquida al cristal sin hendidura, y una solución adherente (1 mL de alcohol absoluto, 6 µl de ácido acético glacial, y 2 µl de xylane) al cristal con hendidura. Finalmente los cristales se ensamblaron en el sistema Omni PAGE CVS10D (Cleaver Scientific Ltd).

4.3.6.1.2. Preparación de las soluciones y corrida electroforética

Se prepararon geles de acrilamida al 10% de acuerdo al sistema Laemmli (Coligan *et al.*, 2010). El sistema Laemmli es un sistema estandarizado para los geles PAGE, y consiste en un sistema de buffer discontinuo, fundamentado en el efecto concentrador de un control móvil formado entre el ion líder cloruro, y el ion terminal de glicinato (Figura 7).

Para preparar el gel separador al 10% (*resolving*) se utilizó la siguiente mezcla: 40% Acrilamida/Bisacrilamida 19:1 Bio-Rad (1800 µl), 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (1500 µl), agua destilada (2670 µl), TEMED (3 µl) y persulfato de amonio APS al 10% (30 µl).

Preparada la solución, esta se agregó inmediatamente al sistema (de lo contrario se puede polimerizar en el matraz) hasta la altura deseada. Con el uso de una micropipeta se cubrió lentamente la parte superior del gel con una capa de isopropanol (0.5 cm de espesor), con el objetivo de obtener una superficie uniforme. Se dejó polimerizar el gel alrededor de 20 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la polimerización del gel, se procedió a eliminar completamente el exceso de alcohol isopropílico, debido a que el alcohol residual puede reducir la resolución de las bandas.

El gel concentrador al 4% (*stocking*) se preparó con 40% Acrilamida/Bisacrilamida 19:1 Bio-Rad (300 μ l), 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (756 μ l), agua destilada (1938 μ l), TEMED (3 μ l) y 10% APS (15 μ l).

Preparada la solución, se agregó inmediatamente al sistema y se insertó el peine de 12 pocillos; cuando fue necesario, se añadió *stocking* adicional para llenar completamente los espacios en el peine. Se tuvo cuidado de no atrapar burbujas de aire en los bordes de los dientes del peine, ya que podrían haber causado pequeñas depresiones circulares en el pozo durante la polimerización, dando lugar a una distorsión durante la separación de las bandas. Después de este proceso, se dejó polimerizar el gel alrededor de 20 minutos a temperatura ambiente.

Terminada la polimerización se retiró con cuidado el peine, sin dañar los bordes. Después de retirar el peine, se enjuagó los pocillos con buffer TBE 0.5X para eliminar el monómero no polimerizado. Finalizado este proceso, se cargaron las muestras. A cada tubo de 0.2 ml, con 6 μ l de muestra, se les agregó 1 μ l de buffer de corrida (Thermo Scientific 6X DNA Loading Dye), y se cargó 3 μ l de cada muestra por pocillo en el gel.

La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 85 V durante dos horas y media. Finalizada la electroforesis, se retiró el gel de los vidrios y se colocó en un recipiente que permitió el proceso de teñido y revelado de las bandas.

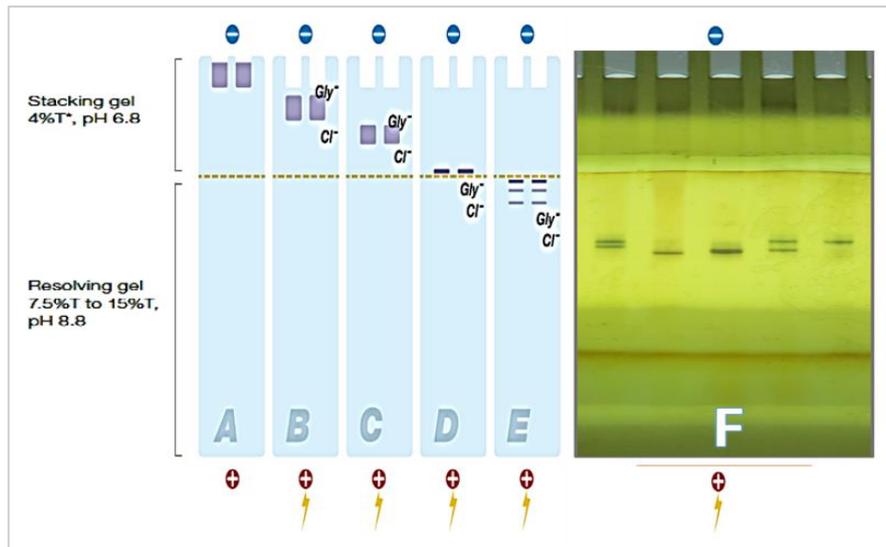


Figura 7. Migración de las moléculas e iones del buffer en un sistema de electroforesis vertical discontinuo.

En la Figura 7 puede observarse, paso a paso, el movimiento de las moléculas en un sistema Laemmli. (A, B) La muestra fue disuelta en un buffer que contiene glicina y HCl a pH alcalino (8 o 9). A este pH la glicina puede estar de dos formas: zwitterion y anión. El primero no tiene carga y el segundo sí. Cuando se añade voltaje, y la muestra entra en contacto con el gel stacking que se encuentra a pH 6.8, el equilibrio tiende hacia la predominancia de zwitterion glicina que no tiene movilidad electroforética, siendo reemplazados por la muestra de ADN que tiene carga negativa, ocurriendo la migración en este gel: ion cloro > ADN > glicina. (C) La muestra tiende a formar una capa delgada entre el frente del ion cloro y la zwitterion glicina. (D, E, F) Cuando ingresa al gel resolviendo, con pH 8.8, ahora el equilibrio de la glicina va hacia el anión glicina con movilidad, la muestra de ADN “siente” la disminución del poro retrasándose su avance, el que solo se da entonces por el tamaño de la muestra debido a que el ratio carga-masa es igual en todas las moléculas (Boyer, 2012)

4.3.7. Tinción con nitrato de plata

4.3.7.1. Procedimiento

En un recipiente se colocó el gel y se agregó la solución de fijación (995 ml de agua destilada, 100 µl de alcohol absoluto, 5 ml de ácido acético glacial) y se dejó por 15 min en un agitador de placas. Finalizado el tiempo, se llevó el gel a un nuevo recipiente, y se agregó la solución de nitrato de plata (1 L de agua destilada más 1 g de nitrato de plata) y se dejó en movimiento por 15 min. Finalmente se llevó el gel a otro recipiente y se agregó la solución de revelado (975 ml de agua destilada, 10 ml de formaldehído al 37%, 15 g de hidróxido de sodio) y se dejó en movimiento por 15 min, al fin del cual se pudo observar las bandas de ADN en el gel.

4.3.8. Genotificación de los individuos

Se realizó la asignación de alelos de acuerdo al tamaño de las bandas, estimada por comparación con los tamaños de un estándar de ADN (marcador de 300-pb Thermo Scientific™ GeneRuler™).

Para el análisis de los alelos encontrados, se utilizó el programa Quantity One® 1-D Analysis Software-Bio Rad, para formar una base de datos conteniendo los genotipos de cada una de las muestras.

Los datos obtenidos para cada individuo y *locus* amplificado se incluyeron en una matriz de doble entrada (hoja de cálculo EXCEL). Se elaboró una base de datos en la que se incluyeron los individuos analizados y los alelos identificados por población y *locus* respectivo. Una vez completada la matriz de datos, se empleó el programa CONVERT 1.31, el cual permitió exportar los valores a formatos que pudieron ser utilizados en programas de análisis genético.

4.3.9. Análisis de la variabilidad genética

Para los análisis de variabilidad genética se elaboró una matriz en base a la identificación de los alelos presentes en cada uno de los microsatélites. Se revisó los posibles corrimientos (stuttering) en el tamaño de bandas, amplificación predominante de alelos pequeños (dropout), y eventuales errores tipográficos, mediante el programa MICRO-CHECKER V.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

Se estimó la presencia de alelos nulos mediante el programa MICRO-CHECKER V.2.2.3, utilizando los métodos descritos por Chakraborty *et al.* (1992) y Brookfield (1996), los cuales indican la presencia de alelos nulos cuando la prueba de probabilidad combinada muestra un exceso significativo de homocigotos. Adicionalmente, se calculó la frecuencia de alelos nulos mediante el programa HP-Rare 1.0 (Kalinowski, 2005), que estima la frecuencia de alelos nulos desde datos genéticos codominantes.

Para determinar si las poblaciones se encontraban en equilibrio génico, se realizó el test exacto de equilibrio Hardy-Weinberg, para cada *locus*/población, mediante el algoritmo de cadenas de Markov (Guo & Thompson, 1992) incluido en el programa GenAIEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012).

Para determinar el nivel de diversidad genética en cada población estudiada, se calculó la riqueza alélica mediante el programa HP-Rare 1.0 (Kalinowski, 2005).

El cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas de cada *locus*, el porcentaje de polimorfismo (P), el número de alelos (Na), el número de alelos efectivos (Ne), el número de alelos exclusivos (Nex), la Heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada (He) para cada microsatélite se realizó mediante el programa bioinformático GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012).

Mediante estos programas se llevó a cabo un análisis de las distribuciones alélicas en cada población y *locus* incluidos en el estudio. El análisis se realizó considerando pares de poblaciones, calculándose por *locus* el test exacto de Fisher descrito por Raymond & Rousset (1995), adoptando como hipótesis nula que la distribución alélica a través de las poblaciones era idéntica.

4.3.10. Análisis de relación genética

Las relaciones genéticas entre los organismos fueron estimados utilizando el coeficiente de relación r . Para estimar la relación molecular, se utilizó el método descrito por Lynch & Ritland (1999), implementado en el programa GenAlEx (Peakall & Smouse, 2012). Los valores promedios de r_{xy} se agruparon en tres categorías, según lo descrito por Sekino *et al.* (2004) (Tabla 5).

Tabla 5. Grupos de relación genética de acuerdo a los valores generados por el índice de relación genética r_{xy} .

CATEGORÍA	RANGO DE VALORES
Hermanos completos	0.369 ± 0.173
Medios hermanos	0.081 ± 0.166
Sin relación	-0.178 ± 0.134

Finalmente, para generar una matriz con las parejas de individuos enfrentadas y determinar su grado de relación se utilizó el programa ML-Relate (Kalinowski *et al.*, 2006).

4.3.11. Calculo de los F-estadísticos y análisis de varianza molecular

El cálculo del nivel del coeficiente de endogamia, coeficiente general de consanguinidad y el coeficiente de diferenciación genética de las poblaciones estudiadas, se realizó mediante el programa GenAlEx (Peakall & Smouse, 2012), estableciéndose la definición propuesta por Wright (1965; 1978), donde valores entre 0,00 a 0,05; 0,05 a 0,15; 0,15 a 0,25 y > 0,25 indican pequeña, moderada, alta y elevada diferenciación genética, respectivamente.

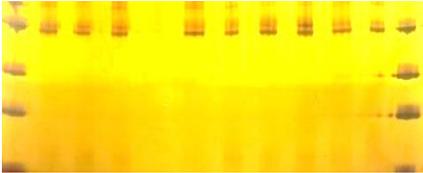
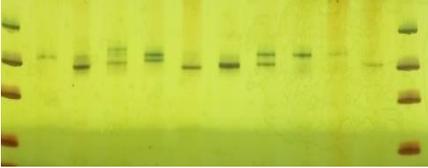
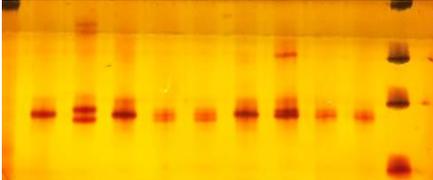
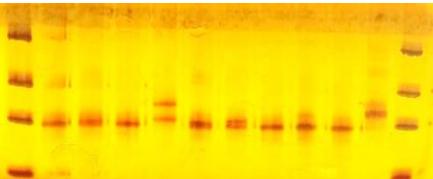
Finalmente, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) para estimar la segregación de la variación entre las dos poblaciones estudiadas (variación entre las dos poblaciones, y variación dentro de las poblaciones); y de esta manera determinar si existían diferencias significativas entre ellas, en base a la entrada binaria para el cálculo de PhiPT (una medida que facilita la comparación entre dos codominantes).

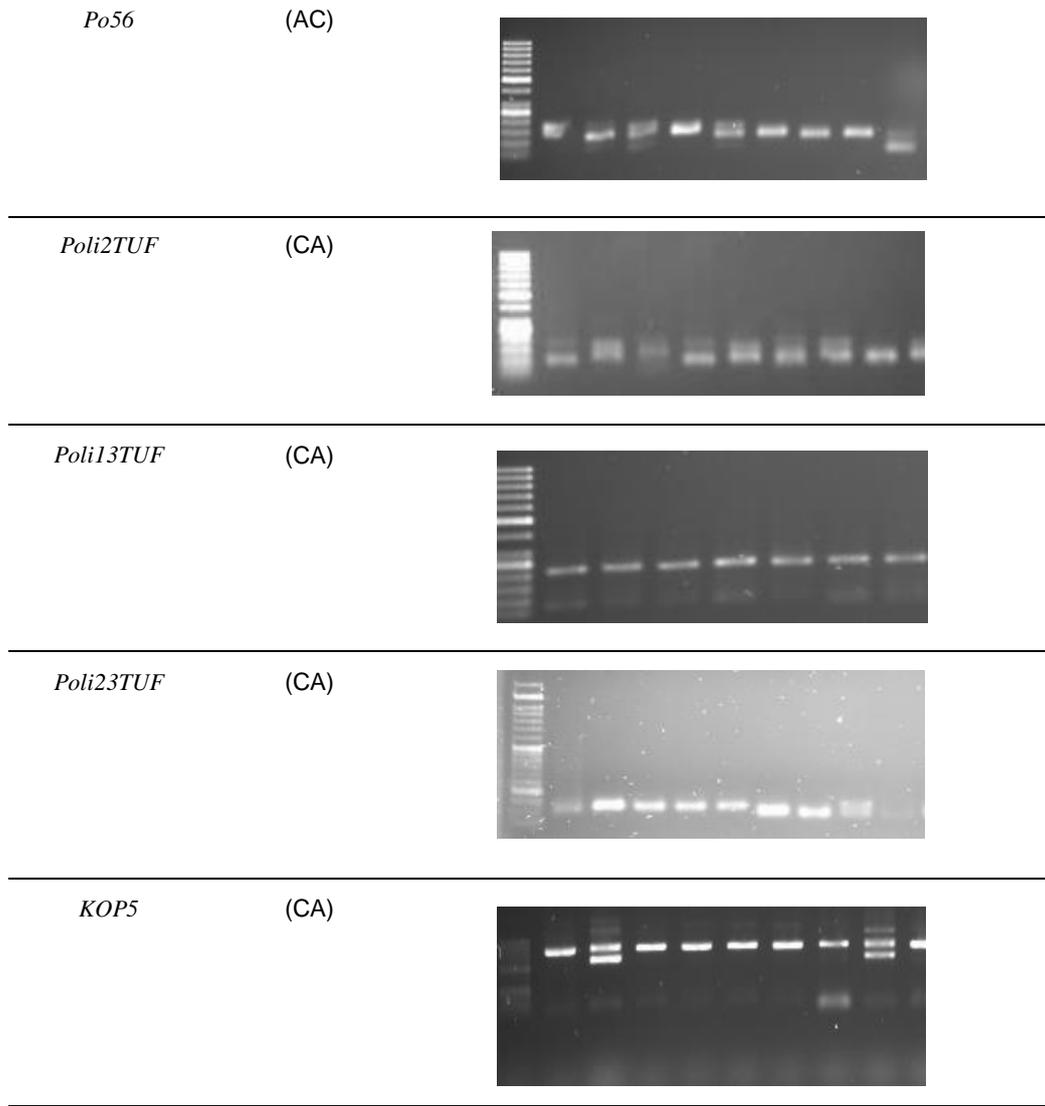
5. RESULTADOS

5.1. Estandarización y selección de los primers utilizados en los análisis de variabilidad genética

Tras las pruebas con los 14 pares primers seleccionados, en diez de ellos se observó amplificación específica (*Po35*, *Po56*, *Po91*, *Poli2TUF*, *Poli9TUF*, *Poli13TUF*, *Poli23TUF*, *Poli28TUF*, *KOP45* y *KOP5*), que corresponde a un 71.43% de amplificación positiva. El patrón de bandeo de los diez *loci* microsatélites con amplificación positiva se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Patrón de bandeo en los diez *loci* microsatélites con amplificación positiva en *Paralichthys adspersus*.

Nombre	Motivo	Patrón de bandeo
<i>Po35</i>	(CA)	
<i>Po91</i>	(CA)	
<i>KOP45</i>	(AC)	
<i>Poli9TUF</i>	(AC)	
<i>Poli28TUF</i>	(CA)	



5.2. Niveles de diversidad genética

Los análisis de variabilidad genética se realizaron con cinco marcadores microsatélites altamente polimórficos (*Po35*, *Po91*, *Poli9TUF*, *Poli28TUF* y *KOP45*).

5.2.1. Equilibrio Hardy-Weinberg

Luego de realizar el Test exacto de desviación del equilibrio Hardy-Weinberg en las dos poblaciones estudiadas, los valores de *Chi-cuadrado* calculado en los organismos F1 y los organismos silvestres, en todos los *loci* analizados, fueron significativamente diferentes al valor esperado, indicando que ninguna población se encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg.

La Tabla 7 presenta los valores de la prueba *Chi-cuadrado* con sus respectivos grados de libertad (df), y el nivel de probabilidad para cada *locus* en cada población estudiada.

Tabla 7. Resumen de los resultados de *Chi-cuadrado* en los test de equilibrio Hardy-Weinberg, para cada *locus* en cada población estudiada, y el nivel de significancia encontrado.

POBLACIÓN	<i>Locus</i>	DF	ChiSq	Prob	Signif
F1	<i>Po91</i>	325	777.693	0.000	***
	<i>KOP45</i>	231	863.966	0.000	***
	<i>Poli9TUF</i>	55	234.916	0.000	***
	<i>Poli28TUF</i>	36	189.647	0.000	***
	<i>Po35</i>	190	531.882	0.000	***
POBLACIONES SILVESTRES	<i>Po91</i>	820	899.267	0.028	*
	<i>KOP45</i>	595	834.342	0.000	***
	<i>Poli9TUF</i>	171	478.005	0.000	***
	<i>Poli28TUF</i>	595	802.881	0.000	***
	<i>Po35</i>	276	813.120	0.000	***

Df: grados de libertad, ChiSq: Chi-cuadrado, Prob: probabilidad, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

5.2.2. Incidencia de alelos nulos

El análisis de la distribución esperada de homocigotos en cada *loci* (Micro-Checker ver. 2.2.3) sugirió la presencia de alelos nulos en todos los *loci* analizados, en ambas poblaciones. Las frecuencias de alelos nulos encontradas en cada *locus*, se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Frecuencias de alelos nulos encontradas en cada *locus*, y promedios calculados para cada población estudiada.

LOCUS	F1	Promedio	SILVESTRES	Promedio
<i>Po91</i>	0.099		0.091	
<i>KOP45</i>	0.257		0.15	
<i>Poli9TUF</i>	0.271	0.2272	0.33	0.224
<i>Poli28TUF</i>	0.301		0.162	
<i>Po35</i>	0.208		0.387	

5.2.3. Polimorfismo en los *loci* analizados

El polimorfismo de los *loci* analizados se determinó evaluando el número de alelos, el número efectivo de alelos, el número exclusivo de alelos, riqueza alélica y frecuencias alélicas, cuyos resultados se detallan en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Niveles promedio de polimorfismo en los organismos F1 y silvestres, en base al porcentaje de *loci* polimórficos, número de alelos, número efectivo de alelos, y número de alelos exclusivos.

POBLACIÓN	N	% Polimorfismo	Na	Ne	Nex	%Nex/pop
F1	70	100	88	9.16	22	25.00
SILVESTRES	42	100	154*	20.08*	88*	57.14

N° = No. de organismos en cada población, Na = No. De alelos, Nex = No. de *alelos exclusivos*, %Nex/pop = Porcentaje de alelos exclusivos por población; * P<0.05

En la Tabla número 9 se puede observar que los organismos F1 presentan un polimorfismo elevado, con un total de 88 alelos y un número efectivo de 9 alelos. Sin embargo, a pesar de poseer valores altos, son significativamente diferentes a lo encontrado en los organismos silvestres, los cuales poseen un total de 154 alelos y un número efectivo de 20 alelos.

También se presentan el número exclusivo de alelos por cada población, así como el porcentaje que éstos representan del total. En los organismos F1 se registró 22 alelos exclusivos, que representan el 25% de alelos en esta población; mientras que los organismos silvestres presentaron el mayor porcentaje de alelos exclusivos, con un total de 88 alelos, que representan el 57.14% del total de alelos para esta población.

Tabla 10. Análisis del polimorfismo en cada *locus* y población analizada, en base al número de alelos por *locus*, número efectivo de alelos por *locus*, y número de alelos exclusivos por *locus*.

Población	<i>Locus</i>	N	Na	Ne	Nex	%Nex/ <i>locus</i>
F1	<i>Po91</i>	70	26.000	12.694	7	26.92
	<i>KOP45</i>	70	22.000	8.294	5	22.73
	<i>Poli9TUF</i>	70	11.000	5.136	1	9.09
	<i>Poli28TUF</i>	70	9.000	5.343	3	33.33
	<i>Po35</i>	70	20.000	14.161	6	30.00
SILVESTRES	<i>Po91</i>	42	41.000	31.717	22	53.66
	<i>KOP45</i>	42	35.000	24.500	18	51.43
	<i>Poli9TUF</i>	42	19.000	11.514	9	47.37
	<i>Poli28TUF</i>	42	35.000	15.964	29	82.86
	<i>Po35</i>	42	24.000	16.720	10	41.67

En la tabla 10 se puede observar la información obtenida por *locus* analizado. Para los organismos F1 el número de alelos varió entre un mínimo de 9 para el *locus Poli9TUF*, y un máximo de 26 para el *locus Po91*. En los organismos silvestres el número de alelos varió entre un mínimo de 19 para el *locus Poli9TUF*, y un máximo de 41 para el *locus Po91*.

Referente al número de alelos exclusivos, en los organismos F1 el *locus Po91* presentó el número más alto de alelos exclusivos, con un valor de 7 que representa el 26.92% de alelos para este *locus*; mientras que el *locus Poli9TUF* fue el que presentó el menor número de alelos exclusivos, con un valor de 1, el cual representa el 9.09% de alelos para este *locus*. Para los organismos silvestres el *locus Poli28TUF* fue el que presentó el mayor número de alelos exclusivos, con un valor de 29, que representa el 82.86% de los alelos para este *locus*, mientras que el *locus Poli9TUF* fue el que presentó el menor número de alelos exclusivos, con un valor de 9, igual al 47.37% de alelos para este *locus*.

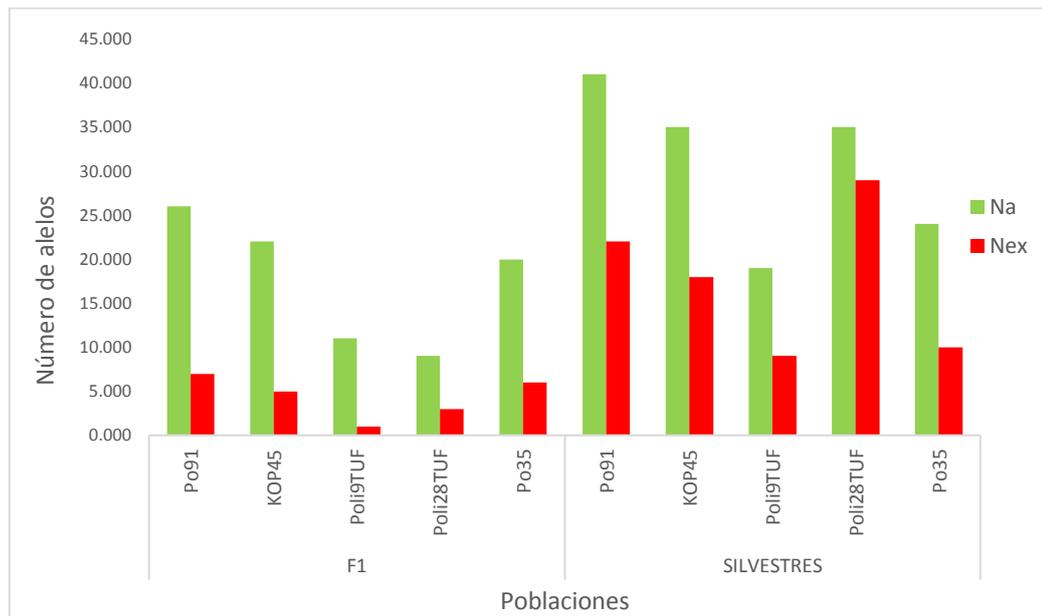


Figura 8. Representación esquemática de la variación entre el número total de alelos y número exclusivo de alelos, en cada *locus* y población estudiada. En esta imagen se puede observar como los organismos F1 se distinguen de los organismos silvestres debido al número elevado de alelos exclusivos en esta última población.

5.2.4. Riqueza alélica

En la Tabla 11 se observa el nivel de riqueza alélica presentado en las dos poblaciones. Los organismos F1 presentaron un nivel de riqueza alélica de 12.527 alelos, y los organismos silvestres presentaron un nivel de riqueza alélica de 22.519 alelos, valor que representa un 44.36% más que lo registrado en los organismos F1.

En términos de riqueza alélica por *locus* analizado, en los organismos F1, los *loci Po91* y *Po35*, fueron los que presentaron los niveles más altos de riqueza alélica, diferente a lo encontrado en los organismos silvestres, en donde los *loci Po91* y *KOP45*, presentaron los niveles más altos de riqueza alélica.

Tabla 11. Niveles de riqueza alélica en cada *locus* analizado, calculado igualando el tamaño de cada población a 42, que corresponde al número más bajo de individuos muestreados.

<i>Locus</i>	Población			
	F1	Promedio	SILVESTRES	Promedio
<i>Po91</i>	16.859		28.850	
<i>KOP45</i>	14.879		25.037	
<i>Poli9TUF</i>	7.928	12.527	15.722	22.519*
<i>Poli28TUF</i>	7.005		23.131	
<i>Po35</i>	15.964		19.854	

* $p \leq 0.05$

5.2.5. Frecuencias alélicas

Se registró un mayor número de alelos en frecuencias inferiores a 0.10 [considerados como alelos raros (Thomson *et al.*, 2008)] en los organismos silvestres, con un 97.44% de alelos en frecuencias inferiores a 0.10; mientras que en los organismos F1 presentaron un 15.82% menos, con un 82.02% de alelos en las mismas frecuencias (Figura 9).

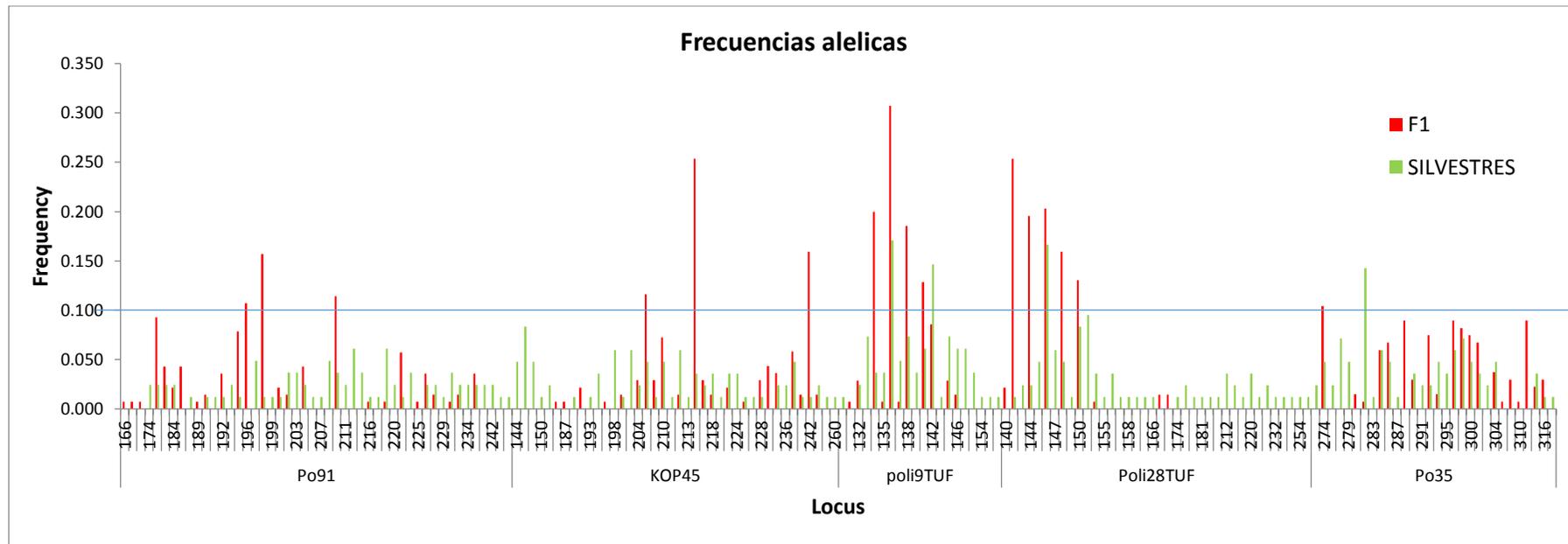
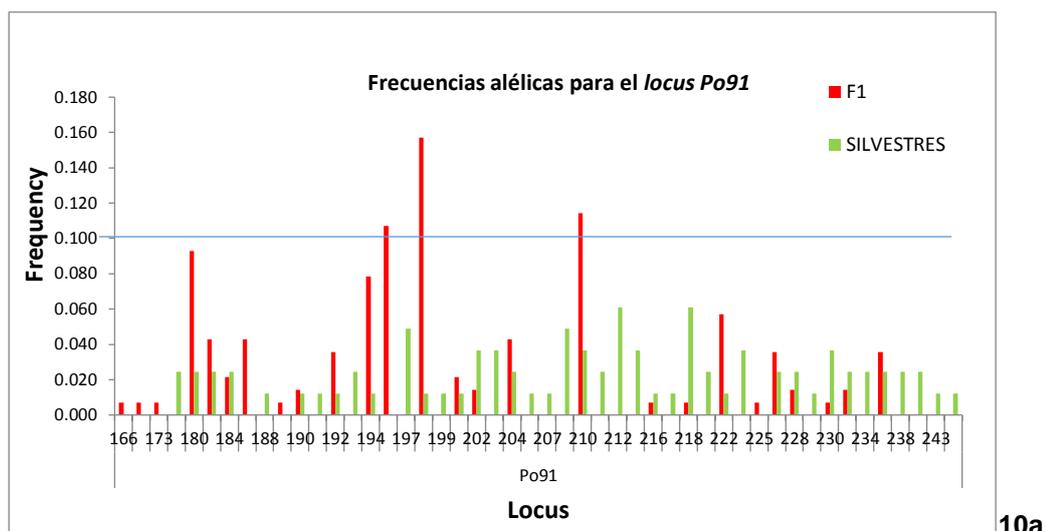
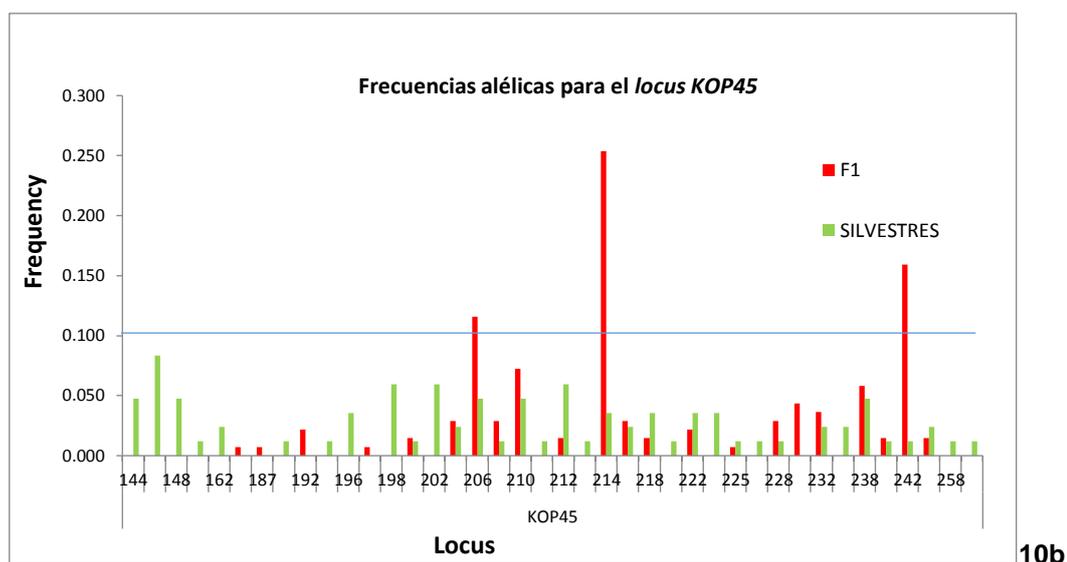


Figura 9. Espectro de variación de las frecuencias alélicas en los cinco *loci* y poblaciones analizadas, las figuras enfrentan las frecuencias encontradas en ambas poblaciones para el mismo *locus*. Para una mejor apreciación se colocó una línea horizontal para diferenciar las frecuencias alélicas superiores e inferiores de 0.10.

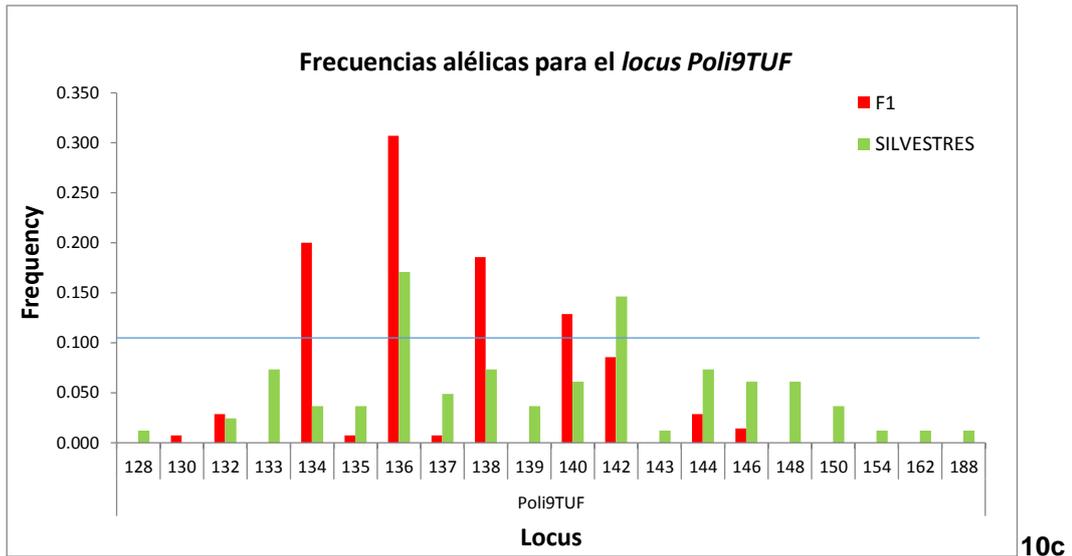
En las Figuras 10 a, b, c, d y e, se muestran las frecuencias alélicas observadas por *locus* analizado, las figuras enfrentan las frecuencias encontradas en ambas poblaciones para el mismo *locus*.



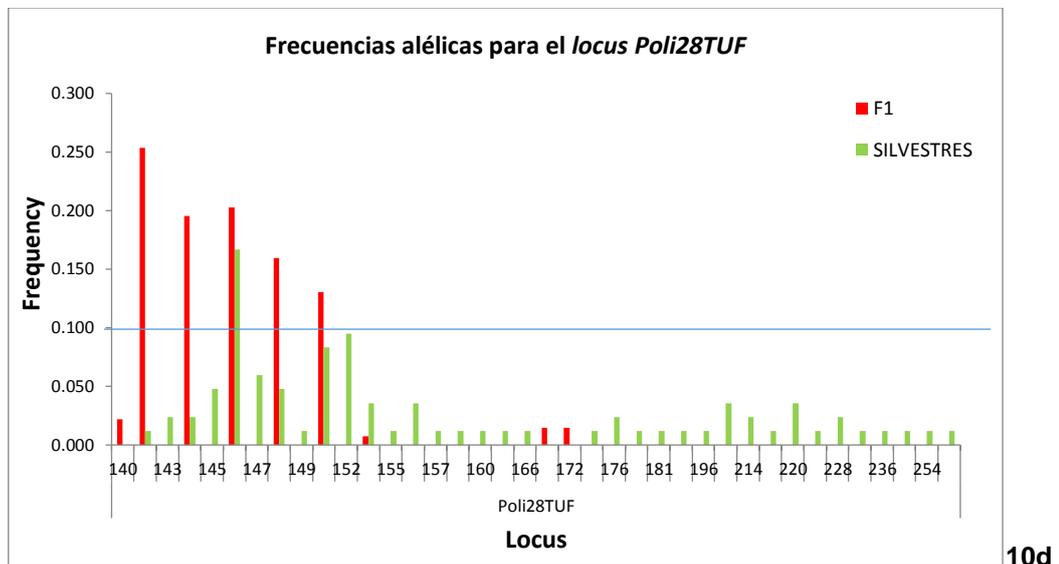
En la Figura 10a se observan las variaciones en los niveles de frecuencia alélica para el *locus Po91*. Para este *locus* ambas poblaciones presentan frecuencias alélicas similares.



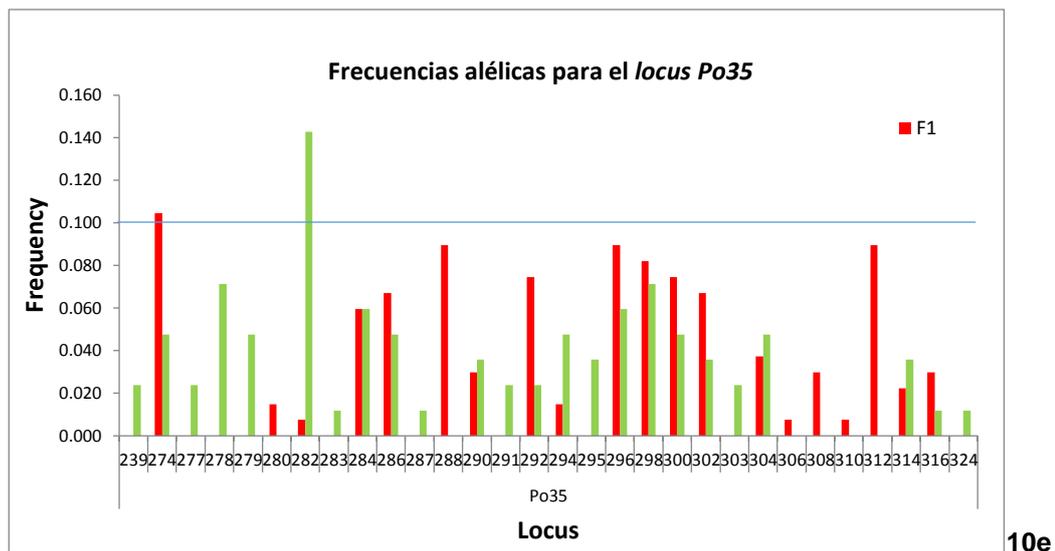
En la Figura 10b se observan las variaciones en los niveles de frecuencia alélica para el *locus KOP45*. En este *locus* las frecuencias alélicas tienen comportamientos diferentes, debido principalmente, a la presencia de alelos exclusivos en los organismos silvestres.



En la Figura 10c se observan las variaciones en los niveles de frecuencia alélica para el locus *Poli9TUF*. En este locus las frecuencias alélicas son similares en ambas poblaciones.



En la Figura 10d se observan las variaciones en los niveles de frecuencia alélica para el locus *Poli28TUF*. En este locus las frecuencias alélicas tienen comportamientos diferentes; y similar a los presentado en el locus *KOP45*, estas diferencias se deben a la presencia de alelos exclusivos en cada población, principalmente en los organismos silvestres.



En la Figura 10e se observan las variaciones en los niveles de frecuencia alélica para el locus *Po35*, para este locus las frecuencias alélicas son similares; sin embargo a diferencia de lo presentado en los loci anteriores, casi la totalidad de los alelos se encuentran en frecuencias por debajo de 0.10.

Figura 10 (a-e). Espectro de variación de las frecuencias alélicas por locus en las dos poblaciones analizadas, las figuras enfrentan las frecuencias encontradas en ambas poblaciones para el mismo locus. Para una mejor apreciación se colocó una línea horizontal para diferenciar las frecuencias alélicas superiores e inferiores de 0.10.

5.2.6. Niveles de heterocigosidad en cada población

Los valores obtenidos para el parámetro de heterocigosidad se detallan en la Figura 11.

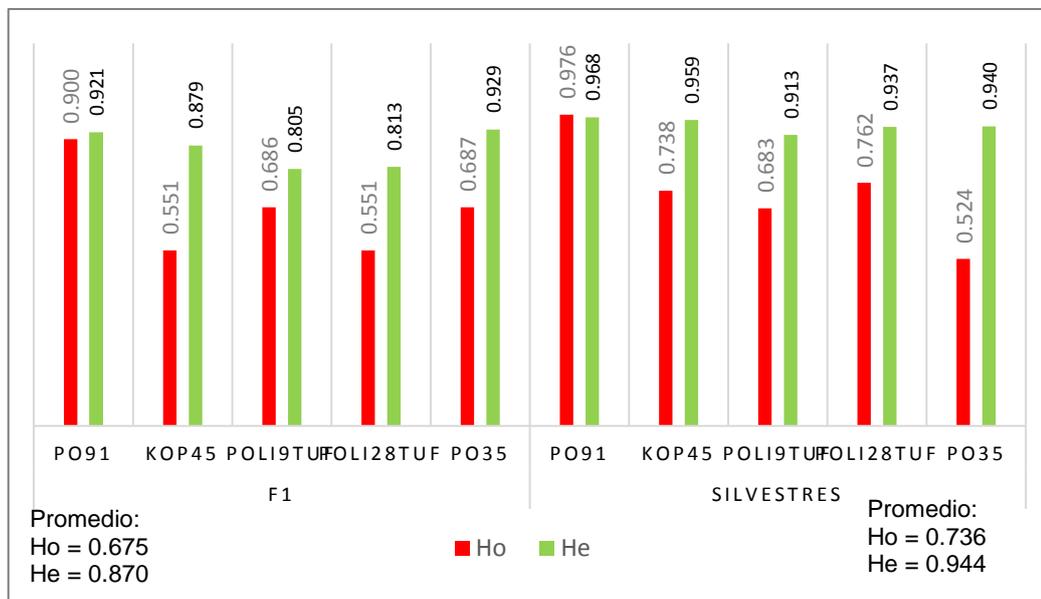


Figura 11. Representación esquemática de los niveles de variación en heterocigosidad (heterocigosidad observada y esperada) por *locus* analizado, y los promedios obtenidos para cada población.

Como se puede apreciar en la Figura 11, las dos poblaciones presentaron niveles elevados de heterocigosidad esperada. Los organismos F1 presentaron un valor promedio de 0.870, mientras que los organismos silvestres presentaron un valor promedio de 0.944. De manera opuesta, los valores de heterocigosidad observada difirieron en un rango más amplio, siendo los organismos silvestres los que presentaron el valor más elevado, de 0.736, seguido por los organismos F1, con un valor de 0.675. Porcentualmente, los organismos F1 silvestres presentaron un 8.29% menos de heterocigosidad observada, en relación al valor observado en los organismos silvestres.

Por *locus*, en los organismos F1 los valores de heterocigosidad observada variaron entre 0.551 y 0.90 para los *loci* *KOP45*, *Poli28TUF* y *Po91* respectivamente, siendo solo el *locus Po91*, el que presentó valores homogéneos entre la heterocigosidad esperada y heterocigosidad observada, con valores de $H_o/H_e = 0.900/0.921$.

Para los organismos silvestres, los valores de heterocigosidad observada fueron cercanos a su respectivo valor de heterocigosidad esperada; los valores variaron entre 0.524 y 0.976 para los *loci Po35* y *Po91* respectivamente, siendo solo los *loci*

Poli9TUF y *Po35* los que presentaron la mayor desviación entre estos valores, con valores H_d/H_e de 0.683/0.913 y 0.524/0.940 respectivamente.

5.2.7. Promedios para los índices de diversidad genética en cada población

En la Figura 12 se representan los valores promedios para los índices de diversidad genética. Se puede observar la tendencia que presentan los organismos silvestres, en relación a los organismos F1, en presentar los valores más elevados para cada índice, aún, teniendo un número más bajo de individuos muestreados.

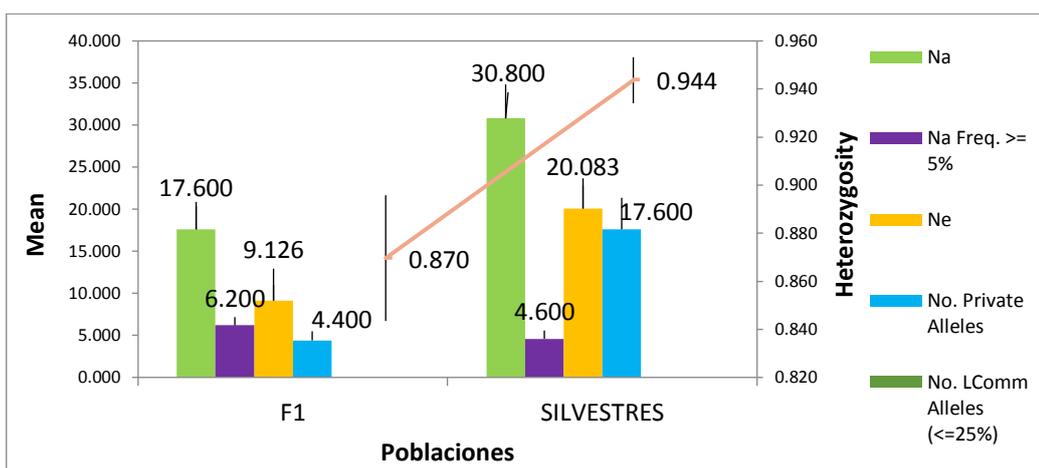


Figura 12. Ilustración de los valores promedio de los índices de diversidad genética encontrados en cada población estudiada.

5.2.8. Análisis de relación genética.

Coefficiente de Relación r

La figura 13 muestra la distribución de los valores del coeficiente r_{xy} , calculados para determinar la relación genética entre todas las parejas posibles, dentro de las dos poblaciones estudiadas. Los valores promedios del coeficiente r_{xy} en las dos poblaciones indicaron que las parejas formadas se encontraban en su mayoría en la categoría sin relación genética (ver Tabla 5), con un valor promedio para el coeficiente de relación genética r_{xy} de 0.008 ± -0.004 en la población de reproductores F1; y de -0.001 ± -0.004 en la población de organismos silvestres.

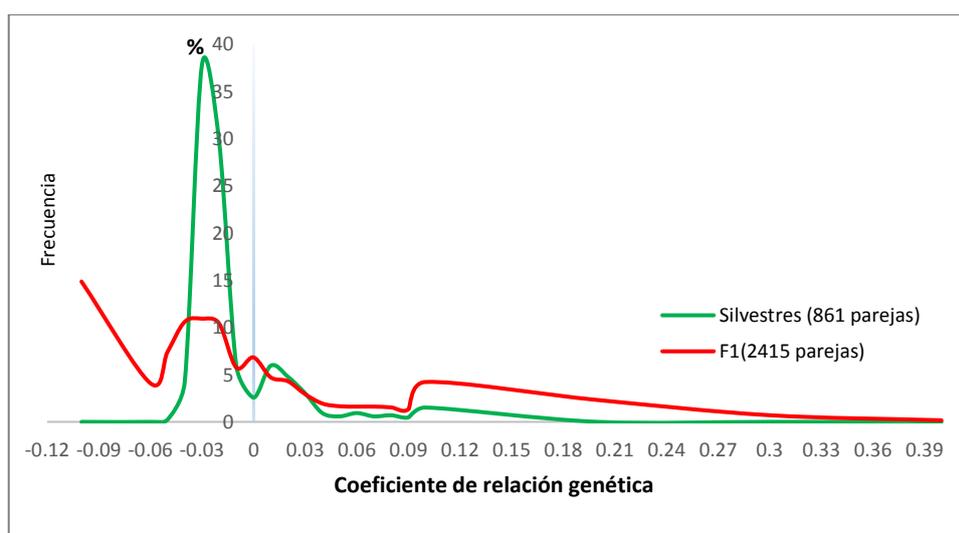


Figura 13. Distribución de los valores del coeficiente de relación genética r_{xy} estimado para cada población individual, así como el número de parejas formadas en cada población.

Por otro lado, la distribución de los valores promedios del coeficiente r_{xy} calculados en cada una de las tres categorías de relación genética dentro de cada población fue la siguiente:

En la población de reproductores F1, el 86.50% de las parejas formadas pertenecían a la categoría sin relación genética (2089 parejas), con un valor promedio del coeficiente r_{xy} de 0.003 ± 0.051 ; el 12.59% pertenecían a la categoría medios hermanos (304 parejas), con un valor r_{xy} de 0.130 ± 0.061 ; mientras que solo el 0.91% de las parejas formadas pertenecían a la categoría hermanos completos (22 parejas), con un valor r_{xy} de 0.300 ± 0.067 (Figura 14). La Tabla 12 y Anexo I muestran el grado de relación genética entre cada pareja de individuos evaluados dentro de la población de reproductores F1.

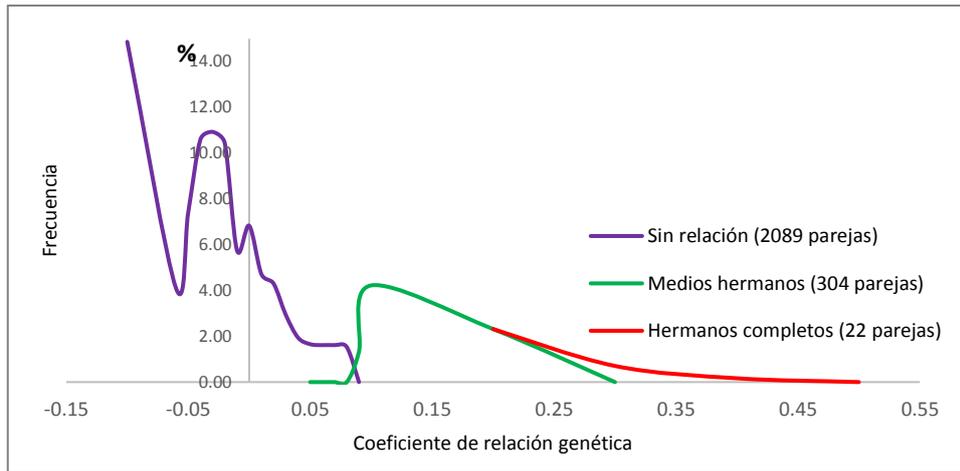


Figura 14. Distribución de los valores del coeficiente de relación genética r_{xy} en las tres categorías de relación genética, en la población de reproductores F1: organismos sin relación, medios hermanos, y hermanos completos.

En los organismos silvestres, el 97.56% de las parejas formadas pertenecían a la categoría sin relación genética (840 parejas), con un valor promedio del coeficiente r_{xy} de 0.010 ± 0.039 ; mientras que el 2.44% de las parejas restantes pertenecían a la categoría medios hermanos (21 parejas), con un valor promedio del coeficiente r_{xy} de 0.090 ± 0.010 ; no encontrándose ninguna pareja en la categoría hermanos completos (Figura 15).

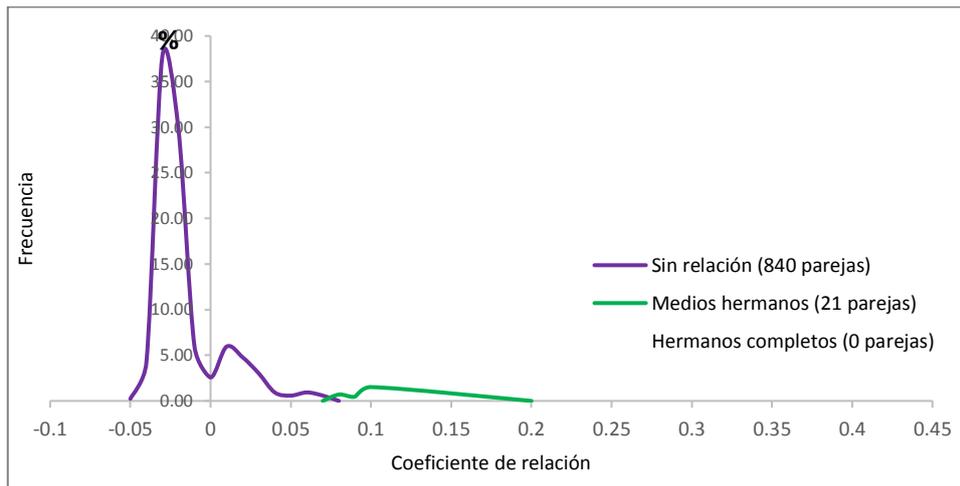


Figura 15. Distribución de los valores del coeficiente de relación genética r_{xy} en las tres categorías de relación genética, en la población de organismos silvestres: sin relación, medios hermanos, y hermanos completos.

Tabla 12. Principales parejas formadas en el análisis de parentesco dentro de la población de reproductores F1, indicando el grado de relación genética entre individuos: organismos no relacionados (U), medios hermanos (HS) y hermanos completos (FS). Solo se muestra los resultados para los cruces entre hembras (H) y machos (M).

Género	M	M	M	H	M	M	M	H	M	H	M	M	H	M	M	H	M	H	M	M	H	M	M	H	M	H	M	
Microchip	88	77	55	12	43	97	94	59	78	34	14	75	28	25	3	45	98	96	19	68	51	44	90	86	9	33	71	19
M	94			U				U		U			U			HS		U			U				U		U	
H	59	HS	U	U	HS	HS	FS		U		U	U		U	U		U		U	U		U	U	U		U	U	
M	81			U				FS		U			U			U		U			U				U		U	
M	77			U				U		U			U			U		U			U				U		U	
M	64			U				HS		U			U			U		U			U				U		U	
H	9	FS	U	U		U	U	U		U		U	U		FS	HS		U		U	U		U	U	U		U	U
H	66	HS	U	U		U	U	U		U		U	U		U	U		U		U	U		U	U	U		U	U
H	12	U	HS	HS		U	U	U		U		U	U		U	U		U		U	U		U	U	U		U	U
M	97			U				U		U			U			U		U			U				U		U	
H	34	U	FS	U		U	U	HS		U		U	U		U	U		U		U	U		U	U	U		U	U
M	97			FS				U		U			U			U		U			U				U		U	
M	80			HS				U		U			U			U		U			U				U		U	
M	44			FS				U		U			U			U		U			U				U		U	
M	91			HS				U		U			U			U		U			U				U		U	
M	19			HS				U		U			U			U		U			U				U		U	
H	52	U	U	U		U	U	U		U		U	HS		FS	U		U		U	HS		U	U	FS		FS	U
M	14			U				U		U			U			U		FS			U				U		U	
H	96	U	U	U		FS	FS	FS		U		U	U		U	U		U		U	U		U	U	U		FS	FS
H	34	U	U	U		U	FS	U		HS		HS	HS		U	U		U		FS	U		U	U	U		U	U
M	78			U				FS		U			U			U		HS			U				U		U	
M	14			U				HS		U			U			U		U			U				U		U	
M	7			U				HS		U			U			U		U			U				U		U	
M	90			U				HS		U			U			FS		U			U				HS		U	
M	32			U				U		U			HS			U		U			U				U		U	
H	29	U	U	U		U	U	U		U		U	U		FS	U		U		U	U		U	U	U		U	U
H	52	U	U	U		U	U	U		U		U	U		U	U		HS		U	U		U	U	U		U	U
H	89	U	U	U		U	U	U		U		U	U		U	U		U		HS		U	U	U		U	U	
H	96	U	U	U		U	U	U		U		U	HS		U	U		U		U	U		U	U	U		U	U
M	17			U				U		U			U			HS		U			FS				U		U	
M	49			U				U		U			U			HS		U			FS				U		U	
M	63			U				U		U			U			U		U			FS				U		U	
H	1	U	U	U		U	U	U		U		U	U		U	U		U		U	U		HS	HS	HS		U	U
M	21			U				U		U			U			U		U			U				U		HS	
M	56			U				U		U			U			U		U			U				U		HS	
H	45	U	U	U		U	U	U		U		U	U		U	U		U		U	U		U	U	U		U	HS
H	51	U	U	U		U	U	U		U		U	U		U	U		U		U	U		U	U	U		U	HS

La tabla completa para todas las parejas posibles se puede observar en el Anexo I.

5.2.9. Estadísticos - F

El índice de fijación (F_{ST}) presentó un valor de 0,024 ($P > 0.001$), indicando que solo alrededor de un 2.4% de las diferencias genéticas observadas se deberían a variación interpoblacional, por lo que un 97.6% de la varianza en las frecuencias alélicas se deberían a la variación genética intrapoblacional.

Referente al valor del coeficiente general de consanguinidad F_{IT} , presentó un valor de 0.241, indicando que la homocigosis fue un 24.1% mayor a lo que se esperaría en una población ideal, con reproducción panmíctica, y con las mismas frecuencias alélicas. De manera similar, el índice de endogamia (o F_{IS}) presentó un valor positivo, indicando una deficiencia de heterocigotos en las dos poblaciones, diferente a lo que se esperaría en poblaciones con apareamiento al azar dado las frecuencias alélicas de cada población (Tabla 13).

Finalmente, ningún valor en los estadísticos-F, mostraron diferencias significativas entre las poblaciones silvestres y la población del hatchery ($P \geq 0.001$), indicando que las dos poblaciones eran genéticamente similares.

Tabla 13. Valores promedios para F_{ST} , F_{ST} máximo y F_{IT} , calculados entre ambas poblaciones así como el nivel de significancia encontrado.

F-estadísticos	Valor	P(rand \geq data)
F_{ST}	0.024	0.001
F_{IT}	0.241	0.001
F_{IS}	0.059	0.001

Probabilidad, P (rand \geq data), para F_{ST} , F_{IS} y F_{IT} se basa en la permutación de serie en toda la serie completa de datos.

5.2.10. Análisis molecular de varianza (AMOVA)

La Tabla 14 presenta los resultados del AMOVA, en base a la entrada binaria como matriz de distancia para el cálculo de PhiPT (una medida que facilita la comparación entre dos codominantes). El valor de las distancias genéticas para PhiPT (por parejas) fue de 0.029, indicando que la mayoría de diversidad genética se encontraba dentro de las poblaciones (97%), mientras que la variabilidad entre poblaciones fue de solo un 3% (Figura 16). Estos valores indican que las poblaciones eran estadísticamente similares ($P > 0.001$) respecto a los niveles de diversidad genética observada, concordando con los valores de los F- estadísticos descritos anteriormente.

Se presenta también el nivel de significancia para el cálculo de PhiPT, el cual demuestra que no existen diferencias significativas en los niveles de diversidad genética entre la población silvestre y la población del hatchery [$P \geq 0.001$] (Tabla 14).

Tabla 14. Resumen del análisis molecular de varianza (AMOVA), enfrentando los niveles de variación interpoblacional e intrapoblacional, entre los organismos F1 y silvestres.

	df	SS	MS	Est. Var.	%
Entre poblaciones	1	6.050	6.050	0.071	3%
Dentro de las poblaciones	110	257.486	2.341	2.341	97%
Total	111	236.536		2.411	100%

df: grados de libertad, SS suma de cuadrados dentro de los grupos, MS la media de cuadrados dentro de los grupos.

Tabla 15. Nivel de significancia en base a la entrada binaria como matriz de distancia para el cálculo de PhiPT.

	Value	P(rand \geq data)
PhiPT	0.029	0.001
PhiPT max	0.057	
Phi'PT	0.517	

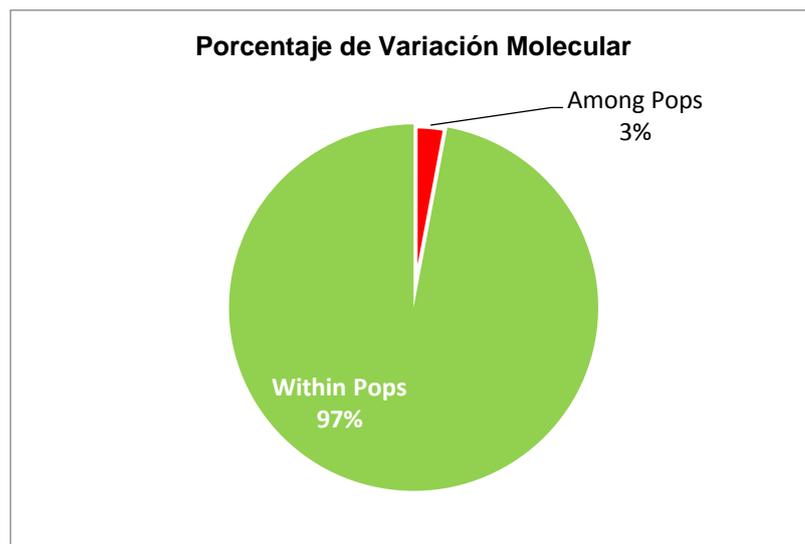


Figura 16. Porcentaje de variancia molecular entre la población silvestre y del Hatchery, y porcentaje de variación dentro de las dos poblaciones estudiadas.

La Figura 16 muestra el porcentaje de variación entre las dos poblaciones, las cuales solo presentan un porcentaje de variación del 3%, mientras que el 97% de variación restante, se encuentra distribuido dentro de las poblaciones.

6. DISCUSIÓN

Como una alternativa a la aproximación del desarrollo de marcadores de *novo*, se han desarrollado trabajos específicos dedicados solo al análisis de amplificación cruzada. En este estudio, el 71.43% de amplificación positiva observado en las dos poblaciones estudiadas fue similar al reportado entre familias del orden pleuronectiformes. En este orden, Shao *et al.* (2009) encontraron a partir de *loci* microsatélites desarrollados para *P. dentatus*, porcentajes elevados de transferibilidad entre especies dentro del mismo género, entre un 75, 100 y 83% de transferibilidad para *P. olivaceus*, *P. lethostigma* y *Scophthalmus maximus*, respectivamente. Asimismo, Ding *et al.* (2009) encontraron un 90% de transferibilidad desde *loci* microsatélites de *H. hippoglossus* en cinco especies relacionadas. Los resultados demuestran el alto nivel de conservación de las secuencias nucleotídicas en las regiones flanqueantes de los *loci* microsatélites entre especies filogenéticamente cercanas, y por lo tanto, su aplicación en el establecimiento de estrategias moleculares.

Asimismo, diversos trabajos han demostrado también la aplicación de marcadores microsatélites entre diferentes géneros. Por ejemplo, Zhao *et al.* (2009) evaluaron el grado de amplificación cruzada de *loci* microsatélites de *Epinephelus awoara* en *E. septemfasciatus* y *Centropristis striat*; Ma *et al.* (2011) seleccionaron 244 marcadores microsatélites polimórficos para *Verasper moseri* y *V. variatigus* a partir de 182 marcadores de *H. hippoglossus* y 62 marcadores de *P. olivaceus*; mientras que Cuveliers *et al.* (2012) y Díaz *et al.* (2012) utilizaron *loci* microsatélites de *Solea senegalensis* en *S. solea*. Estos trabajos, junto con los mencionados en el párrafo anterior, no solo demostraron que los microsatélites pueden utilizarse entre diferentes especies, también demostraron que los *loci* evaluados mediante amplificación cruzada, pueden revelar casi el mismo nivel de polimorfismo que el observado en la especie para la que originalmente fueron desarrollados.

En este estudio, de los diez marcadores con amplificación positiva, cinco se utilizaron en los análisis de diversidad genética, encontrándose que todos son altamente polimórficos (Tabla 9 y 10), coincidiendo con los resultados obtenidos con los mismos *loci*, en análisis de diversidad genética para la especie *Paralichthys olivaceus*, a partir del cual fueron obtenidos. Por ejemplo, Sekino & Hara (2001) y Sekino & Hara (2000) encontraron que los *loci* *Po35* y *Po91* albergaban más de 20 alelos, y Kim *et al.* (2009) encontró que el *locus* *KOP45* albergaba un promedio de 24 alelos. Resultados similares al número de alelos encontrado en las dos poblaciones estudiadas. Por otro lado, para los *loci* *Poli9TUF* y *Poli28TUF*, Coimbra (2001) reporta un número de alelos de 26, resultados que sólo son similares a lo encontrado en la población de organismos silvestres, lo que podría indicar una reducción de alelos en la población de reproductores F1 de cultivo.

Si bien el desconocimiento del origen de los organismos de cultivo F1 hace imposible valorar con exactitud la magnitud de una reducción de la variabilidad genética respecto a su población de origen, a partir de estos resultados se puede inferir que después de un proceso de reproducción y selección artificial, se produce una disminución de la variabilidad genética, en términos del número de alelos en la primera generación de organismos manejados en cautividad (Tabla 8). Esta asunción es respaldada por la tasa de pérdida de alelos encontrada en la primera generación de poblaciones de cultivo de *Salmo salar*, en donde Verspoor (1998) encontró un 12% menos de alelos que el hallado en la población silvestre; y donde Koljonen *et al.* (2002) encontraron una tasa de pérdida de alelos de un 4,7% por generación.

Por otro lado, el test exacto de desviación del Equilibrio Hardy Weinberg (EHW), que arrojó p-valores significativos (Tabla 7), indicó que el número total de marcadores en ambas poblaciones se encontraban en desequilibrio genético. En la población, F1 la desviación del EHW es consistente con lo indicado por Thingsgard (2001), quien señala que es poco probable que poblaciones sometidas a selección se encuentren en equilibrio. Asimismo, estos resultados son similares a lo encontrado en poblaciones de cultivo de *P. olivaceus* (Sekino *et al.*, 2002a) y *Cyprinus carpio* (Dayu *et al.*, 2007; Hulak *et al.*, 2010), donde un apareamiento selectivo positivo (entre los mismos genotipos o fenotipos similares) puede explicar parcialmente el desequilibrio observado. Diversos autores señalan también a factores como la endogamia, o la utilización de un bajo número de reproductores, como las posibles causas de la falta de equilibrio que puede atribuirse a la población en estudio (Barahona, 2014; Hulak *et al.*, 2010; Caldero *et al.*, 2009; Sekino & Hara, 2001).

Referente a la desviación del equilibrio Hardy Weinberg en la población silvestre, debido a que es una población natural, el desequilibrio genético encontrado puede ser el resultado de apareamiento fenotípico selectivo, procesos ecológicos, alelos nulos, o una mezcla física de poblaciones con diferentes frecuencias alélicas (efecto Wahlund) (Sahyoun *et al.*, 2016; Karlsson & Mork, 2005). Dentro de estas asunciones, la hipótesis de una posible endogamia puede ser descartada, debido a que la endogamia debe mostrar un déficit de heterocigotos a través de todos los *loci* polimórficos, un patrón no encontrado en este estudio (Figura 11) (Sahyoun *et al.*, 2016).

Además, en una posible endogamia la población tendría que haber pasado por una reducción en el tamaño efectivo de la población al punto que la endogamia se haya vuelto significativa, caso improbable, a menos que pueda demostrarse que hubo un fuerte apareamiento selectivo (Horau *et al.*, 2002). En una segunda hipótesis, en un proceso ecológico, tendrían que existir poblaciones grandes que estuvieron históricamente en contacto y que actualmente se encuentran aisladas, las cuales estarían fijadas para distintos alelos en el equilibrio, pero el tiempo requerido para aproximarse a ese equilibrio podría ser mayor a la edad de la mayoría de estos organismos. Esto

también podría ocurrir si los sitios muestreados han sido recientemente colonizados y por lo tanto las poblaciones todavía no estarían en equilibrio (Eguiarte, 2007).

En una siguiente explicación para el desequilibrio genético encontrado, la presencia de alelos nulos sería una de las causas más probables. Aunque estos resultados son contrarios a los estudios previos realizados con los mismo *loci* en la especie *P. olivaceus*, en donde estos *loci* no mostraron deficiencia de heterocigotos (por el contrario, mostraron un nivel de heterocigosidad moderadamente alto, entre 0.76 – 0.95; Sekino & Hara, 2000, Sekino & Hara, 2001; Coimbra *et al.*, 2001); las frecuencias de alelos nulos encontradas en este estudio, superiores a 0.2 (Tabla 8), pudieron causar probabilidades de exclusión mucho más altas que las verdaderas estimaciones (sin la presencia de alelos nulos), obteniendo como resultado un genotipo aparentemente incompatible con la clásica herencia mendeliana (Dakin & Avise, 2004; Glaubitz *et al.*, 2001; Callen *et al.*, 1993).

A pesar de que los resultados sugieren la presencia de alelos nulos, es poco probable pensar que los alelos nulos son la única causa de la desviación del equilibrio Hardy Weinberg en la población silvestre (Ruzzante *et al.*, 1996). Sin embargo, al no contar con el tamaño de muestra adecuado, no se pueden realizar conclusiones o inferencias acerca de la existencia de otras posibles causas, como un posible efecto Wahlund en la población de organismos silvestres estudiada, debido a que se requiere un mínimo de 25 organismos por población silvestre estudiada (Vila Vila, Morro Sama, Gramita y Culebras) para obtener la mayoría de alelos informativos a frecuencias que reflejen los de la población total, y realizar conclusiones en cada población silvestre estudiada (Hale *et al.*, 2012).

Coincidente con la falta de EHW en ambas poblaciones, en relación al nivel de heterocigosidad, las poblaciones estudiadas presentaron niveles moderados sin variaciones significativas (Figura 11), los cuales, contrario a los resultados de polimorfismo, mostraron una conservación de la variabilidad genética en términos de heterocigosidad en la primera generación de *P. adspersus*. Este resultado es similar al reportado por Norris *et al.* (1999) y Coughlan *et al.* (1998), quienes a pesar de encontrar una disminución significativa de la variabilidad genética en términos de diversidad alélica, en una población de cultivo de *Salmo salar* y *Scophthalmus maximus*, respectivamente, no encontraron una disminución significativa en términos de heterocigosidad. Es importante resaltar también, que aunque los resultados de este estudio no difirieron significativamente, se pudo observar que la población F1 presentaba un 8.29% menos de heterocigosidad observada que lo encontrado en los organismos silvestres.

Este valor menor de heterocigosidad en la población de cultivo debe tomarse en cuenta, debido a que puede significar una reducción en los niveles de diversidad genética, dado que este parámetro es interpretado como sinónimo de diversidad, y es el resultado de respuestas inmediatas a la selección (Neel & Ellstrand, 2003). Una disminución en los valores de

heterocigosidad ha sido atribuido principalmente a un efecto fundador durante el proceso de domesticación, en donde un stock reproductor solo está representado por pocos individuos tomados de la naturaleza (Wang *et al.*, 2012). Ejemplos de una disminución en los niveles de heterocigosidad en poblaciones cultivadas son los resultados obtenidos por Loukovitis *et al.* (2015), quienes encontraron un 19.05% menos de H_o en poblaciones de *Dicentrarchus labrax*; asimismo, Sekino *et al.* (2002a, b) observaron reducciones de H_o de un 21% en las poblaciones de cultivo de *P. olivaceus*.

Estos resultados coinciden con lo descrito por Pinsky & Palumbi (2014), quienes indican que las poblaciones de peces sometidos a cultivo poseen aproximadamente un 2% menos de heterocigosidad observada. Igualmente, Reed & Frankham (2003) y Sekino *et al.* (2002a) señalan que los organismos de cultivo llegan con una tasa de pérdida de heterocigotos de $1/2Ne$ por generación, que corresponde a una tasa de pérdida de heterocigotos promedio de un 1.4% por generación (Koljonen *et al.*, 2002). Los F-estadísticos F_{IT} y F_{IS} , también reflejaron un leve aumento en el nivel de homocigosis. Para el coeficiente general de consanguinidad (F_{IT}), ambas poblaciones presentaron en promedio un 24.1% más de homocigotos que lo que se esperaría, si las poblaciones estuvieran en equilibrio genético.

Estos valores, en conjunto con el valor del índice de endogamia (Tabla 13), indicaron un aumento en la homocigosis total, que para la población de cultivo puede significar una baja tasa de recombinación eficaz entre sitios polimórficos (Charlesworth & Wright, 2001); mientras que para las poblaciones silvestres, estos valores se deberían a la presencia de alelos nulos en frecuencias superiores a 0.20 (mencionado en párrafos anteriores). No obstante, los valores de heterocigosidad tienen la desventaja de ser relativamente insensibles al número real de diferentes genotipos por *locus*, y a los cambios genéticos sustanciales que pueden ocurrir en las poblaciones cultivadas dentro de las primeras generaciones de cultivo; lo que podría conducir a desviaciones en las conclusiones generales de diversidad (Greenbaum *et al.*, 2014; Hedgecock & Sly, 1990; Allendorf, 1986).

Por esta razón, la riqueza alélica es uno de los parámetros complementarios en los análisis de diversidad genética, y uno de los mejores predictores de diversidad y adaptación a largo plazo (Caballero & García, 2013); siendo el parámetro más sensible a eventos fundadores seguido por expansiones poblacionales, debido a que no tiene en cuenta la frecuencia de cada alelo, sólo su presencia (Allendorf *et al.*, 2014; Greenbaum *et al.*, 2014; Hundertmark & Van Daele, 2010). Así entonces, la disminución significativa en términos de riqueza alélica observada en la población F1 (Tabla 11) puede atribuirse a un leve efecto fundador en los padres de los organismos F1 evaluados (Greenbaum *et al.*, 2014; Xiao, 2009; Hindara *et al.*, 2006), demostrando la importancia de este parámetro para detectar pequeñas variaciones de diversidad genética, en comparación con los resultados obtenidos con los niveles de heterocigosidad.

La disminución en los niveles de riqueza alélica presentada en la primera generación de *P. adspersus* es de especial consideración, debido a que podría indicar una reducción en las características de adaptabilidad futura, considerada como una de las más importantes, dada la continua necesidad de adaptación de las especies (Pinsky & Palumbi, 2014). Una reducción en las características de adaptabilidad se explica, debido a que los parámetros utilizados en este estudio (que miden heredabilidades, heterocigosidad, y el tamaño de la población) son capaces de explicar entre un 15 y 20% de la variación relacionada con características de adaptabilidad (Reed & Frankham, 2003). Así, una reducción en los parámetros evaluados, conllevaría a una reducción en las características de adaptabilidad, las cuales normalmente, son el resultado de niveles elevados de endogamia y deriva genética (Pekkala *et al.*, 2014).

Respecto al parámetro de frecuencias alélicas, éste debe tomarse en cuenta, debido a que la magnitud de la reducción de la variabilidad depende de la frecuencia inicial de los alelos (Innan & Kim, 2004). Dentro de este parámetro, la determinación de pérdida de alelos raros también es importante, debido a que la extinción total de cualquier alelo es considerada más nociva que una reducción general de la heterocigosidad, cuyos valores pueden cambiarse rápidamente, ya sea por selección o deriva genética, mientras que la pérdida completa de un alelo representa una pérdida permanente (Evans *et al.*, 2004; Vuorinen, 1984; Fred & *et al.*, 1980). En este estudio, la dispersión de las frecuencias alélicas coincidió con las frecuencias alélicas esperadas (las dispersiones en forma de L), que consisten en la presencia de muchos alelos raros y pocos alelos comunes [Figura 9] (Greenbaum *et al.*, 2014; Ewens, 1972; Thomson *et al.*, 2008).

En este estudio, el 15.82% menos de alelos raros en la población F1, en comparación con lo encontrado en los organismos silvestres, puede ser causa de un leve efecto fundador en los padres de los organismos F1 evaluados, debido a que los alelos raros son los más susceptibles a la pérdida después de este evento; respaldando los resultados encontrados con el parámetro de riqueza alélica (Evans *et al.* 2004; Norris *et al.*, 1999; Allendorf, 1986). Ejemplos de la pérdida de alelos raros en poblaciones de cultivo, son los trabajos realizados por Alarcón *et al.* (2004) y Wang *et al.* (2007), en donde la pérdida de alelos raros sin una reducción notable en la heterocigosidad, es un indicativo de un efecto fundador. En las poblaciones de cultivo, la pérdida de alelos raros puede producir un daño irreversible en el pool genético de la población, previniendo futuras mejoras vía selección (Zeinab *et al.*, 2014, Tave 1999)

Referente a la estructuración genética de las poblaciones, para evaluar este parámetro, Wright en 1951, introdujo el índice de fijación (F_{ST}) como uno de tres parámetros interrelacionados para describir la estructuración genética en organismos diploides. Así, si el valor del índice de fijación es pequeño, significa que las frecuencias alélicas dentro de cada población son similares (Holsinger & Weir, 2009). En este estudio, el valor del índice de fijación, de 0.024, y el valor de las distancias genéticas para PhiPT de 0.029, indicaron que las poblaciones se encontraban

moderadamente diferenciadas, y que la mayoría de la diversidad genética se encontraría dentro de las poblaciones (Hartl & Clark, 2007).

Valores cercanos a los resultados de F_{ST} encontrados, son similares principalmente a los resultados de comparaciones entre dos poblaciones silvestres, hecho que muestra una conservación de la diversidad genética en la primera generación de *P. adspersus*. Por ejemplo, An *et al.* (2011) y Liu *et al.* (2010) encontraron valores de F_{ST} entre 0.0083 y 0.013, respectivamente, cuando realizaron comparaciones entre poblaciones silvestres con un elevado flujo génico; mientras que Coughlan *et al.* (1998) encontraron un F_{ST} no significativo de 0.024, entre poblaciones silvestres y de cultivo de *Scophthalmus maximus*, debido a que la población de cultivo y silvestre poseían niveles moderados de heterocigosidad observada (>0.66); valores de heterocigosidad similares a los resultados de Horau *et al.* (2002) en la platija (*Pleuronectes platessa*) y a lo encontrado en las poblaciones de este estudio (Figura 11).

Para explicar estos resultados, Tang *et al.* (2013) mencionan que una similitud entre una población de cultivo respecto a una población silvestre, se debería al número grande de individuos evaluados que constituye la población base en el centro de cultivo. Este hecho es importante, debido a que ayudará en el futuro a evitar un aumento en el coeficiente de endogamia en las generaciones subsiguientes. Asimismo, esta similitud genética reafirma el grado de conservación de variabilidad genética en la primera generación de *P. adspersus*, inferida con los resultados de heterocigosidad; constituyéndose, en un lote de reproductores eficiente para la producción de las futuras generaciones de *P. adspersus*. Además, juntos, estos resultados hacen inferir que si bien después de una primera generación de organismos se produce una considerable pérdida de diversidad alélica, también es posible mantener un nivel de heterocigosidad cercano al valor inicial.

A pesar de que estos resultados son alentadores, es importante tener en cuenta que existe una correlación negativa entre la variabilidad de los *loci* microsatélite y la magnitud de la estimación del F_{ST} (O'Reilly *et al.*, 2009). Por ejemplo, O'Reilly *et al.* (2009) demostró que la detección de bajos niveles de divergencia genética neutral en poblaciones grandes puede ser limitada por las características mutacionales de *loci* microsatélites altamente polimórficos. Esta observación es cualitativamente similar a lo reportado por Olsen *et al.* (2004), donde microsatélites moderadamente polimórficos ($HS < 0.60$) proveían estimaciones más altas de F_{ST} que aquellos microsatélites altamente polimórficos ($HS > 0.84$). Si bien los altos niveles de polimorfismo mostrado por los *loci* microsatélites hacen de ellos unos marcadores prometedores, todavía implican limitaciones en su poder de resolución, y cautela, para inferir parámetros poblacionales como estructuración genética (O'Reilly *et al.*, 2009).

Referente al parámetro de relación genética, este parámetro es necesario para calcular las medidas moleculares de coancestría, sobre las cuales se establecerá una selección efectiva de

los organismos destinados a la reproducción (Estoup *et al.*, 1998). En este estudio fue posible reconstruir el pedigrí de la población F1 estudiada, debido a que los marcadores microsatélites poseían una alta diversidad ($H_o > 0.6$) (Aykanat *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2012), lo que ayudó a revelar que ambas poblaciones presentaban porcentajes elevados de parejas en la categoría *sin relación genética* (Figura 13). Estos resultados pudieron obtenerse, debido a que la técnica de reconstrucción parental utilizó los genotipos de la descendencia en familias de medios hermanos o hermanos completos, en donde todos los descendientes compartirán al menos un padre, y en donde el genotipo del padre compartido puede ser reconstruido identificando un par de alelos, para lo cual, cada hijo debió heredar al menos uno de ellos (Jones *et al.*, 2010).

Si bien los resultados de relación genética reafirman el elevado grado de diversidad dentro de la primera generación de *P. adspersus*, es necesario tener en cuenta el riesgo que implica el diseño de cruzamientos sin ninguna metodología, debido a que pueden seleccionarse individuos altamente relacionados para formar una nueva población en los centros de cultivo, aumentando los niveles de endogamia y depresión consanguínea (Borrell *et al.*, 2006). Sin embargo, para la población de reproductores F1 de cultivo evaluada, la información generada (Tabla 12, Anexo I) permitirá el diseño de un sistema reproductivo eficiente, que tendrá como objetivo principal evitar apareamientos entre hermanos, y minimizar el nivel de endogamia en las futuras generaciones (Sekino *et al.*, 2004).

Es importante indicar también, que aunque estos resultados son alentadores, el grado de confianza de los análisis de relación genética en este estudio (con cinco *loci* microsatélites), tiene un nivel de confianza del 75%, el cual podría elevarse en un análisis posterior, con el uso de 12 *loci* microsatélites, con los cuales el nivel de confianza permanecería relativamente constante (Wagner *et al.*, 2006). A pesar de esta acotación, para los estudios de parentesco en peces, diversos investigadores reportan resultados con el uso de cuatro hasta 11 *loci* microsatélites (Hara & Sekino, 2003; Sekino *et al.*, 2004; Shikano, 2008; Blonk *et al.*, 2010; Sawayama & Takagi, 2016), de entre los cuales, Hara & Sekino (2003) resaltan que la relación entre padre e hijo puede determinarse inequívocamente con el uso de solo cuatro *loci* microsatélites altamente polimórficos.

Finalmente, la necesidad de conservar la diversidad genética en los organismos de cultivo se basa en dos argumentos principales: la necesidad de la diversidad genética para que la evolución se produzca, y la relación esperada entre la heterocigosidad y la aptitud reproductiva (Reed & Frankham, 2003). En este contexto, diferentes autores han estimado el número efectivo de organismos necesario para que la diversidad genética permanezca estable (N_e). Autores como Aho *et al.* (2006) señalan que con un N_e de 50 organismos, la heterocigosidad disminuiría solo en un 14%. De modo similar, FAO (2009a) señala que para los acuicultores comerciales grandes y para aquellos que dirigen programas de cría selectiva, la meta de salvar alelos con una

frecuencia igual a 0,05 podría lograrse con un N_e de 59 organismos, con un 95% de probabilidad para 20 generaciones (FAO, 1980; Fred & Phelps, 1980).

Por otro lado, Greenbaum *et al.* (2014) recomiendan establecer una meta genética del 95% de presencia alélica, que se interpreta como la "mínima riqueza alélica conservada con un 95% de confianza", que podría ser aplicado en los programas de gestión o en las evaluaciones genéticas. Asimismo, Bouza *et al.* (2008) y Coughlan *et al.* (1998) mencionan que el establecimiento de los hatcheries debería darse bajo asesoramiento genético, maximizando la diversidad genética, minimizando los cruces consanguíneos y preservando la integridad evolutiva, haciendo énfasis en un buen manejo de reproductores, especialmente en términos del uso adecuado del número de padres efectivos. Por ejemplo, Segovia *et al.* (2016) mencionan que cada reproductor podría reemplazarse en cada nuevo lote de juveniles, para que en lotes sucesivos, derivados de diferentes reproductores, aumente el N_e total.

Así también, una alternativa para los métodos convencionales, es la identificación de marcadores genéticos asociados a *loci* que controlan características cuantitativas de importancia económica (QTLs), que permitiría seleccionar organismos desde edades muy tempranas sin la necesidad de pruebas de detección fenotípica (Coimbra *et al.*, 2001). El principal objetivo de la identificación de QTLs es conocer el control genético de estos rasgos y utilizarlos en la selección asistida por marcador (MAS) para mejorar genéticamente los rasgos que no pueden ser medidos en los propios candidatos a reproductores, como la resistencia a enfermedades (Laghari *et al.*, 2014; Yañez *et al.*, 2012).

Mientras que Yokota *et al.* (2003), dentro de sus cinco propuestas diferentes para evitar la pérdida de variabilidad genética, mencionan que los reproductores machos deberían de ser recogidos al azar de la naturaleza, mientras que las reproductoras hembras deberían de ser obtenidas del propio cultivo (descendientes de los peces fundadores), evitando la reproducción artificial con los organismos machos derivados de cultivo. Esta recomendación es respaldada por los trabajos de Bickley *et al.* (2013) y Zajitschek & Brooks (2010), quienes demostraron que la endogamia afecta principalmente a las características reproductivas masculinas. Zajitschek & Brooks (2010), en especial, demostró que los peces machos endogámicos de *Poecilia reticulata* muestran una caída mucho más fuerte en la producción del número de espermatozoides, en comparación con organismos silvestres.

Por último, es importante mencionar que contrario al objetivo de la biología de la conservación, la pérdida de diversidad alélica dentro de las poblaciones del hatchery, en sí mismo, no es problema para la industria (Evans *et al.*, 2004). La preocupación para la industria es que el declive de la variación de marcadores neutrales puede ocasionar la pérdida de variación en las características comerciales importantes, tales como la tasa de crecimiento, y resistencia a las enfermedades (Vuorinen, 1984; FAO, 2009a). Salvar alelos raros no es tan importante para el

cultivo de peces comestibles, debido a que si los alelos raros mejoran su viabilidad, crecimiento, y otras variedades de cultivo, la domesticación incrementará su frecuencia (FAO, 2009a).

Sin embargo, la pérdida de variabilidad genética implica un riesgo ambiental si los peces de la población del hatchery escapan o son liberados hacia áreas naturales del mar. Si esto sucediera, podrían posiblemente amenazar a los acervos genéticos adaptados localmente e impactar genéticamente en los recursos naturales de una determinada especie (Liu *et al.*, 2005a). Se ha demostrado que cuando a un número grande de peces cultivados, a partir de un grupo pequeño de reproductores, se les permite aparearse con individuos silvestres, se puede afectar directamente el potencial reproductivo de los peces silvestres (Araki & Schmid, 2010). Por ejemplo en los salmónidos, uno de los taxa más antiguos e importantes de la acuicultura en el mundo, se sabe que la hibridación e introgresión entre peces cultivados y silvestres, puede contribuir a una disminución en la aptitud de sus descendientes silvestres (Segovia *et al.*, 2016).

En conjunto, la información mencionada permite entender la importancia del monitoreo de la estructura del pedigrí en los centros de cultivo, el cual debe ser entendido como una rutina en las prácticas del hatchery, en donde un pedigrí basado en marcadores microsatélites, puede proveer el camino más eficiente para alcanzar este propósito (Sekino *et al.*, 2003; Sekino & Hara, 2001).

7. CONCLUSIONES

- Se identificaron diez marcadores microsatélites en la especie *Paralichthys adspersus*, a partir de microsatélites desarrollados para la especie *Paralichthys olivaceus*, demostrando el alto grado de transferibilidad de los marcadores microsatélites entre especies filogenéticamente cercanas.
- La población F1 y las poblaciones silvestres de *Paralichthys adspersus* presentaron desviación para el Test exacto del equilibrio Hardy Weinberg, indicando presencia de apareamiento selectivo positivo en la población de cultivo F1 y un exceso de homocigotos en las poblaciones silvestres.
- Se detectó la presencia de alelos nulos en los cinco *loci* analizados, en la población F1 y las poblaciones silvestres de *P. adspersus*, lo que pudo contribuir al desequilibrio genético observado en ambas poblaciones.
- Los parámetros que caracterizan las variaciones genéticas en la población F1 y la población silvestre de *P. adspersus* mostraron un elevado polimorfismo, indicando que ambas poblaciones poseían un alto nivel de variabilidad genética, y mostrando a la población de cultivo F1 en un lote de reproductores eficiente para la producción de las futuras generaciones de *P. adspersus*.
- No se encontraron diferencias significativas entre la heterocigosidad esperada y observada en la población F1 y las poblaciones silvestres, demostrándose una conservación de la variabilidad genética en términos de heterocigosidad en la primera generación de *P. adspersus* de cultivo.
- El coeficiente general de consanguinidad y el índice de endogamia mostraron una deficiencia de heterocigotos en la población F1 y la población silvestre de *P. adspersus*, indicando un aumento en la homocigosis total para ambas poblaciones.
- El grado de diferenciación genética entre en la población F1 y la población silvestre de *P. adspersus* mostró que las poblaciones eran genéticamente parecidas, demostrando una conservación de la variabilidad genética en la en la primera generación de *P. adspersus* de cultivo.
- No se encontraron diferencias significativas de variabilidad genética entre la población F1 y la población silvestre de *P. adspersus*. Resultado positivo para la empresa debido a que demuestra una amplia diversidad genética, equivalente a lo que se encontraría en una población silvestre, en su plantel de reproductores.

- Los valores promedios del coeficiente de relación r , en ambas poblaciones indicaron que la mayoría de organismos dentro de cada población presentaban un bajo grado de parentesco genético, demostrando nuevamente una conservación de la diversidad genética en la primera generación de *P. adspersus*.
- Los organismos destinados a la reproducción, que conforman la población F1, podrán ser seleccionados de acuerdo a su grado de parentesco, lo que evitará que se seleccionen organismos estrechamente emparentados y por lo tanto aumentar el nivel de endogamia en las futuras generaciones.
- De la conclusión anterior se desprende que la población F1, que corresponde al plantel de reproductores de la empresa Pacific Deep Frozen, se constituye en un lote de reproductores eficiente, el cual asegura que el nivel de endogamia en las futuras generaciones de *P. adspersus*, permanezca relativamente bajo.

8. RECOMENDACIONES

- Incrementar el número de marcadores microsatélites a 12, lo cual incrementaría el nivel de confianza de un 75% (con el uso de cinco marcadores) a un 90%, debido a que los resultados obtenidos con el uso de marcadores microsatélites adicionales corroborará aquellos obtenidos con los marcadores utilizados previamente.
- Validar los resultados con técnicas automatizadas y sensibles para la detección del tamaño de los fragmentos amplificados (por ejemplo mediante un Fragment Analyzer) para disminuir el nivel de error obtenido al utilizar geles de poliacrilamida.
- Validar los resultados utilizando un marcador de ADN mitocondrial (mtADN) adicional, debido a que si bien el uso de marcadores nucleares es una técnica poderosa para detectar pequeñas variaciones en los niveles de diversidad genética, el uso simultáneo de mtADN y marcadores microsatélites altamente variables mejoraría significativamente la eficacia del monitoreo de la variabilidad genética.
- Incluir otras poblaciones de cultivo (como las poblaciones de cultivo del Laboratorio de cultivo de peces marinos de IMARPE y FONDEPES) para confirmar los resultados de una conservación de la variabilidad genética, en términos de heterocigosidad, en una primera generación de organismos de cultivo.
- Incluir el estudio de poblaciones silvestres a través de su rango de distribución, con un número adecuado de muestras para cada una de ellas, para determinar su estructura genética poblacional y los posibles fenómenos que podrían estar alterando esta estructura.
- La última recomendación está vinculada directamente con la empresa, recomendándose el uso de la Tabla 12 de relación de parentesco, generada en este estudio, para que la selección futura de los organismos destinados a la reproducción se realice de una manera eficaz, seleccionando aquellos organismos que no se encuentren relacionados genéticamente y por lo tanto, manteniendo la diversidad genética en las generaciones subsiguientes.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, E. & L. Cid. 1995. The ecology of two sympatric flounders of the genus *Paralichthys* in the bay of Coquimbo, Chile. *Netherlands Journal of Sea Research*, **34** (1-3): 7-18.
- Aho, T., J. Rönn, J. Piironen & M. Björklund. 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture*, **253** (1-4): 244-248.
- Akagi, H., Y. Yokozeki, A. Inagaki & T. Fujimura. 1998. Origin and evolution of twin microsatellites in the genus *Oryza*. *Heredity*, **81**: 188-187.
- Araki, H. & C. Schmid. 2010. Is hatchery stocking a help or harm? Evidence, limitations and future directions in ecological and genetic surveys. *Aquaculture*, **308**: S2-S11.
- Alarcón, J., A. Magoulas, T. Georgakopoulos, E. Zouros & M. Alvarez. 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, **230**: 65 – 80
- Allendorf, W., 1986. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biology*, **5** (10): 181-190
- Allendorf, F., G. Luikart & S. Aitken. 2013. *Conservation and genetics of population*. 2nd Edit. Edit. Wiley-Blackwell. West Sussex, UK. P. 93.
- Allendorf, F., O. Berry & N. Ryman. 2014. So long to genetic diversity, and thanks for all the fish. *Molecular Ecology*, **23**: 23-25.
- An, H., E. Kim, J. Lee, J. Noh, C. An, S. Yoon, K. Park & J. Myeong. 2011. Population genetic structure of wild and hatchery black rockfish *Sebastes inermis* in Korea, assessed using cross-species microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research*, **10** (4): 2492-2504.
- Ángeles, B. & B. Mendo. 2005. Crecimiento, fecundidad y diferenciación sexual del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner) de la costa central del Perú. *Ecología aplicada*, **4** (1-2).
- Angers, B., A. Estoup & P. Jarne. 2000. Microsatellite size homoplasy, SSCP, and population structure: A case study in the freshwater snail *Bulinus truncates*. *Molecular Biology and Evolution*, **12**: 1926-1932.
- Aranguren, J. & J. Jordana. 2001. *Utilización de marcadores de ADN (microsatélites) en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción*. Universidad Autónoma de Barcelona. Programa de Conservación de Especies. Barcelona, España. 12 p.
- Avise, J. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman and Hall, New York. 507 p.
- Aykanat, T., S. Johnston, D. Cotter, T. Cross, R. Poole, P. Prodóhl, T. Reed, G. Rogan, P. McGinnity & C. Primmer. 2014. Molecular pedigree reconstruction and estimation of evolutionary parameters in a wild Atlantic salmon river system with incomplete sampling: a power analysis. *BMC Evolutionary Biology*, **14**: 68

- Baltazar, P. & J. Palacios. 2015. *La acuicultura en el Perú: producción, comercialización, exportación y potencialidades*. VII Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura, Lima, Perú.
- Barahona, S. 2014. *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 Biólogo Genetista Biotecnólogo. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. 120 p.
- Barbosa, S., R. Silva, S. Paiva, A. Caetano, E. Silva, O. Uffo, G. Ponce, N. Martinez & M. Gomes. 2014. *Genetic characterization of two populations of Murrah buffaloes from Brazil and Cuba*. Proceedings, 10th World congress of genetics applied to livestock production, Vancouver, BC. Canada.
- Bardach, J., J. Ryther, & W. McLaren. 1990. *Acuicultura crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce*. 1st. Edit. Edit. AGT. México, 741 p.
- Bell, J., L. McEvoy, A. Estevez, R. Shields & J. Sargent 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture*, **227**: 211-220.
- Becerra V. & M. Paredes. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*, **60** (3).
- Bickley, L., A. Brown, D. Hosken, P. Hamilton, G. Le Page, G. Paull, S. Owen & C. Tyler. 2013. Interactive effects of inbreeding and endocrine disruption on reproduction in a model laboratory fish. *Evolutionary Applications*, **6** (2): 279–289.
- Blonk, R., H. Komen, A. Kamstra & J. Arendonk. 2010. Estimating breeding values with molecular relatedness and reconstructed pedigrees in natural mating populations of common Sole, *Solea Solea*. *Genetics*, **184** (1): 213-219.
- Borrell, Y., G. Espinoza, E. Vásquez, J. Sánchez & G. Blanco. 2006. Variabilidad genética de loci microsatélites en los primeros lotes de *Litopenaeus vannamei* introducidos en Cuba para la acuicultura. *Revista de Investigaciones Marinas*, **27** (3): 237-244.
- Bouza C., R. Vilas, J. Castro & P. Martínez. 2008. Mitochondrial haplotype variability of brown trout populations from Northwestern Iberian Peninsula, a secondary contact area between lineages. *Conservation Genetics*, **9**: 917-920.
- Boyer, R. 2012. *Biochemistry laboratory: Modern Theory and techniques*. 2nd Edit. 382p: 172-173.
- Bowcock, A., A. Ruiz, J. Tomforde, E. Minch, J. Kidd & L. Cavalli. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, **368**: 455-457.
- Brookfield, J. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, **5**: 453-455.
- Caballero, A. & A. García. 2013. Allelic diversity and its implications for the rate of adaptation. *Genetics*, **195** (4): 1373-1384.
- Cairney, M., J. Taggart & B. Høyheim. 2000. Characterization of microsatellite and minisatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and cross-species amplification in other salmonids. *Molecular Ecology*, **9** (12): 2175–2178.

- Caldero, I., C. Palacián & X. Turon. 2009. Microsatellite markers reveal shallow genetic differentiation between cohorts of the common sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in northwest Mediterranean. *Molecular Ecology*, **18**: 3036–3049.
- Callen, D., A. Thompson, Y. Shen, H. Phillips, R. Richards, J. Mulley & G. Sutherland. 1993. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, **52**: 922-927.
- Castaño, C., K. Fuji, A. Ozaki, O. Hasegawa, T. Sakamoto, K. Morishima, I. Nakayama, A. Fujiwara, T. Masaoka, H. Okamoto, K. Hayashida, M. Tagami, J. Kawai, Y. Hayashizaki & N. Okamoto. 2010. A second generation genetic linkage map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *BMC Genomics*, **11**: 554
- Castillo, L., A. Giraldo & G. Barreto. 2014. Diversidad genética en una población de *Rhinoclemmys snasuta* (Testudines: Geoemydidae) asociada a un ambiente insular del Chocó Biogeográfico. *Acta Biológica Colombiana*, **19** (3): 513-519.
- Castro, J., C. Bouza, P. Presa, A. Pino-Querido, A. Ríaza, I. Ferreiro, L. Sánchez & P. Martínez. 2004. Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture*, **242**: 119-135.
- Chakraborty, R., M. De Andrade, S. Daiger & B. Budowle. 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics*, **56**: 45–57.
- Chapuis, M. & A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, **24** (3): 621-631.
- Chang, Y., X. Sun, S. Li, Y. Zhao, X. Zhu & L. Hai. 2005. Isolation of CA/GT microsatellites de *Paralichthys olivaceus* Genome. *Zoological Research*, **26** (6): 652-656.
- Charlesworth, D. & S. Wright. 2001. Breeding systems and genome evolution. *Genomes and evolution*, **11** (6): 685-90.
- Charlesworth, D. & J. Willis. 2009. The genetics of inbreeding depression. *Nature Genetics Review*, **10**: 783-796.
- Chatrou, L., M. Escribano, M. Viruel, J. Maas, J. Richardson & J. Hormaza. 2009. Flanking regions of monomorphic microsatellite loci provide a new source of data for plant species-level phylogenetics. *Molecular phylogenetics and evolution*, **53** (3): 726-733.
- Chinchayán, M., G. Vera, R. Cisneros & L. Carrera 1997. Notas sobre el cultivo de los lenguados *Paralichthys adspersus* y *Etropus ectenes* en ambiente controlado. *Inf. Prog. Inst. Mar. Perú*, **64**: 34-51
- Chirichigno, N. 1974. Clave para identificar los peces marinos del Perú. *Inf. Inst. Mar Perú, Callao. Perú*, **44**: 387.
- Coimbra, M., O. Hasegawa, K. Kobayashi, S. Koretsugu, E. Ohara & N. Okamoto. 2001. Twenty microsatellite markers from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, **67**: 358–360.
- Coligan, J. & B. Bierer. 2010. *One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. Current Protocols in Immunology*. 114:8.10.1-8.10.36. doi: 10.1002/cpim.10

- Coll, J. 1983. *Acuicultura marina animal*. Edit. Mundi-Prensa, Madrid. España. 670 p.
- Cornejo, A., A. Serrato, B. Rendon Aguilar & M. Rocha. 2014. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). México DF. 274 p.
- Costa, V., J. Pérez, P. Santos, P. Fernández, J. Carranza, A. Zsolnai, I. Anton, J. Buzgó, G. Varga, N. Monteiro & A. Beja. 2012. Microsatellite markers for identification and parentage analysis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *BMC Research Notes*, **25**: 479
- Coughlan, J., A. Imsland, P. Galvin, R. Fitzgerald, G. Naevdal & T. Cross. 1998. Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: a preliminary study. *Journal of Fish Biology*, **52**: 916-922.
- Curran, M. & K. Able. 1998. The value of tethering fishes (winter flounder and tautog) as a tool for assessing predation rates. *Marine Ecology Progress Series*, **163**: 45-51.
- Cuveliers, E., M. Larmuseau, B. Hellems, S. Verherstraeten, F. Volckaert & G. Maes. 2012. Multi-marker estimate of genetic connectivity of sole (*Solea solea*) in the North-East Atlantic Ocean. *Marine Biology*, **159** (6): 1239–1253.
- Dakin, E. & J. Avise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, **93**: 504–509.
- Dayu, L., D. Kang, Q. Yin, X. Sun & L. Liang. 2007. Microsatellite DNA marker analysis of genetic diversity in Wild Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Journal of Genetics and Genomics (Formerly Acta Genetica Sinica)*, **34** (11): 984-993.
- De Lucas, A. 2009. *Flujo genético, demografía y variabilidad genética en una conífera mediterránea emblemática, el pino negral o rodano*. Tesis doctoral. Universidad de Valladolid. Palencia, España, 104 p.
- Decreto legislativo n° 1195. Diario Oficial El Peruano, República de Perú, Lima, 30 de Agosto de 2015. D.O. 560404- 560411.
- Delgado, I., E. Fuentes, S. Escobar, C. Navarro, T. Corbeaux, A. Reyes, M. Vera, M. Álvarez & A. Molina. 2008. Temporal and spatial expression pattern of the myostatin gene during larval and juvenile stages of the Chilean flounder (*Paralichthys adspersus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **151** (2): 197–202.
- Díaz, E., M. Cross, M. Barrios, A. Pino, J. Castro, C. Bouza, P. Martínez & L. Rebordinos. 2012. Genetic characterization, based on microsatellite *loci*, of *Solea senegalensis* (Soleidae, Pleuronectiformes) in Atlantic coast populations of the SW Iberian Peninsula. *Ciencias Marinas*, **38** (1A): 129–142.
- Dimoski, P., G.Toth & M. Bagley. 2000. Microsatellite characterization in central stoneroller *Campostoma anomalum* (Pisces: Cyprinidae). *Molecular Ecology*, **9** (12): 2187-9.
- Ding, H., C. Shao, X. Liao, G. Xu, X. Ji & S. Chen. 2009. Ten polymorphic microsatellite *loci* for the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and cross-species application in related species. *Conservation Genetics*, **10**: 611.

- Eguiarte, L. V. Souza & X. Aguirre. 2007. *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México DF, México. P 55.
- Ellegren, H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Elsevier Science*, **16** (120): 551-558.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, **5**: 435-445.
- Ellegren, H. & N. Galtier. 2016. Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, **17**: 422–433.
- Escobar, S., E. Fuentes, E. Poblete, J. Valdés, D. Safian, A. Reyes, M. Álvarez & A. Molina. 2011. Molecular cloning of IGF-1 and IGF-1 receptor and their expression pattern in the Chilean flounder (*Paralichthys adspersus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **159** (3): 140-147.
- Espinoza, J., E. Fuentes, W. Barros & C. Ramírez. 2007. Utilización de microsatélites para la determinación de la variabilidad genética de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) en Chile Central. *Agricultura Técnica*, **67** (3): 244-252.
- Estoup, A., P. Presa, F. Krieg, D. Vaiman & R. Guyomard. 1993. (CT) and (GT) microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, **71**: 48-496.
- Estoup, A., K. Gharbi, M. SanCristobal, C. Chevalet, P. Haffray & R. Guyomard. 1998. Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **55**: 715–725.
- Estratex. 2015. *Estudio de mercado del lenguado en Lima Metropolitana y la provincia constitucional del Callao*. Servicio de consultoría para la elaboración del estudio de mercado del lenguado en Lima Metropolitana y la Provincia Constitucional del Callao. Lima, Perú. 114 pp.
- Evans, B., J. Bartlett, N. Sweijde, P. Cooke & N. Elliott. 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). *Aquaculture*, **233**: 109 – 127.
- Ewens, W. 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theoretical Population Biology*, **3** (1): 87-112.
- FAO. 1980. *Conservación de los recursos genéticos de los peces: problemas y recomendaciones*. Documento Técnico de Pesca N° 217. Roma.
- FAO. 2007. *The estate of the world's animal genetic resources for food and agriculture*, edited by Rischkowsky, B. & D. Pilling. Rome.
- FAO. 2009. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008*. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma. 196 p.
- FAO. 2009a. *Desarrollo de la acuicultura. 3. Gestión de recursos genéticos*. FAO Orientaciones Técnicas para la Pesca Responsable. No. 5, Supl. 3. Roma, FAO. 148p.

- FAO. 2010. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma. 274 p.
- FAO. 2010a. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma (disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>).
- FAO. 2014. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Oportunidades y desafíos*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma. 274 p.
- FAO. 2016. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016*. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- Finkeldy, R. & H. Hattemer. 2007. *Tropical forest genetics*. 1st Edit. Edit. Springer. New York, USA. P 25-26.
- Fisch, K., J. Ivy, R. Burton & B. May. 2013. Evaluating the performance of captive breeding techniques for conservation hatcheries: A Case study of the delta smelt captive breeding program. *Journal of Heredity*, **104** (1): 92–104.
- Fleuriet, A., M. Hecht & B. Wallace. 1988. *Genetic diversity in nature. Patters and theory*. 1st Edition. Volume 23. Edit. Springer US. p 217-246. United States.
- FONDEPES. 2015. *Manual para el cultivo de lenguado*. Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. Lima, Perú. 32 p.
- Frankham, R., D. Ballou & D. Briscoe. 2009. *A primer of conservation genetics*. 2nd Edit. Edit. Cambridge University Press. New York, USA. P 67-74.
- Futuyma, D. 2005. *Evolution*. 1st Edit. Edit. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, USA. p 189-212.
- Fred, A. & S. Phelps. 1980. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, **109** (5): 537-543.
- Freelan, J., H. Kirk, S. Peterson. 2011. *Molecular Ecology*. 2nd Edit. Edit. John Wiley & Sons, Etd. Oxford, United Kingdom.
- Freelan, J. 2005. *Molecular Ecology*. 1st Edit. Edit. John Wiley & Sons, Etd. Oxford, United Kingdom.
- Fuentes, E., E. Poblete, A. Reyes, M. Vera, M. Álvarez & A. Molina. 2008. Dynamic expression pattern of the growth hormone receptor during early development of the Chilean flounder. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. **150** (1): 93–102.
- Futuyma, D. 2005. *Evolution*. 1st Edit. Edit. Sinaeuer Associates, Inc. Sunderland, U.S.A.
- Glaubitz, J., E. mebiri & L. Moran. 2001. Dinucleotide microsatellites from *Eucalyptus sieberi*: inheritance, diversity, and improved scoring of single-base differences. *Genome*, **44** (6): 1041-5.
- Graur, D. & W. Li. 2000. *Fundamentals of molecular evolution*. 2nd Edit. Edit. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Massachusetts, USA. p 40-63.
- Greenbaum, G., A. Templeton, Y. Zarmi & S. Bar-David. 2014. Allelic richness following population founding events – A stochastic modeling framework incorporating gene flow and genetic drift. *PLoS ONE*, **9** (12).

- Grosslein, M. & T. Azarovitz. 1982. *Fish distribution. MESA New York Bight Atlas Monograph 15*, N.Y. Sea Grant Inst., Albany, N.Y. 182 p.
- Guo, S. & E. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, **48** (2):361-72.
- Griffiths, A., J. Miller, D. T Suzuki, R. Lewontin & W. Gelbart. 2000. *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th edit. Edit. Macmillan. New York: W. H. Freeman.
- Guartatanga, R. 1997. *Manual de Técnica de Cultivo de lenguado (Paralichthys woolmani)*. CENAIM, San Pedro, Ecuador.
- Gupta, P. & R. Varshney. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, **113**: 163-185.
- Hara, M. & M. Sekino. 2003. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture*, **217** (1–4): 107–114.
- Hayward, A., R. Tollenaere, J. Dalton-Morgan & J. Batley. 2015. Molecular marker applications in plants. *Methods in Molecular Biology*, **1245**:13-27.
- Hale, M., T. Burg & T. Steeves. 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.
- Hamilton, M. 2009. *Population Genetics*. 1st Edit. Edit. Wiley-Blackwell. West Sussex, UK. P 121.
- Hartl, D. & A. Clark. 2007. *Principles of population genetics*. 4th Edit. Edit. Sinaeuer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, USA.
- Hartl, D. & A. Clark. 1997. *Principles of population genetics*. 3rd Edit. Edit. Sinaeuer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, USA.
- Hedgecock, D. & F. Sly. 1990. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, **88** (1): 21-38.
- Henshaw, M. 2000. Microsatellite *loci* for the social wasp *Polistes dominulus* and their application in other polistine wasps. *Molecular Ecology*, **9**: 2155-2234.
- Hile, S. & Eckert, K. 2004. Positive correlation between DNA polymerase α -primase pausing and mutagenesis within polypyrimidine/polypurine microsatellite sequences. *Journal of molecular Biology*, **335**: 745–759.
- Hindara, K., I. Flemingb, P. McGinnityc & O. Diseruda. 2006. Genetic and ecological effects of salmon farming on wild salmon: modelling from experimental results. *ICES Journal of Marine Sciences*, **63** (7): 1234-1247
- Horau, G., A. Rijnsdorp, H. Van der, W. Stam & J. Olsen. 2002. Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in Northern Europe: microsatellites revealed large scale spatial and temporal ahomogeneity. *Molecular Ecology*, **11**: 1165-1176.
- Holsinger, K. & B. Weir. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, stimating and interpreting FST. *Nature Reviews Genetics*, **10**: 639-650.
- Hulak, M., V. Kaspar, K. Kohlmann, K. Coward, J. Tešitel, M. Rodina, D. Gela, M. Kocour & O. Linhart. 2010. Microsatellite-based genetic diversity and differentiation of foreign common

- carp (*Cyprinus carpio*) strains farmed in the Czech Republic. *Aquaculture*, **298**, (3–4): 194–201.
- Hundertmark, K. & L. Van Daele. 2010. Founder effect and bottleneck signatures in an introduced, insular population of elk. *Conservation Genetics*, **11**: 139–147.
- Infante, C. & M. Machado. 2007. *Genética y genómica en la acuicultura. Publicaciones científicas y tecnológicas del Observatorio Español de Acuicultura*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Madrid, España. 890 p.
- Innan, H. & Y. Kim. 2004. Pattern of polymorphism after strong artificial selection in a domestication event. *PNAS*, **101** (29): 10667–10672.
- Jones, A., C. Stockwell, D. Walker & J. Avi. 1998. The molecular basis of a microsatellite null allele from the white sands pupfish. *Journal of Heredity*, **89** (4): 339–342.
- Jones, A., C. Small, K. Paczolt & N. Ratterman. 2010. Technical Review A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources*, **10**: 6–30
- Kalinowski, S. 2004. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics*, **5**: 539–543.
- Kalinowski, S. 2005. Blackwell Publishing Ltd Blackwell Publishing, Ltd. PROGRAM NOTE HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, **5**: 187–189.
- Kalinowski, S. & M. Taper. 2006. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, **7**: 991.
- Kalinowski, S., A. Wagner & M. Taper. 2006. ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, **6**: 576–579
- Kang, J., W. Kim & W. Lee. 2008. Genetic linkage map of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *International Journal of Biological Sciences*, **4** (3): 143–149.
- Karlsson, S. & J. Mork. 2005. Deviation from Hardy–Weinberg equilibrium, and temporal instability in allele frequencies at microsatellite loci in a local population of Atlantic cod. *ICES J Mar Sci.*, **62** (8): 1588–1596.
- Kartavtsev, Y. J. Lee. 2006. Analysis of nucleotide diversity at the Cytochrome *b* and Cytochrome Oxidase 1 Genes at the population, species, and genus levels. *Russian Journal of Genetics*, **42** (4): 341–362.
- Kelly, P., F. Chu, I. Woods, P. Ngo-Hazelett, T. Cardozo, H. Huang, F. Kimm, L. Liao, Y. Yan, Y. Zhou, S. Johnson, R. Abagyan, A. Schier, J. Postlethwait & W. Talbot. 2000. Genetic linkage mapping of zebrafish genes and ESTs. *Genome Research*, **10** (4): 558–567.
- Kim, W., K. Kim, J. Lee, D. Park, J. Park & Y. Lee. 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Ecology Notes*, **3**: 491–493.
- Kim, W., J. Kang, B. Nam, H. Kong, E. Park, J. Lee, K. Kim, Y. Kim, H. Han, T. Choi & J. Cheong. 2009. Development of 52 new polymorphic microsatellite markers for the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Molecular Ecology Resources*, **9** (3): 839–842.

- Kliman, R., B. Sheehy, & J. Schultz. 2008. Genetic drift and effective population size. *Nature Education*, **1** (3): 3.
- Koljonen, M., J. Tähtinen, M. Säisä & J. Koskiniemi. 2002. Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. *Aquaculture*, **23**: 69–92.
- Laghari, M., P. Lashari, Y. Zhang & X. Sun. 2014. Identification of Quantitative Trait Loci (QTLs) in Aquaculture Species, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, **22** (3).
- Langton, R.W. and R.E. Bowman. 1981. *Food of eight northwest Atlantic pleuronectiform fishes. NOAA Technical Report, NMFS SSRF-749*. 16 p.
- Leuzzi, M., F. Simões, M. Orsi & L. Koelblinger. 2004. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax tiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, **27** (3).
- Liu, Y., S. Chen & B. Li. 2005a. Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers. *Aquaculture*, **243**: 103–111.
- Liu, L., H. Gao, C. Liu, F. Li & S. Chen. 2010. Genetics Features of Natural and Cultured Populations of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*) Revealed by RAPD Markers. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgah*, **62** (2): 96-104.
- Liu, F., Z. Hu, W. Liu, J. Li, W. Wang, Z. Liang, F. Wang & X. Sun. 2016. Distribution, function and evolution characterization of microsatellite in *Sargassum thunbergii* (Fucales, Phaeophyta) transcriptome and their application in marker development. *Scientific Reports*, **6**: 18947.
- López, C. & M. Toro. 2007. *Genética y genómica en acuicultura. Fundamentos de la mejora genética en la acuicultura*. Fundación OESA. 154-181.
- Loo, J. 2011. *Manual de genética de la conservación Principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad biológica*. Comisión Nacional Forestal Coordinación General de Educación y Desarrollo Tecnológico, SEMARNAT, gobierno federal de México. Mexico DF. 196 p.
- Losos, J., D. Baum, D. Futuyma, H. Hoekstra, R. Lenski, A. Moore, C. Peichel, D. Schluter & M. Whitlock. 2014. *The Princeton guide to evolution*. 1st Edit. Edit. Princeton University Press. Oxford, United Kingdom.
- Loukovitis, D., B. Ioannidi, D. Chatziplis, G. Kotoulas, A. Magoulas & C. Tsigenopoulos. 2015. Loss of genetic variation in Greek hatchery populations of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) as revealed by microsatellite DNA analysis. *Mediterranean Marine Science*, **16** (1): 197-200
- Lynch, M. & Ritland, K. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, **152**: 1753–1766.
- Ma, H. & S. Chen. 2011. Development of polymorphic microsatellite markers in barfin flounder (*Verasper moseri*) and spotted halibut (*Verasper variegatus*) by the cross-species amplification. *Molecular Biology Report*, **38**: 4545–4551.

- Marshall, T, J. Slate, L. Kruuk & J. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based Paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, **7**: 639-655.
- Martínez, P. 2005. Aplicaciones de la genética para la mejora de la acuicultura. Boletín, *Instituto Español de Oceanografía*, **21** (1-4): 225-238.
- Martínez, P. & A. Huerta. 2007. Genética y genómica en acuicultura. *Publicaciones científicas y tecnológicas del Observatorio Español de Acuicultura*. 884 p.
- Mendoza, D. 2011. *Informe: Panorama de la Acuicultura Mundial, en América Latina y el Caribe y en el Perú*, Dirección General de Acuicultura, Ministerio de la Producción. Lima, Perú. 66p.
- Mendoza, D. 2013. *Informe: situación del extensionismo acuícola en el Perú, dirección de extracción y producción pesquera para consumo humano directo*. Dirección de Acuicultura, Ministerio de la Producción. Lima, Perú. 14p.
- Muñoz, J., A. Morillo & Y. Morillo. 2008. Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronómica (Palmira)*, **57** (4): 219-226.
- Neel, M. & N. Ellstrand. 2003. Conservation of genetic diversity in the endangered plant *Eriogonum ovalifolium* var. *vineum* (Polygonaceae). *Conservation Genetics*, **4**: 337–352.
- Nei, M. 1975. *Molecular population genetics and evolution*. Edit. American Elsevier Publishing Company, Inc. New York, USA. p 127-143.
- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, **41** (17): 225.
- NIH. 2010. Institutos Nacionales de la Salud, Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano " Glosario Hablado de Términos Genéticos". Consultado el 11 de agosto 2010, desde <https://www.genome.gov/glossaryS/>
- Norris, T., D. Bradley & P. Cunningham. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture*, **180**: 247–264
- Norbis, W. & O. Galli. 2004. Hábitos de alimentación del lenguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1842) en una laguna costera somera del atlántico sur: Rocha, Uruguay. *Ciencias Marinas*, **30** (4): 619-626.
- Oliveira, E. J. Gomes, M. Imaculada, R. Vencovsky & M. Carneiro. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, **29** (2).
- O'Reilly, P. M. Canino, K. Bailey & P. Bentzen. 2004. Inverse relationship between *fst* and microsatellite polymorphism in the marine fish, walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*): implications for resolving weak population structure. *Molecular Ecology*, **13**: 1799-1814.
- Olsen, J., S. Wilson, E. Kretschmer, K. Jones & J. Seeb. 2000. Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite *loci* derived from sockeye salmon. *Molecular Ecology*, **9**.
- Olsen, J., C. Habicht, J. Reynolds & J. Seeb. 2004. Moderately and highly polymorphic microsatellites provide discordant estimates of population divergence in sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Environmental Biology of Fishes*, **69**: 261–273.
- Packer, D., S. Griesbach, P. Berrien, C. Zetlin, D. Johnson & W. Morse. 1999. *Summer Flounder, Paralichthys dentatus, life history and habitat characteristics*. NOAA Technical Memorandum NMFS-NE-151, Northeast Fisheries Science Center Woods Hole, Massachusetts.

- Peakall, R. & P. Smouse. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, **28**: 2537-2539.
- Pekkala, N., K. Knott, J. Kotiaho, K. Nissinen³ & M. Puurtinen. 2014. The effect of inbreeding rate on fitness, inbreeding depression and heterosis over a range of inbreeding coefficients. *Evolutionary Applications*, **7**: 1107–1119.
- Pérez, M. 2000. *Marcadores moleculares, variabilidad genética y evolución. II simposio científico en biología celular y molecular*. Universidad de León. 247-266.
- Phillips, M., H. Rodríguez & P. Fritz. 1995. Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie Técnica. Informe técnico N° 2252. CATIE. Costa Rica. 183 p.
- Pinsky, M. & S. Palumb. 2014. Meta-analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations. *Molecular Ecology*, **23**: 29–39.
- Piñero, D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha & R. Salas. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *Conocimiento actual de la biodiversidad*, **1**: 415-435.
- Pompanon, F., A. Bonin, E. Bellemain & P. Taberlet. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, **6**: 847-859.
- Ponzoni, R., N. Nguyen & H. Khaw. 2009. Genetic improvement programs for aquaculture species in developing countries: prospects and challenges. *Association Advancement Animal Breeding Genetics*, **18**: 342-349.
- Porta, J., M. Pota, G. Matinez & M. Alvarez. 2006. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of *Solea sole* (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture*, **251**: 46-55.
- Povh, J., N. Lopera, R. Ribeiro, E. Lupchinski, P. Gomes & T. Lopes. 2008. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Ciencia e investigación agraria*, **35** (1): 5-15.
- Powell, A. & F. Schwartz. 1977. Distribution of paralicthid flounders (bothidae: *Paralichthys*) in North Carolina estuaries. *Chesapeake Science*, **18** (4): 334–339
- PRODUCE. 2007. *Especies cultivadas en el Perú. Dirección General de Acuicultura*. 20 p.
- PRODUCE. 2009. *Plan nacional de desarrollo acuícola. Dirección General de Acuicultura* Despacho Viceministerial de Pesquería Ministerio de la Producción. 84 p.
- PRODUCE. 2012. *Programa Nacional de Ciencia, Desarrollo Tecnológico e Innovación en Acuicultura (C+DT+i) 2013 -2021*. Proyecto FAO TCP/PER/3302 (D) “apoyo para la formulación del programa nacional de ciencia, tecnología e innovación tecnológica en acuicultura en el Perú”. LIMA, 40 pp
- PRODUCE. 2015. Nota de prensa: *Durante el 2015 un 50% de la producción acuícola peruana fue para consumo interno*. 3 p. Disponible el 11-07-2016 en URL. [<http://www.produce.gob.pe/index.php/prensa/noticias-del-sector/4327-durante-el-2015-un-50-de-la-produccion-acuicola-peruana-fue-para-consumo-interno>]

- PRODUCE. 2015a. *Anuario estadístico pesquero y acuícola – 2015*. Dirección general de políticas y desarrollo pesquero. Dirección de Estudios y Derechos Económicos Pesquero y Acuícola. Lima, Perú, 196 pp.
- Raymond, M. & F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2), Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**: 248-249.
- Reed, D. & R. Frankham. 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology*, **17** (1): 230–237 17.
- Rexroad, C., Y. Palti, S. Gahr & R. Vallejo. 2008. A second generation genetic map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genetics*, **9**: 74.
- Ritland, K. 1996. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetics Research, Cambridge*, **67**: 175-185.
- RNIA. 2012. *Taller regional tecnología y escalamiento productivo del cultivo de peces planos en América latina*. Red de Acuicultura de las Américas. 2-13 p.
- Robledo, J. & S. Gonzales. 2009. Marcadores moleculares y ecología del movimiento. *Ecosistemas*, **18** (1): 44-51.
- Ruzzante, D., C. Taggart & D. Cook. 1996. Spatial and temporal variation in the genetic composition of a larval cod (*Gadus morhua*) aggregation: cohort contribution and genetic stability. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **53**: 2695–2705.
- Sahyoun, R., P. Guidetti, A. Di Franco & S. Planes. 2016. Patterns of fish connectivity between a marine protected area and surrounding fished areas. *PloS ONE*, **11** (12): e0167441
- Sans, A. 2004. *Estudio biológico de Mus domesticus RUTTY, 1772 en una zona de polimorfismo Robertsoniano*. Tesis para Doctor en Biología. Universidad de Barcelona. España. 273 p.
- Sakamoto, T., R. Danzmann, K. Gharbi, P. Howard, A. Ozaki, S. Khoo, R. Woram, N. Okamoto, M. Ferguson, L. Holm, R. Guyomard & B. Hoyhei. 2000. A Microsatellite Linkage Map of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Characterized by Large Sex-Specific Differences in Recombination Rates. *Genetics*, **155** (3): 1331-1345
- Samamé, M. & J. Castañeda. 1999. *Biología y pesquería del lenguado Paralichthys adspersus, con especial referencia al área norte del litoral peruano, departamento de Lambayeque*. *Bol. Inst. Mar Perú*, **18** (1-2): 15-48.
- Sawayama, E. & M. Takagi. 2016. Short communication Morphology and parentage association of shortened upper jaw deformity in hatchery-produced Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel, 1846). *Journal of Applied Ichthyology*, **32**: 486–490.
- Schlötterer, C. 2000 Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, **109**: 365–371.
- Segovia, M., E. Serrão, J. Canteras & M. Gonzalez. 2016. Do hatchery-reared sea urchins pose a threat to genetic diversity in wild populations? *Heredity*, **116**: 378-383.
- Sekino, M. & M. Hara. 2000. Isolation and characterization of microsatellite DNA *loci* in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Pleuronectiformes, Pleuronectoidei, Paralichthyidae). *Molecular Ecology*, **9**: 2200-2202.
- Sekino, M. & M. Hara. 2001. Application of microsatellite markers to population genetics studies of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Marine biotechnology*, **3**: 572-589.

- Sekino, M., M. Hara & N. Taniguchi. 2002a. Genetic diversity within and between hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* assessed by means of microsatellite and mitochondrial DNA sequencing analysis. *Aquaculture*, **213**: 101-122.
- Sekino, M., M. Hara & N. Taniguchi. 2002b. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **213**: 101–122.
- Sekino, M., K. Saitoh, T. Yamada, A. Kumagai, M. Hara & Y. Yamashita. 2003. Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management treated to stock enhancement program. *Aquaculture*, **221**: 255–263.
- Sekino, M., T. Sugaya, M. Hara & N. Taniguchi. 2004. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **233** (1–4): 163–172.
- Selkoe, K. & R. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologist: a practical guide to using and evaluating microsatellites markers. *Ecology Letters*, **9**: 615-629.
- Shao, C., X. Liao & L. Chen. 2008a. Isolation and characterization of microsatellite DNA *loci* from the southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Molecular Ecology Resources*, **8**: 381-383.
- Shao, C., G. Xu, L. Wang, X. Liao, Y. Tian & S. Chen. (2008b). New polymorphic microsatellite markers for the summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Conservation Genetics*, **10**: 717-119.
- Shao, C., G. Xu, L. Wang, X. Liao, Y. Tian & S. Chen. 2009. New polymorphic microsatellite markers for the summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Conservation Genetics*, **10** (3): 717–719.
- Shikano, T. 2008. Estimation of quantitative genetic parameters using marker-inferred relatedness in Japanese flounder: a case study of upward bias. *Journal of Heredity*, **99** (2): 94-104.
- Silva, A. & M. Oliva. 2010. Revisión sobre aspectos biológicos y de cultivo del lenguado chileno (*Paralichthys adspersus*). *Latin American Journal of Aquatic Research*, **38** (3): 377-386.
- Sosa, P., F. Batista, M. González & N. Bouza. 2002. La *Conservación Genética de las Especies Amenazadas*. En: Bañares, Á. (ed.). *Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas: Técnicas de diagnóstico del estado de conservación*. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. España, pp. 133-160.
- Su, G., L. Liljedahl & A. Graham. 1996. Effects of inbreeding on growth and reproductive traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **142**: 139-148.
- Taggart, J., R. Hynes, P. Prodohl & A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of fish biology*, **40**: 963-965.
- Takagi, N., K. Yoshida & N. Taniguchi. 1999. Isolation of microsatellite *loci* from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and detection of PCR fragments with simple Non-RI methods. *Fisheries Science*, **65** (3): 486-487.

- Tave, D. 1999. Inbreeding and brood stock management. *Fisheries Technical Paper*. 392: 122p.
- Tang, S., S. Li, W. Cai & Y. Zhao. 2013. Microsatellite analysis of variation among wild, domesticated, and genetically improved populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Zoological Research* **35** (2): 108–117
- Teneva, A., N. Tomlekova & G. Goujgoulova. 2014. Major features, mutations mechanism and development of microsatellites as genetic markers. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **20** (4): 949-956.
- Thingsgaard, K. 2001. Population structure and genetic diversity of the amphiatlantic haploid peatmoss *Sphagnum affine* (Sphagnopsida). *Heredity*, **87**: 485-496.
- Thomson, D, E. Cooch & M. Conroy. 2008. *Modeling demographic processes in marked populations*. 1st. Edit. Edit. Springer. New York, United States, p. 315.
- Toro, M., J. Fernandez & A. Caballero. 2009. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livestock Science*, **120** (3): 174-195.
- Valenzuela, C., D. Escobar, L. Pérez, R. Zuloaga, J. Estrada, L. Mercado, J. Valdés & A. Molina. 2015. Transcriptional dynamics of immune, growth and stress related genes in skeletal muscle of the fine flounder (*Paralichthys adpersus*) during different nutritional statuses. *Developmental & Comparative Immunology*, **53** (1): 145–157.
- Van der Werf, J., H. Graser, R. Frankham & C. Gondro. 2009. Adaptation and fitness in animal populations. Evolutionary and breeding perspectives on genetic resource management. 1st Edit. Edit. Springer Science+Business Media B.V. Armidale, Australia.
- Van Oosterhout C, Hutchinson W. F., Willis D.P.M., & Shipley P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**: 535–538.
- Verspoor, E. 1998. Reduced genetic variability in first-generation Hatchery populations of atlantic *Salmo salar*. *Canadian Journal of Fish Aquatic Sciences*, **45**: 1686-1690.
- Vuorinen, J. 1984. Reduction of genetic variability in a hatchery stock of brown trout, *Salmo trutta* L. *Journal of fish biology*, **24** (3): 339-348.
- Wagner, A., S. Creel & S. Kalinowski. 2006. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. *Heredity*, **97**: 336–345.
- Wang, Z., L. Weber, G. Zhong & S. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, **88**: 1-6.
- Wang, L., H. Zhang, L. Song & X. Guo. 2007. Loss of allele diversity in introduced populations of the hermaphroditic bay scallop *Argopecten irradians*. *Aquaculture*, **271**: 252–259
- Wang, L., X. Shi, Y. Su, Z. Meng & H. Lin. 2012. Loss of genetic diversity in the cultured stocks of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea*, revealed by microsatellites. *International Journal of Molecular Sciences*, **13** (5): 5584–5597.
- Weir, B., A. Andeson & A. Hepler. 2006. Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Reviews | Genetics*, **7**: 771-780.

- Welcomme, R. & U. Barg. 2005. Technical Guidelines for Responsible Fisheries nº5: Aquaculture Development. *Food and Agriculture Organization*, Rome.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **16**: 97–159.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of eugenics Eugenics Society*, **15**: 323–354.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Wright, S. 1978. *Evolution and Genetics of Population*. Chicago: University of Chicago Press.
- Xiao, J. 2009. *Assessing genetic variation within and among native populations and hatchery stocks of Crassostrea ariakensis using microsatellite markers*. Ph.D. thesis. The College of William and Mary. United States – Virginia. 174 p.
- Yañez, J., A. Martínez, L. Aro & M. Cabrejos. 2012. Aplicación de herramientas moleculares en el mejoramiento genético de peces de cultivo: evaluación de la condición genética de reproductores. InnovaChile CORFO. 4p
- Yokota, M., Y. Harada & M. Iizuka. 2003. Genetic drift in a hatchery and the maintenance of genetic diversity in hatchery-wild systems. *Science*, **69**: 101-109.
- Yu, H., L. Jiang, W. Chen, X. Wang, Z. Wang & Q. Zhang. 2010. Analysis of new microsatellite markers developed from reported sequences of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Oceanic and Coastal Sea Research*, **9** (4): 365-370.
- Zajitschek, S. & R. Brooks. 2010. Inbreeding depression in male traits and preference for outbred males in *Poecilia reticulata*. *Behavioral Ecology*, 21 (4): 884-891.
- Zane, L., L. Bargelloni & T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, **11**: 1-16.
- Zardoya, R., D. Volimer, C. Craddock, J. Streebman, S. Karl & A. Meyer. 1996. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *The Royal Society*, **263** (1376): 1589-1598.
- Zeinab, Z., A. Shabany & H. Kolangi-Miandare. 2014. Comparison of genetic variation of wild and farmed Bream (*Abramis brama orientalis*; berg, 1905) using microsatellite markers. *Journal - Molecular Biology Research Communications*, **3** (3): 187–195.
- Zelada, E. & Z. Culquichicon. 2002. Biología Reproductiva de *Paralichthys adspersus* (Pleuronectiformes – Pisces). Zona de Guaynuna – Casma. *Revista Peruana de Limnología y Acuicultura Continental*, **1**: 1-65.
- Zhao, L., C. Shao, X. Liao, H. Ma, X. Zhu & S. Chen. 2009. Twelve novel polymorphic microsatellite loci for the Yellow grouper (*Epinephelus awoara*) and cross-species amplifications. *Conservation Genetics*, **10** (3): 743-745.
- Zheng, X., Y. Kuang, X. Zhang, C. Lu, D. Cao, C. Li & X. Sun. 2011. A genetic linkage map and comparative genome analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L.) using microsatellites and SNPs. *Molecular Genetics and Genomics*, **286** (3-4): 261-277.

Zúñiga, H. 1988. Comparación morfológica y dietaria de *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) y *Paralichthys microps* (Gunther, 1881) en Bahía de Coquimbo. Tesis de Biología Marina, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, 144 p

10. ANEXO I

Matriz de relaciones genéticas en la población F1 a partir de los resultados del coeficiente de relación r_{xy} . Esta matriz muestra las relaciones entre cada par de individuos que tiene la probabilidad más alta entre las cuatro siguientes relaciones: U: sin relación, HS: medios hermanos, FS: hermanos completos, PO: padre-hijo

Género Microchip		Macho (M)	M	M	M	M	M	Hembra (H)	M	M	M	H
		3	55	39	25	77	88	12	43	97	94	59
M	3	-										
M	55	U	-									
M	39	FS	FS	-								
M	25	U	U	U	-							
M	77	U	U	U	U	-						
M	88	U	U	U	FS	HS	-					
H	12	U	HS	U	U	HS	U	-				
M	43	FS	FS	FS	U	U	U	U	-			
M	97	U	U	U	U	FS	U	FS	FS	-		
M	94	U	U	U	U	U	HS	U	FS	FS	-	
H	59	U	U	U	U	U	HS	U	HS	HS	FS	-
M	81	U	U	U	U	U	FS	U	U	U	FS	FS
M	98	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	54	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U
M	78	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	FS
M	57	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	62	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	85	U	FS	U	U	U	U	U	FS	U	U	U
M	14	U	U	U	U	U	U	U	FS	FS	U	HS
M	22	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	15	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	34	U	U	U	U	FS	U	FS	U	FS	HS	HS
H	28	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	70	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U
M	7	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	HS	HS
M	69	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	68	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	75	U	U	U	FS	HS	U	U	U	U	U	U
M	80	U	FS	FS	U	U	U	HS	U	U	U	U
M	32	FS	U	FS	U	U	U	U	FS	U	U	U
M	99	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	61	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	100	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	2	U	U	U	U	FS	U	U	U	U	U	U
M	87	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U
M	65	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	17	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	49	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

Género		M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	H	H	M	M	M
Microchip		81	98	54	78	57	62	85	14	22	15	34	28	70	7	69
M	3															
M	55															
M	39															
M	25															
M	77															
M	88															
H	12															
M	43															
M	97															
M	94															
H	59															
M	81	-														
M	98	U	-													
M	54	U	U	-												
M	78	U	U	U	-											
M	57	U	FS	U	U	-										
M	62	U	U	U	HS	U	-									
M	85	U	U	U	U	U	FS	-								
M	14	U	U	U	HS	HS	U	FS	-							
M	22	U	U	U	U	U	FS	FS	FS	-						
M	15	U	U	U	U	U	U	U	U	U	-					
H	34	U	U	U	HS	FS	U	U	HS	U	FS	-				
H	28	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	-			
M	70	U	HS	U	U	U	U	U	U	FS	U	U	U	-		
M	7	U	U	U	U	U	U	HS	HS	U	U	U	U	FS	-	
M	69	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	-
M	68	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS
M	75	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U
M	80	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	32	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U
M	99	U	U	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	61	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	100	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	2	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	87	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	65	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	17	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	49	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

Género	Microchip	M	M	M	M	M	M	H	M	M	M	H
		3	55	39	25	77	88	12	43	97	94	59
M	63	HS	U	U	U	U	U	U	FS	U	U	U
M	23	FS	U	U	U	U	U	U	FS	U	U	U
M	6	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U
M	44	U	U	U	U	U	U	FS	U	U	U	U
M	91	FS	FS	U	FS	U	U	HS	U	U	U	U
M	64	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	HS	HS
H	1	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U
M	90	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	HS
M	33	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	21	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	56	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	19	U	HS	U	U	HS	U	HS	U	FS	HS	U
H	96	U	U	U	U	U	U	U	FS	FS	FS	U
M	86	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U
H	52	U	U	U	FS	U	U	HS	U	U	U	U
H	89	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	71	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID 8	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS
	ID 7	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	45	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U
	ID 5	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID 2	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS
	ID 4	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID 9	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	9	HS	U	U	FS	U	FS	U	U	U	U	U
H	66	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U
H	51	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID 6	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	48	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	FS
H	29	U	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	U
	ID 1	U	HS	HS	U	U	U	U	HS	HS	HS	FS
	ID 3	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS

Género	Microchip	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	H	H	M	M	M
		81	98	54	78	57	62	85	14	22	15	34	28	70	7	69
M	63	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	23	U	U	U	U	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U
M	6	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	44	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	91	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	64	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	1	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	90	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	U	U	U	HS	U
M	33	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	21	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS
M	56	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	HS	U
M	19	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	FS	U	U	U	U
H	96	U	U	U	HS	U	U	U	FS	U	U	FS	U	U	U	U
M	86	U	U	HS	U	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	HS	U
H	52	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	89	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	71	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U
	ID 8	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID 7	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	45	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID 5	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID 2	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID 4	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U
	ID 9	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	9	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	66	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	51	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID 6	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	48	HS	U	U	FS	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	HS	U
H	29	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID 1	HS	U	U	HS	U	U	HS	HS	U	U	HS	U	U	U	U
	ID 3	U	HS	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS

Género	Microchip	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	
		68	75	80	32	99	61	100	2	87	65	17	49	63	23	6	44
M	63	U	U	U	FS	U	U	U	U	U	FS	FS	-				
M	23	U	U	U	FS	U	U	U	U	HS	U	U	U	FS	-		
M	6	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	HS	-	
M	44	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	-
M	91	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS
M	64	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	FS	U	U	U
H	1	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS
M	90	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	33	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U
M	21	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	HS	U	U	U	U	HS	U
M	56	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	U	U	U	FS	FS	U	U
M	19	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	U	FS	HS	U	U	U	U
H	96	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
M	86	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	52	HS	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	89	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	71	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID8	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID7	U	U	U	FS	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	45	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	HS	U	U	U	U
	ID5	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID2	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID4	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID9	U	U	U	FS	U	U	U	U	HS	U	HS	HS	FS	U	U	U
H	9	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	66	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	51	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	FS	FS	U	U	U
	ID6	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	48	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U
H	29	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID1	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U
	ID3	FS	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U

Género / Microchip		M	M	H	M	M	M	M	M	H	M	H	H	H		
		91	64	1	90	33	21	56	19	96	86	52	89	71	ID 8	ID 7
M	63															
M	23															
M	6															
M	44															
M	91	-														
M	64	U	-													
H	1	U	U	-												
M	90	U	U	HS	-											
M	33	U	U	U	U	-										
M	21	U	U	U	U	HS	-									
M	56	U	U	U	U	U	FS	-								
M	19	U	U	U	U	U	U	U	-							
H	96	U	U	U	U	FS	U	U	FS	-						
M	86	U	U	HS	HS	FS	FS	U	U	FS	-					
H	52	U	U	U	U	FS	U	U	U	FS	FS	-				
H	89	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	-			
H	71	U	U	U	U	U	HS	HS	U	U	U	HS	U	-		
	ID 8	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	FS	-	
	ID 7	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	U	U	FS	-
H	45	U	U	U	FS	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U
	ID 5	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	U	FS	FS	FS
	ID 2	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	FS	U
	ID 4	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	U	FS	FS	FS
	ID 9	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	FS	FS	U
H	9	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	66	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	51	U	U	HS	U	U	U	U	HS	U	U	U	FS	U	U	U
	ID 6	U	U	HS	U	U	U	U	HS	U	U	U	FS	U	U	U
	48	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U
H	29	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	ID 1	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U
	ID 3	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	U	FS	FS	U