

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA  
MOLINA**

**FACULTAD DE PESQUERÍA**



**“DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL  
DEL PERICO (*CORYPHAENA HIPPURUS*, LINNAEUS 1758) EN EL  
PACÍFICO PERUANO”**

**Presentado por:**

**RENATO GOZZER WUEST**

**Tesis para optar el título de:**

**INGENIERO PESQUERO**

**LIMA - PERÚ  
2015**

## Dedicatoria

Le dedico este trabajo a mi madre, Cristina Wuest.  
Este es un logro compartido.  
Gracias por la paciencia, apoyo y amor.

## Agradecimientos

En primer lugar le agradezco a Jaime Mendo por recibirme como su tesista, y más que eso, por inspirarme a trabajar con dedicación, valores claros y sencillez para contribuir al desarrollo de las comunidades de pescadores artesanales del Perú. Todo un honor trabajar con una persona de ese nivel moral y profesional.

A La Universidad Nacional Agraria La Molina por ser la casa desde donde empecé mi formación, pasé momentos de aprendizajes y de exploración personal y dónde conocí a mucha de la gente con la que ahora comparto sueños y expectativas de realizar acciones productivas para la mejora de nuestro país.

A Natalia Bayona de la Universidad Nacional Autónoma de México por invertir su tiempo en co-asesorar este trabajo y por confiar en mí.

A Ximena Velez-Zuazo por estar presente de alguna manera en el transcurso de todo este proceso y por enseñarme a realizar muchas de las pruebas utilizadas en este documento. Por supuesto también agradezco a mis amigos Francisco Menéndez y Giuliana Donayre, porque además de cohabitar conmigo el espacio físico del GRU-UPCH, me ayudaron a entender y a realizar muchas partes de la fase de laboratorio y análisis de resultados que no hubiera podido concretar solo.

A los hermanos Gustavo, Miguel y David Fiestas Purizaca, del Centro Poblado La Islilla en Paita-Piura, por llevarme a navegar en sus embarcaciones periqueras durante todo el verano 2014. Me enseñaron acerca del mar, de la vida del pescador artesanal en Perú y de la amistad.

A la *Genomic Research Unit* – GRU de la Universidad Peruana Cayetano Heredia – UPCH. Ha sido una alegría haber llegado a ese espacio en donde se hace ciencias las 24 horas del día. Donde se enseña y se aprende todo el tiempo. Y donde la curiosidad es algo que nunca falta. Agradezco a Carlos Merino, su Investigador Principal y a Edgar Neyra, coordinador del GRU. Asimismo extendiendo el cariño a todo el equipo del laboratorio.

A Samuel Amoros, Vania Melgar y Nicole Chabaneix por ser las personas con las cuales he pasado gran parte de los últimos tiempos compartiendo opiniones y debatiendo acerca del perico, y en general, de las pesquerías artesanales del Perú. Y no solo por compartir opiniones sino también sueños. También agradezco a WWF Perú por ser el espacio físico desde donde escribí la mayor parte de este documento

A la Familia Wuest, por estar siempre presentes mostrando su preocupación y por desearme lo mejor y demostrarlo. Menciono también a los amigos de siempre: Marité Bustamante, Alonso del Solar, Juan Aldrey y Jorge Grillo. Algunos de ellos les agradezco también por darse el tiempo de revisar este trabajo.

Por último, al 4to Concurso para la Subvención de Proyectos de Tesis – 2014 de la Universidad Nacional Agraria La Molina por el fondo que permitió viabilizar gran parte de este trabajo. Particularmente agradezco a su directora la Dra. Carmen Velezmoro y al Sr. Rafael Inga.

# I. Índice

I. Índice	1
II. Resumen / Summary	8
III. Introducción	10
IV. Revisión de literatura.	12
IV.1. Aspectos bio-ecológicos del Perico:	12
IV.1.1. Taxonomía y generalidades:	12
IV.1.2. Distribución y hábitat:	12
IV.1.3. Madurez y reproducción:	14
IV.1.4. Crecimiento y Mortalidad:	14
IV.1.5. Importancia ecológica:	16
IV.1.6. Composición nutricional y rendimiento:	17
IV.2. Pesquería del Perico:	18
IV.2.1. Legislación:	18
IV.2.2. Información básica sobre la pesquería de perico.	19
IV.2.3. Exportaciones:	23
IV.3. Definición de Stocks	24
IV.3.1. Definición	24
IV.3.2. Técnicas de identificación de stocks pesqueros	25
IV.4. Conceptos básicos de genética y genética de poblaciones:	26
IV.4.1. Conceptos básicos	26
IV.4.2. Marcadores moleculares utilizados en genética de poblaciones	29
IV.4.3. Medidas de la diversidad genética y estructura poblacional	32
IV.4.4. Generalidades en genética de poblaciones en recursos pesqueros altamente migratorios y detalles específicos de <i>Coryphaena hippurus</i> que lo diferencian del resto de recursos migratorios:	34
IV.5. Trabajos previos en genética de poblaciones de <i>C. hippurus</i>	35
V. Materiales y métodos:	37
V.1. Toma de muestras:	37

V.2. Extracción de ADN: _____	41
V.3. Amplificación y registro de alelos de microsatélites. _____	42
V.4 Procesamiento y análisis de datos. _____	48
V.4.1. Análisis de la diversidad genética _____	49
V.4.2.Estructura poblacional _____	50
VI. Resultados y discusión: _____	53
VI.1. Amplificación y registro de Alelos _____	53
VI.2. Procesamiento y análisis de datos _____	54
VI.2.1. Análisis de la diversidad genética: _____	54
VI.2.2 Estructura poblacional _____	64
VII. Conclusiones: _____	74
VIII. Recomendaciones: _____	75
IX. Referencias bibliograficas: _____	76
X. Anexos _____	87

## Índice de tablas

Cuadro 1: Parámetros de crecimiento determinados para Perico en diferentes regiones del pacífico sureste.

Cuadro 2: Rendimientos de los principales cortes en Perico.

Cuadro 3: Principales puntos de desembarques de perico en Perú, entre 2009 a 2012.

Cuadro 4: Detalles de las colectas de tejido de *C. hippurus* obtenido entre enero y febrero de 2014. (Calas: 1: Chimbote, 2: Casma, 3: Huanchaco, 4: Sechura, 5: Végueta, 6: Ica sur y 7: Tacna sur)

Cuadro 5: Sexo y talla promedio a la horquilla de los individuos de *C. hippurus* muestreados.

Cuadro 6: Distribución de las muestras en placas de 96 pocillos para PCR

Cuadro 7: Lista de *primers* utilizados para cada locus. F: secuencia *forward* y R: secuencia *reverse*.

Cuadro 8: Concentraciones finales usadas para la amplificación de cada uno de los locus de microsatélites

Cuadro 9: Temperaturas de alineamiento para los 5 loci de microsatélites de perico.

Cuadro 10: Porcentaje de muestras registradas con éxito en 5 loci de microsatélites de *Coryphaena hippurus*.

Cuadro 11: Presencia de alelos nulos, por locus y población, detectados y corregidos por el programa Micro-Checker.

Cuadro 12: Resumen de la diversidad genética para 5 loci de microsatélites en 7 puntos de muestreo de perico en el océano pacífico sureste con el análisis de alelos nulos realizado por el programa Micro-Checker.

Cuadro 13: Alelos privados por población y locus. Entre paréntesis la frecuencia alélica.

Cuadro 14: Comparaciones entre pares de loci del test de desequilibrio por ligamiento realizado en GenePop v. 4.3.

Cuadro 15: Índice de fijación – Fis (Weir y Cockerman) para cada una de las 25 pruebas para medir desequilibrio del modelo H-E.

Cuadro 16: Fst y p value de las comparaciones realizadas entre pares de poblaciones.

Cuadro 17: Análisis Molecular de Varianza – AMOVA entre las poblaciones muestreadas de *Coryphaena hippurus* en el océano pacífico peruano.

Cuadro 18: Análisis Molecular de Varianza – AMOVA formando dos grupos: 1.- Tacna Sur y 2.- Todas las demás poblaciones de *Coryphaena hippurus* en el océano pacífico peruano.

## Índice de figuras

Figura 1: Distribución a nivel mundial del recurso *Coryphaena hippurus*.

Figura 2: Desembarques anuales en toneladas métricas de Perico en Perú desde el año 2000 hasta el 2012.

Figura 3: Desembarques históricos de perico a nivel mundial.

Figura 4: Número de embarcaciones periqueras construidas por año a lo largo del tiempo.

Figura 5: Desembarques de Perico según destino de consumo entre el año 2000 y 2012.

Figura 6: Principales países a los que Perú exportó perico entre el 2010 y 2014.

Figura 7: Pruebas realizadas para definir la diversidad genética y la estructuración poblacional.

Figura 8: Numero de alelos por cada punto muestral.

Figura 9: Número total de alelos por cada locus.

Figura 10: Heterocigosidad observada vs Heterocigosidad esperada para cada Loci, con y sin corrección con Microchecker.

Figura 11: Heterocigosidad observada vs Heterocigosidad esperada para cada población, con y sin corrección con Microchecker.

Figura 12: Desembarques en Chile en las Regiones XV: Arica y Parinacota, I: Tarapacá, II: Antofagasta y III: Atacama.

Figura 13: Temperatura Superficial del Océano Pacífico Sureste entre octubre y diciembre de 2013.

Figura 14: Temperatura Superficial del Océano Pacífico Sureste entre enero y febrero de 2014.



Figura 15: Gráfica logaritmo de la probabilidad de data  $L(k)$  y su desviación estándar a lo largo de los posibles números de *clusters* ( $k$ ).

Figura 16: Gráfica de la variación de  $k$  a lo largo de los posibles números de clusters evaluados.

Figura 17: Gráfica de probabilidades, por región muestreada (1: Chimbote, 2: Casma, 3: Huanchaco, 4: Sechura, 5: Végueta, 6: Ica sur y 7: Tacna sur), bajo el supuesto de que hay dos poblaciones ( $k = 2$ ).

Figura 18: Análisis de componentes principales (PCA) en las muestras de *Coryphaena hippurus* del pacífico peruano. 1: Chimbote, 2: Casma, 3: Huanchaco, 4: Sechura, 5: Végueta, 6: Ica sur y 7: Tacna sur

## **Índice de Anexos**

ANEXO 1: Protocolo de extracción de ADN con buffer de extracción de Chris-lysis (método modificado de Laird P. W. *et al*, 1991)

ANEXO 2: Protocolo de extracción de ADN usando Fenol-Cloroformo.

ANEXO 3: Cantidad y calidad de ADN medido en un biofotómetro Eppendorf

ANEXO 4: Imagen que muestra las imágenes generadas por el equipo LiCor de los alelos de microsatélite que presentan diferentes individuos para un locus determinado.

ANEXO 5: Resultado del escoreo de alelos en el programa SAGA GT, por individuo en cada locus.

## II. Resumen

El perico (*Coryphaena hippurus*) es un predador tope oportunista, cosmopolita, de rápido crecimiento y madurez y alta fecundidad. Perú, entre el 2008 y 2012, ha mantenido desembarques anuales del orden del 50% del total mundial. A pesar de la importancia de esta pesquería, tanto para la seguridad alimentaria del país como para las exportaciones pesqueras, ésta no cuenta con un plan de manejo y no se han definido científicamente los stocks pesqueros, base para delimitar la(s) población(es) a ser manejada(s). En este estudio se colectaron 241 muestras de tejido en las principales zonas de pesca en siete localidades del pacífico peruano (Sechura, Huanchaco, Chimbote, Casma, Végueta, Ica Sur y Tacna Sur) durante los meses de enero y febrero del año 2014. Se amplificaron y genotipificaron cinco loci de microsatélites polimórficos para cada uno de los individuos de estas localidades y se calcularon índices de diversidad genética y estructuración poblacional. Los resultados mostraron una alta diversidad genética, indicio de buena salud genética del recurso. El análisis  $F_{st}$  por pares de poblaciones y los análisis moleculares de varianza – AMOVAs mostraron estructuración poblacional sutil pero significativa ( $F_{st} = 0,009$  y  $p\text{-value} = 0,000$ ). El sur del país mostró niveles significativos de diferenciación con respecto al resto de localidades ( $0,0093 < F_{st} < 0,0287$  y  $p\text{-value} = 0,000$ ). Los análisis de asignación bayesiana sugirieron estructuración poblacional en dos *clusters*. El análisis de componentes principales (PCA) falló en el agrupamiento por componentes, no mostrando evidencias de existencia de más de una subpoblación

Palabras clave: Perico, *Coryphaena hippurus*, genética de poblaciones, océano pacífico sureste, manejo pesquero, definición de stocks.

## Summary

Mahi mahi (*Coryphaena hippurus*) is an opportunistic and cosmopolitan top predator, which presents fast growth and maturity, as well as high fertility. Annual landings in Peru between 2008 and 2012 remained around 50% of the world total. Despite the importance of this fishery both for Peru's food safety as for its exports, it still does not have a management plan and fish stocks have not yet been scientifically defined, which is the basis to identify and establish the population(s) to be managed in the first place. In this study, 241 tissue samples were collected in seven localities of the Peruvian coast (Sechura, Huanchaco, Chimbote, Casma, Végueta, South of Ica and South of Tacna), between January and February of 2014. To measure genetic diversity and population structure from these samples, five highly polymorphic microsatellite loci were amplified and genotyped for each individual, and indices of genetic diversity and population structure were calculated. The results showed high genetic diversity, indicating that in Peru mahi mahi has good genetic health. The pairwise  $F_{st}$  analysis of populations and analysis of molecular variance - AMOVAs showed a subtle but significant population structure ( $F_{st} = 0.009$  and  $p\text{-value} = 0.000$ ). Tacna Sur showed significant levels of differentiation with respect to other locations ( $0.0093 < F_{st} < 0.0287$  y  $p\text{-value} = 0.000$ ). Bayesian analysis of population structure suggested allocation into two clusters. The principal component analysis (PCA) failed in the grouping components, showing no evidence of the existence of more than one subpopulation

Keywords: mahi mahi, *Coryphaena hippurus*, population genetics, South Pacific Ocean, fishery management, stock identification.

### III. Introducción

En Perú, la pesquería de perico es exclusiva para la pesca artesanal. Esta condición de artesanal no ha impedido el desarrollo de una flota con capacidad de navegar en alta mar en viajes de larga duración. Hay registros de pesca más allá de las 200 millas náuticas de distancia a la costa en viajes de más de 20 días de duración. Por otro lado, es una de las especies más desembarcadas por el sector pesquero artesanal peruano, representando valores que en los últimos años fluctúan alrededor del 50% del total mundial. Por lo mismo es una importante fuente de divisas, tanto por exportaciones como por la comercialización interna. A su vez sostiene las economías de muchas familias peruanas y contribuye significativamente a la seguridad alimentaria del país.

Para manejar esta pesquería de manera sostenible, es fundamental conocerla en sus diferentes planos: biológico, pesquero, socioeconómico y ambiental. En nuestro país se ha avanzado poco en generar sistemas de manejo efectivos para las pesquerías artesanales. La falta de priorización por parte de los organismos gubernamentales responsables es evidente. Sin embargo en los últimos años se han realizado esfuerzos puntuales para el estudio poblacional de *C. hippurus* y de su realidad pesquera por parte del Instituto del Mar del Perú y del Ministerio de la Producción. Por su parte, la Comisión Interamericana del Atún Tropical – CIAT tiene interés por articular el manejo supranacional de este recurso altamente migratorio.

La identificación de stocks es un tema fundamental en las ciencias pesqueras; sin embargo, en la práctica muchas veces es considerada como poco relevante o prescindible. El presente trabajo parte de la premisa que considera la identificación de stocks como un pre requisito para realizar una evaluación y manejo de una pesquería; debido a la necesidad de delimitar, a ciencia cierta, la unidad a manejar y/o conservar. A pesar de haberse desarrollado múltiples técnicas, este tema sigue siendo secundario en el árbol de prioridades de investigación pesquera de muchos recursos, debido al esfuerzo que significa para las ciencias marinas delimitar poblaciones que no son visibles a simple vista, que tienen una movilidad amplia y barreras geográficas poco claras. Sin embargo, este reto hace de este tema un nicho atractivo para los investigadores y manejadores pesqueros.

Este trabajo es un esfuerzo por contribuir con el conocimiento de la genética poblacional de esta importante especie en Perú y con esto ayudar a delimitar el objeto de estudio para realizar un manejo pesquero adecuado del perico. Para cumplir este objetivo se determinaron diversas medidas de diversidad y estructura genética del perico (*Coryphaena hippurus*), mediante la amplificación y análisis de 5 marcadores microsatelitales de ADN nuclear en 241 muestras de tejido colectadas en las principales zonas de pesca del mar peruano.

## IV. Revisión de literatura

### IV.1. Aspectos bio-ecológicos del Perico:

#### IV.1.1. Taxonomía y generalidades:

De acuerdo con Palko *et al.* (1982), *Coryphaena* es el único género de la familia Coryphanidae, y está compuesto de dos especies: *C. equiselis* y *C. hippurus*. Esta última, comúnmente denominada Perico, la especie de estudio del presente trabajo de tesis. Ésta se ubica taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino:	Animalia.
Phylum:	Chordata.
Subphylum:	Vertebrata.
Super clase:	Gnathostomata.
Clase:	Osteichthyes.
Subclase:	Actinopterygii.
Orden:	Perciformes.
Sub orden:	Percoidei.
Familia:	Coryphaenidae.
Género:	<i>Coryphaena</i> .
Especie:	<i>Corypahena hippurus</i> , Linnaeus1758.

Esta especie se conoce comúnmente como perico, dorado, lampuga, palometa, *common dolphinfish*, *mahi mahi*, entre otros (FAO, 2015b).

#### IV.1.2. Distribución y hábitat:

Esta especie es epipelágica, de natación rápida y están distribuidos a nivel mundial en aguas tropicales y subtropicales en los océanos atlántico, el mar mediterráneo índico y pacífico (figura 1, FAO, 2015b, Collette, 1999). Su distribución está restringida a la isoterma de 20°C (Palko *et al.* 1982). Su distribución está relacionada con las masas de aguas subtropicales superficiales (ASS), las cuales son aguas cálidas de alta densidad: salinidad mayor a 35,100 ups y temperaturas mayores a 23 °C (Solano *et al.*, en prensa).

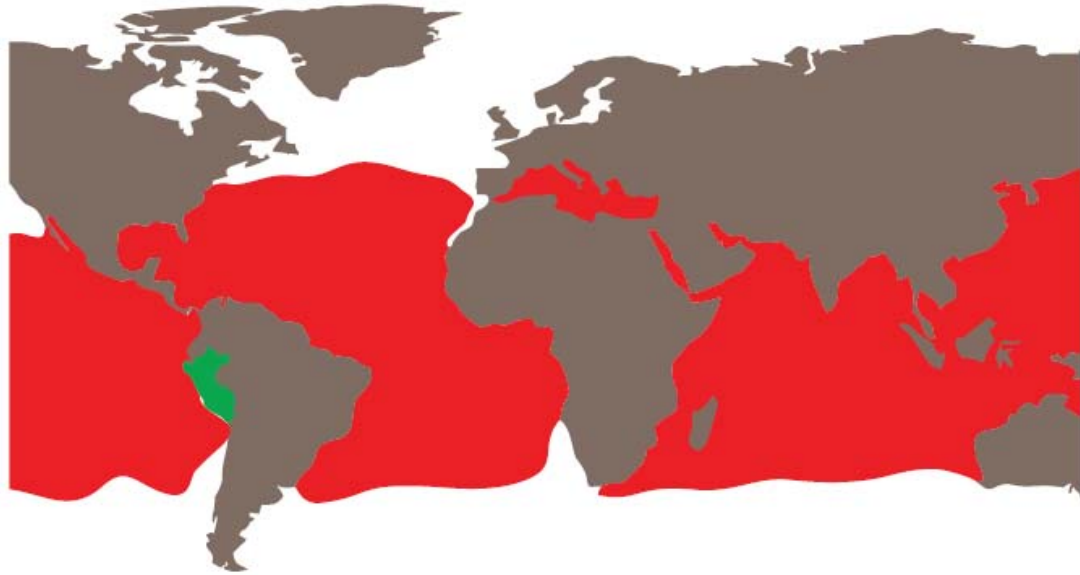


Figura 1: Distribución a nivel mundial de recurso *Coryphaena hippurus* (FAO, 2015b).

Es una especie circumtropical con amplios desplazamientos (Solano *et al*, 2008) y se presume como especie altamente migratoria (Oxenford, 1999). Se encuentra en aguas tropicales y subtropicales en los océanos Atlántico oeste (Golfo de México y Mar del Caribe) y este (desde Canarias hasta Angola), Índico (excepto el mar rojo), Mediterráneo y pacífico (FAO, 2015b). En el Pacífico oriental se distribuye desde San Diego – California en Estados Unidos hasta Antofagasta en Chile. En el Perú se presenta a lo largo de la costa, asociado a aguas cálidas (Solano *et al*, 2008). Vive en aguas de temperatura de 21 – 30 ° C (FAOb, 2015), pudiendo estar en aguas oceánicas o costeras (Solano *et al*, 2008, FAO, 1994, Collette, 1999)

Un detalle adicional es que esta especie sigue a las embarcaciones y forma pequeñas concentraciones bajo objetos flotantes (Collette, 1999), cómo lo son los FADs (*fish aggregating devices* o dispositivos de concentración de peces) (FAO, 1994)



#### IV.1.3. Madurez y reproducción:

Son organismos heterosexuales. El dimorfismo sexual se nota en la forma de la cabeza: los machos tienen la frente muy pronunciada en comparación de las hembras, que la tienen más aerodinámica. Esta diferencia se empieza a notar a partir de los 40 centímetros de longitud horquilla (Palko *et al.* 1982).

El Perico comienza su madurez a los 35 cm de longitud horquilla (LH) y llega a la madurez total a los 55 cm LH (Beardsley, 1967 en Palko *et al.*, 1982). Es considerada como una especie de madurez temprana (Oxenford, 1999). Se han identificado 6 estadios ováricos: I.- Crecimiento primario, II.- Crecimiento secundario, III.- Crecimiento terciario, IV.- Maduración, V.- Desove y VI.- Post-desove. (Lavayen, F. 2014)

La fertilización es externa (Palko, *et al.*, 1982). Se cree que esta especie tiene un alto ratio reproductivo, debido a que tiene una larga temporada de desove, madura a temprana edad y un tiempo de vida muy corto (Beardsley, 1967 y Rose y Hassler 1968<sup>a</sup> en Palko, *et al.* 1982).

Generalmente son más abundante los especímenes hembra que los macho. Solano *et al* (en prensa) y Solano *et al* (2008) señalan que la proporción sexual hembra-macho es igual a 2:1.

Presenta desoves parciales y se cree que la fecundidad parcial (número de ovocitos) está directamente influenciada por la temperatura superficial del mar - TSM. (Mero, P. 2014). Mientras mayor es la temperatura, mayor la fecundidad. Además, Lavayen, F. (2014) postula que si las condiciones ambientales se mantienen óptimas, la reproducción en aguas ecuatoriales se mantiene durante todo el año. Solano *et al* (en prensa) encontró para el área norte de Perú una fecundidad relativa igual a 56 ovocitos/gramo de peso corporal y un promedio de 324 416 ovocitos por tanta de desove.

#### IV.1.4. Crecimiento y Mortalidad:

Es una especie de crecimiento rápido (Oxenford, 1999), cuerpo elongado y comprimido (Collette, 1999). Vive hasta un máximo de 4 años (Beardsley 1967 en Palko *et al.* 1982). Solano *et al* (en prensa) indican que especímenes de un año de edad miden en

promedio más de 100 cm. La máxima longitud es de más de 2,1 metros y la longitud común de captura es de 100 cm (Collette, 1999).

Para estimar la tasa de crecimiento en especies marinas se utiliza la ecuación de Von Bertalanffy (1934) es un modelo matemático para el crecimiento individual que ha demostrado ser ajustable a la mayoría de las especies de peces. Esta ecuación considera la talla del cuerpo del pez como una función de su edad; además usa los parámetros  $L_{\infty}$  (talla media de un pez muy viejo o la talla a la cual la tasa de crecimiento es igual a cero),  $k$  (rapidez con la que el pez alcanza su  $L_{\infty}$ ) y  $T_0$  (parámetro de condición inicial. No tiene significado biológico). (Sparre, P. y Venema, S. C. 1997). En el Cuadro 1 se han compilado los parámetros de crecimiento obtenidos para el perico en diferentes regiones del pacífico peruano y ecuatoriano.

Cuadro 1: Parámetros de crecimiento de *Coryphaena hippurus* en diferentes zonas del océano pacífico. (M = Macho, H = Hembra, A = Macho y Hembra, n = Número de individuos muestreados,  $\phi$  = índice de performance y Ref. = Referencia)

Zona	Sexo	n	$L_{\infty}$	K	$T_0$	$\phi$	Ref.
Manta Ecuador	M	941	141.8	0.73	-0.68	4.17	Rivadeneira, Y. 2014.
	H	1107	125.8 cm	0.9	-0.70	4.15	Rivadeneira, Y. 2014.
	A	2048	140.5 cm	0.67	-0.82	4.12	Rivadeneira, Y. 2014.
Zona norte de Perú	H	-	148.92 cm	1.081	-0.076	4.38	Solano <i>et al.</i> En prensa
	M	-	169.75 cm	0.893	-0.115	4,40	Solano <i>et al.</i> En prensa
Perú	M	-	145.79	1.5	-0.52	4.05	Solano <i>et al.</i> 2008

			cm				
	H		161.89 cm	0.98	-0.4	4.41	Solano <i>et al.</i> 2008

Solano *et al* (en prensa) encontraron una tasa de mortalidad total (Z) para hembras de 1,498/año, siendo la mortalidad natural (M) 1,305/año y la mortalidad por pesca (F) 0.193/año. Mientras que el estudio de Solano *et al* (2008) encontró un Z= 2,64/año, M= 0,86/año y F=1,78/año.

En machos, Solano *et al* (en prensa) encontraron una tasa de mortalidad total (Z) de 1,425/año, siendo la mortalidad natural (M) 1,282/año y la mortalidad por pesca (F) 0.143/año. Mientras que el estudio de Solano *et al* (2008) encontró un Z= 2,08/año, M= 0,69/año y F=1,39/año.

#### IV.1.5. Importancia ecológica:

*C. hippurus* es un predador tope oportunista (Palko, *et al* 1982) y de voraz apetito (Beardsley, 1967 y Rose y Hassler 1968<sup>a</sup> en Palko, *et al.* 1982). Sus principales presas son peces en general, cefalópodos y crustáceos (Solano *et al*, en prensa, FAO, 2015); teniendo preferencias en la zona norte de Perú por *Exocoetus volitans* y *Argonauta sp.* (Solano *et al*, en prensa). En otro trabajo Solano *et al* (2008) señalan adicionalmente al calamar *Logigo gahi* como una presa principal. También se alimenta de juveniles de otras especies epipelágicas oceánicas, de juveniles y adultos de especies pelágicas pequeñas, de especies mesopelágicas que muestran migraciones diurnas hacia la superficie y de las fases pelágicas de larvas y juveniles de especies bentónicas neríticas, lo cual sostiene la teoría de que este predador es más oportunista que selectivo, lo cual es común en especies tropicales pelágicas (Oxenford, 1999).

Estudios no publicados del Instituto del Mar del Perú han evaluado el contenido estomacal del perico desde el año 1998 hasta la actualidad, dichos estudios describen la composición de la dieta del perico de acuerdo a la talla y la distancia a la costa. Se ha encontrado que en el perico de 30 a 90 cm de longitud horquilla (LH), capturado hasta 80

millas náuticas (mn) de distancia a la costa, se presenta la anchoveta *Engraulis ringens* como un componente importante en la dieta. Mientras que en el perico adulto mayor de 90 cm de LH, capturado entre 90 y 170 mn millas náuticas de distancia a la costa, los peces voladores de la familia Exocoetidae fueron las presas dominantes. (Ana Alegre - IMARPE, Comunicación personal).

En un estudio realizado para pericos pertenecientes a la zona norte de Perú se determinó que el consumo diario de alimento por individuo fue de 472,7 gramos, lo que es equivalente al 7,4% de su peso corporal. (Solano *et al*, en prensa).

#### IV.1.6. Composición nutricional y rendimiento:

El Perico es una especie que en promedio tiene 19% de proteína, 4% de grasas, 1% de sales minerales y 76 % de agua (ITP/IMARPE, 1996). El Instituto Tecnológico Pesquero (ITP) en conjunto con el Instituto del Mar del Perú (IMARPE) en el año 1996, determinaron los rendimientos al trozar la especie, los cuales se detallan en el cuadro 2. Se entiende por rendimiento al porcentaje que queda luego del corte, respecto al pescado entero en su estado original.

Cuadro 2: Rendimientos de los principales cortes en Perico. (ITP/IMARPE, 1996)

<b>Corte del pescado</b>	<b>Porcentaje</b>
Eviscerado	83 - 88 %
Eviscerado y descabezado	60 - 69 %
Filete con piel	47 - 54 %
Filete en corte mariposa	65 - 70 %
Pulpa sin lavar	36 - 40 %
Surimi	21 - 25 %
Filete ahumado en corte mariposa	48 - 52 %

## IV.2. Pesquería del Perico:

### IV.2.1.Legislación:

El artículo 10 de la Ley General de Pesca de Perú, Decreto Ley N° 25977, postula que el ordenamiento pesquero es el conjunto de normas y acciones que permiten administrar una pesquería, sobre la base del conocimiento actualizado de sus componentes biológicos - pesqueros, económicos y sociales. Asimismo en el artículo 5 de su reglamento, Decreto Supremo N° 012-2001-PE, señala que el ordenamiento pesquero se aprueba mediante reglamentos. El Reglamento de Ordenamiento Pesquero – ROP tiene por finalidad establecer los principios, normas y medidas regulatorias aplicables a los recursos hidrobiológicos que deban ser administrados. Asimismo un ROP debe definir los objetivos del ordenamiento y, según sea el caso, el régimen de acceso, capacidad total de flota y procesamiento, temporadas de pesca, captura total permisible, artes, aparejos y sistemas de pesca, tallas mínimas, zonas prohibidas, requerimiento de investigación y acciones de control y vigilancia.

En la actualidad *Coryphaena hippurus* no cuenta con un ROP; sin embargo tiene algunas medidas de manejo como el establecimiento de la temporada de pesca y de veda, señalado en la Resolución Ministerial N° 245-2014-PRODUCE. Mediante este documento se establece que la temporada de pesca para el recurso perico se da desde el 01 de octubre de cada año hasta el 30 de abril del año siguiente, quedando prohíba su captura en el Perú entre mayo y septiembre de cada año. También se cuenta con la Resolución Ministerial N° 249-2011-PRODUCE que establece la talla mínima de captura en 70 centímetros de longitud horquilla con una tolerancia máxima de juveniles del 10%.

Además de la legislación nacional, vale la pena mencionar que este recurso al ser una especie altamente migratoria, es de interés de organismos supranacionales como la Comisión Interamericana del Atún Tropical – CIAT, organismo que recientemente celebró su primera reunión técnica sobre este recurso (del 14 al 16 de octubre de 2014 en Manta, Ecuador). En las memorias de esta reunión (CIAT, 2014) se señalan los siguientes objetivos: 1.- promover la sinergia en los Miembros de la CIAT para una investigación regional del recurso en el océano pacífico oriental – OPO, 2.- revisar la situación actual con

respecto a los conocimientos del dorado e identificar los conjuntos de datos disponibles en las pesquerías/regiones del OPO; y 3.- formular un plan de investigación colaborativa futura.

Es positivo el establecimiento de comisiones supranacionales para contribuir a la evaluación de recursos cuyo stock pesquero abarquen más de un país, como es el caso del perico. El stock en toda su magnitud, es la unidad básica sobre la cual deben sostenerse las evaluaciones y medidas de manejo (Cubillos, 2005) y deben abarcarse en su totalidad para establecer niveles de captura sostenibles (Ward, 2000). Se recomienda hacer un manejo coordinado del recurso cuando existe evidencia de la existencia de stocks compartidos entre naciones (Oxenford y Hunte, 1986).

#### IV.2.2. Información básica sobre la pesquería de perico.

En Perú, la pesca de altura es una actividad limitada al ámbito artesanal y es realizada por embarcaciones de hasta 32,6 m<sup>3</sup> de capacidad de bodega. Las principales especies de este rubro son la pota y el perico, especies que a pesar de requerir artes de pesca distintos, generalmente se extraen con las mismas embarcaciones. Éstas en conjunto, en el año 2012, representaron más del 52.5% del total desembarcado destinado a consumo humano directo en Perú (PRODUCE, 2012).

Históricamente los desembarques de perico han estado relacionados con el evento El Niño (1983, 1987 y 1998) (Solano *et al* 2008). Sin embargo no se dio un crecimiento de la pesquería de perico hasta el año 2000, desde donde se han ido incrementando constantemente los desembarques hasta la actualidad, llegando en 2012 a su pico máximo de desembarques, habiéndose registrado alrededor de 58 961 toneladas (Figura 2). Esta pesquería se realiza principalmente usando espineles como arte de pesca principal (Ayala y Sánchez-Scaglioni, 2014), los cuales son acomodados en líneas de anzuelos o *longlines* que pueden fluctuar entre 1000 y 3000 anzuelos de largo. Se considera al perico como un recurso de oportunidad debido a que esta pesquería se da solo en los meses de primavera y verano, debido a la incursión por estacionalidad de aguas subtropicales superficiales – ASS (Solano *et al*, en prensa). Los desembarques peruanos se registran tanto en la zona económica exclusiva como en aguas internacionales, principalmente entre los 5° y 14°S y

los 17° y 18°S de latitud. Por último se destaca que esta actividad ha llegado a realizar lances de pesca lejos de la costa; Ayala y Sánchez-Scaglioni (2014) han registrado pesca a 1320 km de distancia de la costa (712 millas náuticas).

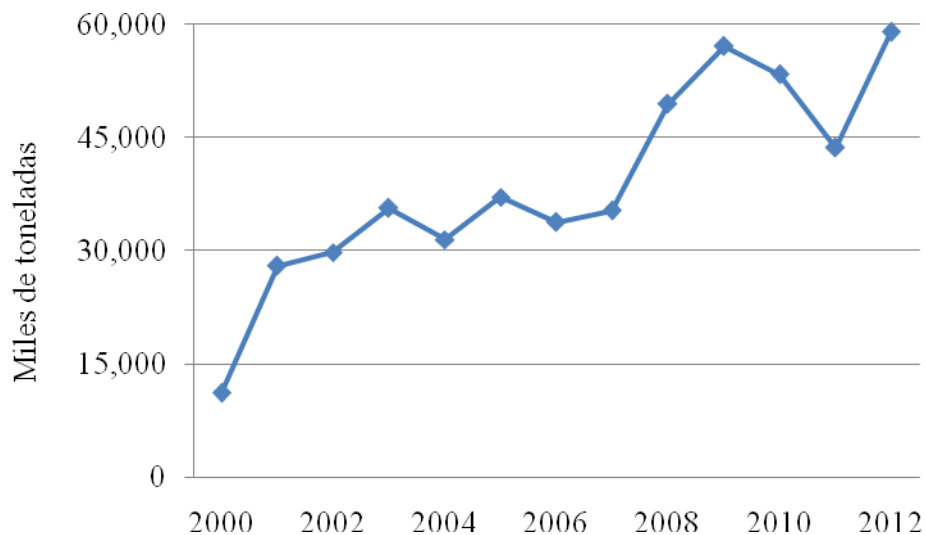


Figura 2: Desembarques anuales en toneladas métricas de Perico en Perú desde el año 2000 hasta el 2012 (PRODUCE, 2012).

Según datos de los desembarques de recursos hidrobiológicos marítimos, dados por la Dirección de Políticas y Desarrollo Pesquero (DEDEPA) – Ministerio de la Producción (PRODUCE), este monto se distribuyó principalmente entre los puertos de Paita (10 987 toneladas), Pucusana (7783 toneladas), Coishco (6664 toneladas), Matarani (5056 toneladas), Ilo (5035 toneladas), Chimbote (4968 toneladas) y Callao (4963 toneladas) (cuadro 3).

Cuadro 3: Principales puntos de desembarques de perico en Perú, entre 2009 a 2012. (PRODUCE – DGP, 2014). Datos en toneladas.

Punto de desembarque	2009	2010	2011	2012
Paita	9225	25471	22812	10987
Chimbote	10200	1268	2351	4968
Ilo	4847	5308	2130	5035
Pucusana	4799	3151	2137	7783
Callao	4615	5229	4189	4963
Matarani	4175	4157	17	5056
Coishco	3954	638	3685	6664
Caleta La Cruz	1240	51	4	239
Végueta	2810	0	2485	3146
Total Nacional	57154	53358	43688	58961

Según el primer Censo Nacional de la Pesca Artesanal del ámbito Marítimo, realizado en 2012, la flota en ese año fluctuaba alrededor de las 2141 embarcaciones (INEI-PRODUCE, 2012a) y el número de pescadores especializados en este recurso fue de 4269 personas (INEI- PRODUCE, 2012b).

Perú es un país clave para el desembarque de este recurso a nivel mundial. En el año 2012, último registrado en las estadísticas FAO (2014 y 2015a) capturó el 51,3% del total mundial; mientras que los países que le siguen, Ecuador y Taiwán, representaron 14% y 9% respectivamente. (FAO 2014, figura 3). Además, la consolidación de Perú como país productor de perico es reciente, no es, si no luego del fenómeno El Niño de los años 1997-1999 que se desarrolla una flota especializada en la captura de este recurso (figura 4); en el año 2011 se construyeron 253 embarcaciones, mientras que en el año 2000 solo 39. Ayala y Sánchez-Scaglioni (2014) señalan que las capturas de perico se incrementaron significativamente después de 1998 debido al aumento en el tamaño de la flota. Una característica importante de esta pesquería es que este recurso presenta una estacionalidad en sus desembarques bien marcada en épocas de verano y primavera. Este patrón se ha



cumplido a lo largo de la historia en todos los diferentes puntos de desembarque del país (De La Puente *et al*, 2015).

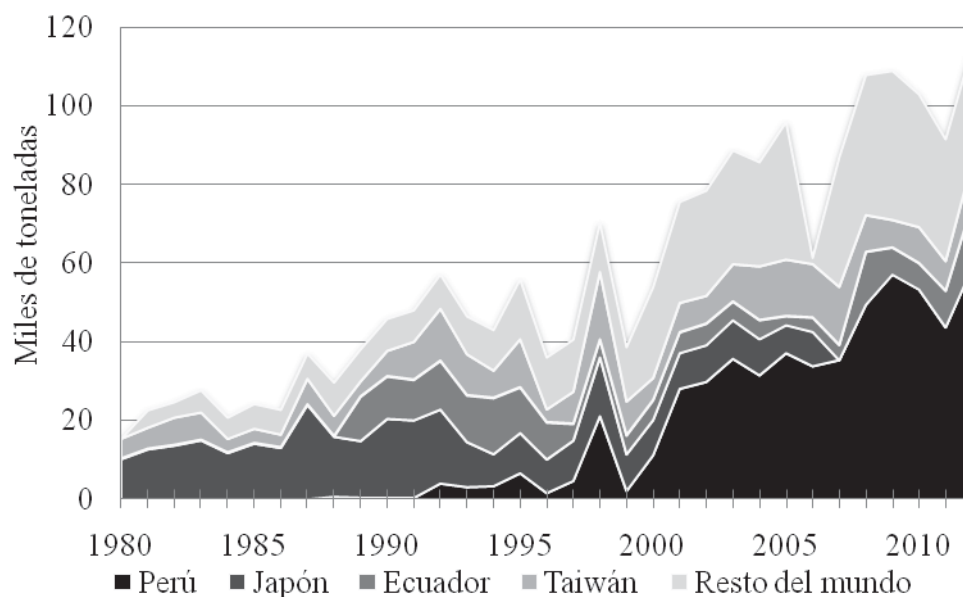


Figura 3: Desembarques históricos de perico a nivel mundial (FAO 2014)

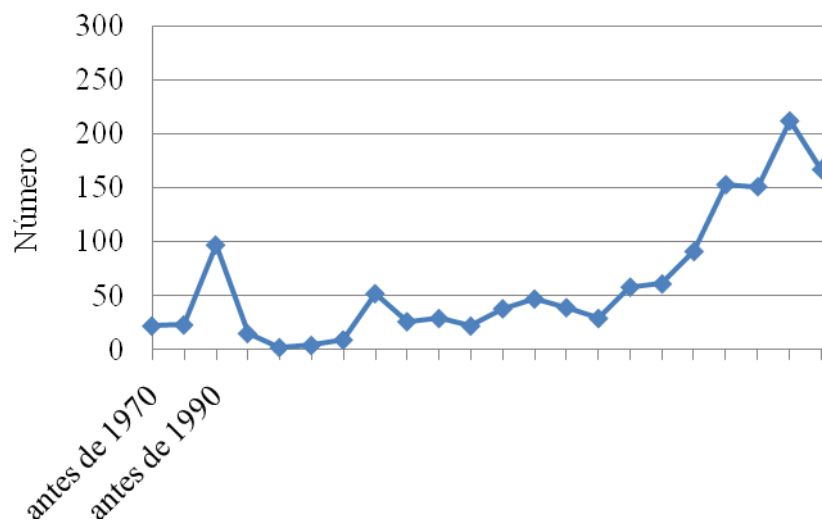


Figura 4: Número de embarcaciones periqueras construidas por año a lo largo del tiempo (PRODUCE, 2015)

Es importante mencionar que esta especie tiene dos usos principales de consumo: en estado fresco y congelado (Figura 5), el primero principalmente destinado al consumo interno a nivel nacional y el segundo reservado para la exportación.

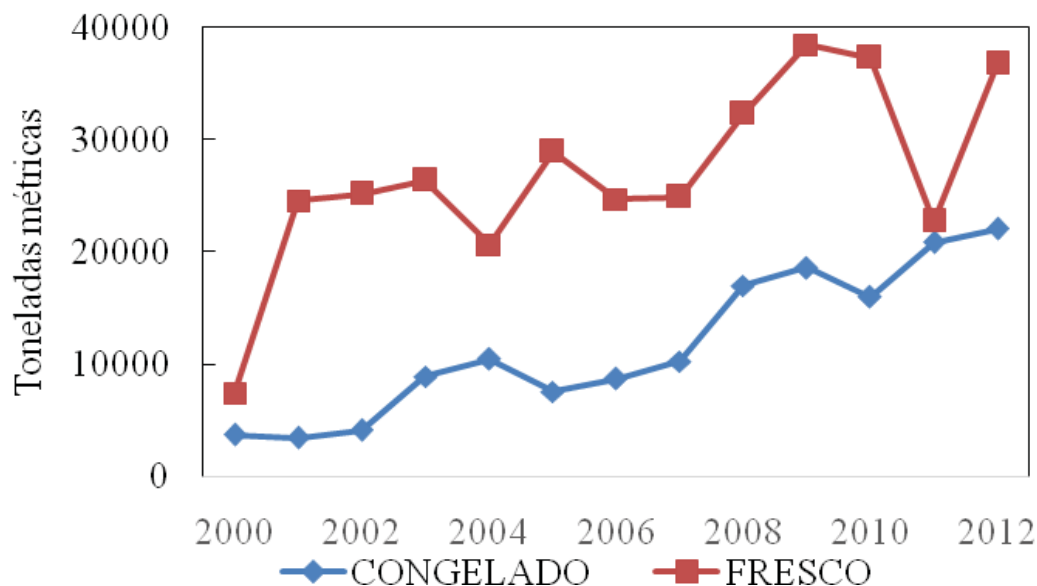


Figura 5: Desembarques de Perico según destino de consumo entre el año 2000 y 2012. (PRODUCE – DGP, 2014)

#### IV.2.3.Exportaciones:

En el año 2014, el perico significó el 7% del total de productos pesqueros exportados en el rubro congelado. En dinero se obtuvieron divisas equivalentes a 73.2 millones de dólares FOB y el mercado fue dominado por Estados Unidos de Norteamérica con un 70% de participación. Le siguen Venezuela con 9, Guadalupe con 6% y Brasil con 5%. En peso se registraron alrededor de 12,5 mil toneladas métricas en exportaciones (PROMPERU, 2015). En los últimos años Estados Unidos de Norteamérica ha sido el mayor comprador de perico peruano, dejando a Venezuela en un segundo lugar con una amplia diferencia (figura 6). Un comprador potencial de perico es Brasil, quien recién ha aparecido en el espectro el año 2012 y ha pasado de no importar perico a Perú a hacerlo en el 2014 por un monto de 3.3 millones de dólares FOB.

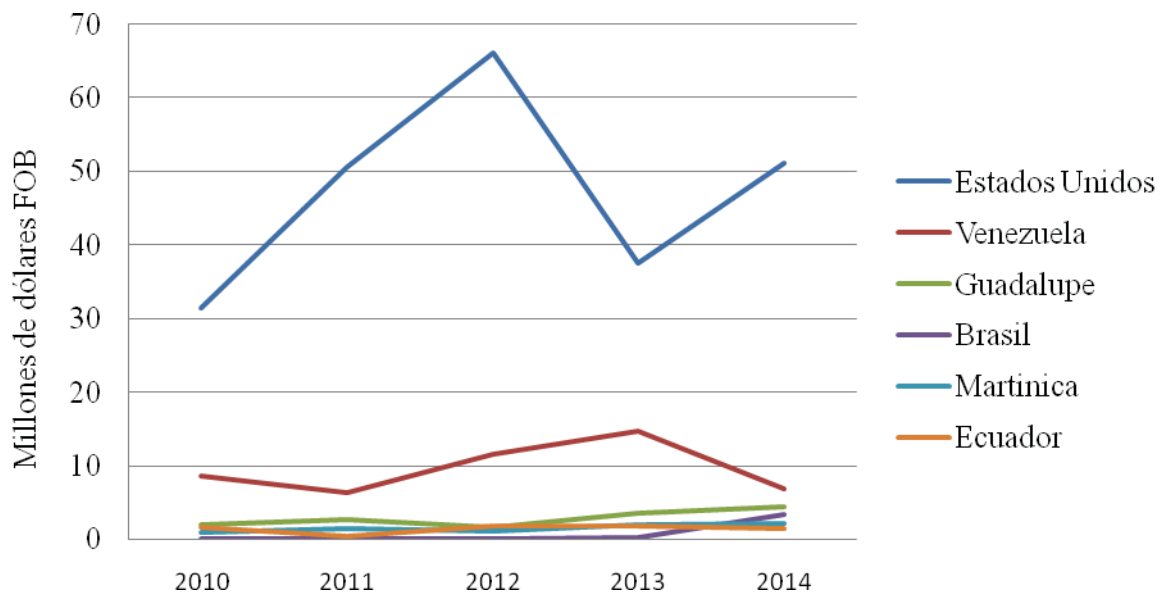


Figura 6: Principales países a los que Perú exportó perico entre el 2010 y 2014 (PROMPERU, 2015; PROMPERU, 2014; PROMPERU, 2013; PROMPERU, 2012 y PROMPERU, 2011).

#### IV.3. Definición de Stocks

##### IV.3.1. Definición

La identificación de stocks es un tema central en las ciencias pesqueras y es un pre requisito para la evaluación y manejo de los mismos (Cadrin *et al*, 2014). Si hablamos de conservar especies amenazadas, la identificación de stocks nos sirve para definir la unidad a conservar; mientras que al hablar de pesquerías, nos sirve para definir la unidad a manejar (Baker y Pichler, 2009). La justificación más simple para entender la importancia de definir stocks es el que son necesarios para la evaluación de recursos hidrobiológicos, dado que los modelos poblacionales asumidos parten de tener grupos de poblaciones definidos (stocks), los cuales tienen parámetros vitales homogéneos (crecimiento, madurez, mortalidad, etc.), además de un ciclo de vida cerrado (Cadrin *et al*, 2014). Por ejemplo, no se podría estimar el rendimiento máximo sostenible, un concepto básico en manejo pesquero que consiste en ser la fracción de la biomasa que puede explotarse sin poner en riesgo el stock, si es que antes este no se le ha delimitado.

En el caso de especies marinas es especialmente difícil delimitar unidades poblacionales debido a que usualmente hay una obvia ausencia de barreras geográficas. (Baker y Pichler, 2009) o estas no son identificables a simple vista, como si lo podrían ser para especies del ámbito terrestre. Por esta razón se hace más necesario el recurrir a técnicas indirectas de identificación de stocks pesqueros: pruebas genéticas, morfométricas, de marcaje u otras.

Desde el punto de vista genético, un stock es una unidad reproductivamente aislada que es genéticamente distinta. (Kochzius 2009). Sin embargo una unidad de stock no debe solo ser concebida exclusivamente como una población definida desde el punto de vista biológico (ej: genético); hay que considerar también el aspecto operacional que contribuya a manejar adecuadamente una pesquería (Secor, 2014). Por tal razón Secor (2014) decide utilizar la definición de la *U.S. Magnuson Stevens Fisheries Conservation Act*, descrita en NOAA (2007), la cual define como stock a un grupo de especies, subespecies, agrupación geográfica de peces u otra categoría de agrupación de peces capaz de ser manejada como una unidad.

#### IV.3.2. Técnicas de identificación de stocks pesqueros

En la actualidad se han desarrollado diferentes técnicas de identificación de stocks pesqueros. Estas se complementan para tener mejores y más argumentos para justificar la existencia de uno o más stocks pesqueros de algún recurso en algún área específica. Líneas abajo se explican algunas de las técnicas usadas para la definición de stocks pesqueros; sin embargo existen muchas otras pruebas que pueden ser informativas para este tipo de estudio, por ejemplo, el estudio de las marcas de crecimientos en estructuras calcáreas (Brophy, 2014), la composición química de las partes duras de los peces (Keer y Campana, 2014), perfiles de ácidos grasos (Grahl-Nielsen, 2014), el uso de información de los estadios primarios de vida (Hare y Richardson, 2014), entre otras.

##### Morfométricas y merísticas

Cadrin (2014) postula que los patrones de variación morfométricas en recursos hidrobiológicos pueden indicar diferencias en el crecimiento y grado de madurez porque la forma del cuerpo es un producto de la ontogenia (formación y desarrollo del individuo

según el diccionario de la Real Academia de la lengua española). Para la identificación de stocks el análisis morfométrico provee información fenotípica del stock, que aunque es menos conservadora que las definiciones genéticas permite entender patrones poblacionales. Las medidas ontogénicas influyen muchos atributos de una población (ej: reproducción, fecundidad, longevidad, estructura de tallas, etc.), los cuales están íntimamente relacionados con las dinámicas poblacionales (capacidad de carga, productividad, resiliencia, etc.). Por su parte, las características merísticas son estructuras que pueden ser medidas (como medidas de longitud o el número de espinas y vértebras) y también son útiles para estudiar la discriminación de stocks porque pueden indicar que el desarrollo temprano ocurrió en áreas separadas o bajo diferentes condiciones (Chase, 2014).

#### Análisis parasitológicos

Mackenzie y Abaunza (2014) definen como principio fundamental del uso de parásitos en estudios poblacionales es que un pez puede infectarse con un parásito solo cuando está dentro del área endémica del parásito. Es decir en el área geográfica donde éste tiene condiciones favorables, bióticas y abióticas, para su transmisión y desarrollo de su ciclo de vida. Por este motivo esta técnica nos brinda información poblacional complementaria al resto de pruebas de definición poblacional.

#### Análisis genéticos.

Los análisis genéticos, entre otras cosas, permiten definir unidades de manejo o stocks (Moritz, 2002 en Rocha y Gasca, 2007; Kochzius 2009). Son herramientas importantes para determinar si stocks locales son distintos o para determinar el grado de flujo de individuos entre stocks (Warm, 2000).

#### IV.4. Conceptos básicos de genética y genética de poblaciones:

##### IV.4.1. Conceptos básicos

##### ADN

El ácido desoxirribonucleico, ADN, es un polímero de nucleótidos formados por un azúcar de cinco carbonos (desoxirribosa), una base nitrogenada (que puede ser adenina, timina, citosina o guanina) y una molécula de fosfato (Falcón y Valera, 2007). Esta macromolécula contiene la información genética, y la base química de la herencia (Harper *et al*, 1980), que luego se transcribirá en ARN para crear proteínas; las cuales son moléculas fundamentales en las células, dado que funcionan como enzimas, materiales estructurales, lubricantes, moléculas transportadoras, etc. (Harper *et al*, 1980)

PCR (*Polymerase Chain Reaction* o reacción en cadena de la enzima polimerasa)

Es una reacción en cadena que permite generar, con ayuda de un equipo modulador de temperaturas llamado termociclador, millones de copias de una región específica del ADN (Allendorf y Luikart, 2007). Esto se conoce como amplificación del ADN y consta de tres partes principales, las cuales se repiten cíclicamente para generar un incremento exponencial del número de secuencias amplificadas. Estas son: 1.- Desnaturalización: permite separar las dos hebras del ADN dejándolas como cadenas simples, 2.- Alineamiento (*annealing*): en esta etapa se enfrían las hebras de ADN permitiendo el ingreso de los primers y 3.- Extensión: nuevamente se aumenta la temperatura al nivel óptimo en el cual la enzima taq polimerasa pueda añadir nucleótidos para producir una copia complementaria del fragmento de ADN deseado. Este proceso se repite entre 28 y 35 veces para tener un número considerable de secuencias (amplicones) para los análisis que se requieran (Figarelli, 2007)

Ecología molecular y genética de poblaciones.

La ecología molecular es una rama de la ecología, la cual se define como el empleo de herramientas moleculares para resolver problemas ecológicos y se ha enfocado en los problemas poblacionales, como la definición de una población y la identificación de sus límites o la estimación del flujo génico. (Eguiarte y Souza, 2007). Por su lado, Hamilton, (2009) postula que la genética poblacional es un diálogo entre predicciones basadas en los principios de la herencia mendeliana y los resultados obtenidos de mediciones empíricas de genotipos y frecuencias alélicas. Existen muchos mecanismos evolutivos que afectan la distribución de las frecuencias alélicas en una especie, como lo son la mutación, patrones de apareamiento, flujo génico, deriva génica y selección natural, los cuales incrementan o

disminuyen la variación genética de una especie. Este conocimiento es usado y combinado en genética poblacional con la meta de construir un conjunto de predicciones comprensivas que puedan ser aplicados a cualquier especie y sistema genético.

#### Selección positiva y neutra:

De la teoría de Darwin-Wallace, se desprende que los organismos son producto de una historia evolutiva, a partir de modificaciones de un ancestro en común (Castillo, 2007) y que además el principal mecanismo de la evolución es la selección natural de estas variaciones hereditarias (Futuyma, 1986 en Castillo, 2007). Por selección se entiende la reproducción diferencial de algunos fenotipos/genotipos sobre otros bajo ciertas condiciones ambientales que prevalecen en un momento determinado (Futuyma, 1986; Li, 1997 en Castillo, 2007). Sin embargo, con la evolución de la ciencia a nivel molecular, se llegó a que no toda la variación genética podía ser justificada por efectos de la selección natural. Por esta razón nace el concepto de teoría neutra, teoría que postula que la mayoría de las variaciones moleculares ocurren de manera aleatoria y no tienen importancia adaptativa (Castillo, 2007).

#### Flujo génico:

El flujo génico se refiere a todos los mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra (Aguirre, 2007). Es un componente importante en la estructura de las poblaciones. Por ejemplo, en especies en las que el flujo génico es alto, éste puede actuar como una fuerza que la mantiene integrada. Se esperaría que todas las poblaciones de esa especie evolucionen de manera conjunta, a menos que esto sea contrarrestado por fuerzas de selección o deriva génica (Aguirre, 2007). Por otro lado, si el flujo génico es muy bajo, éstas (las poblaciones) empiezan a divergir, lo que puede contribuir al aislamiento reproductivo y al establecimiento de linajes evolutivamente independientes (Slatkin, 1994 en Aguirre, 2007)

Gracias al desarrollo de técnicas y análisis moleculares, es posible estimar el flujo génico de una manera detallada y con mayor resolución. Se basan principalmente en observar la distribución espacial de alelos en las poblaciones para hacer inferencias de los niveles o patrones de flujo génico en las poblaciones” (Slatkin, 1985a en Aguirre, 2007).

“La mayoría de los modelos teóricos de flujo génico... suponen que los organismos están formando poblaciones discretas – modelo de islas – que se diferencian por mutación y deriva génica o bien que forman poblaciones con una distribución continua – modelo de aislamiento por distancia – en donde la probabilidad de flujo génico disminuye al incrementarse la distancia espacial.” (Aguirre, 2007)

#### IV.4.2. Marcadores moleculares utilizados en genética de poblaciones

##### Historia:

La aplicación de técnicas moleculares en la investigación de pesquerías comenzó en la década del cincuenta del siglo pasado, investigando variantes de los grupos sanguíneos en tunas, salmónidos y bacalao, con la finalidad de analizar estructura poblacional (Ligny 1969 en Kochzius 2009). Sin embargo estos métodos no fueron ampliamente adoptados debido a que la distribución genética era detectada mediante la determinación de polimorfismos proteicos haciendo electroforesis, cuya variación era muy baja (Ward y Grewe 1994 en Kochzius 2009). Aunque estos marcadores, conocidos como aloenzimas, son fáciles de manejar, sus resultados son reproducibles y el costo es bajo, motivo por el cual fueron ampliamente aplicados; la técnica fue cuestionada debido a que su resolución para análisis poblacionales ha mostrado ser menor a la de trabajos con marcadores de ADN. Además de cuestionarse la neutralidad de algunos loci y lo engorroso que resulta la necesidad de sacrificar al objeto de estudio y requerir una muestra fresca (Kochzius 2009).

##### Marcadores de ADN:

Hay una gran cantidad de métodos para detectar variaciones en las secuencias de ADN de poblaciones naturales. Cabe mencionar que no existe una técnica que sea universalmente mejor que las demás; sino cada una de ellas presente mejor o peor desempeño dependiendo de la pregunta que se busque responder (Allendorf y Luikart, 2007); por otro lado, resulta cómodo el trabajo con marcadores de ADN, debido a que el requerimiento de tejido es mínimo y su preservación es relativamente sencilla, basta con conservarlos en etanol al 96% a temperatura ambiente. (Kochzius 2009). A continuación una pequeña descripción de tres de los principales marcadores utilizados:



## ADN mitocondrial (ADNmt)

El ADN mitocondrial es una molécula pequeña y circular, que es caracterizada por tener una alta tasa mutacional, lo cual genera correspondientemente altos niveles de polimorfismo y divergencia (Awise, 1999 en Antoniou y Magoulas, 2014). Esto hace al ADN mitocondrial informativo para la determinación de estructuración genética poblacional y para realizar inferencias de la historia evolutiva poblacional (Antoniou y Magoulas, 2014; Kochzius 2009). El ADNmt de animales resulta especialmente valioso porque facilita el entendimiento de patrones de variación genética, principalmente en la reconstrucción de árboles filogenéticos. Esto es gracias a que es haploide, y en la mayoría de especies, el ADNmt se hereda por la línea materna. Esto evita la mezcla estocástica que usualmente se da por la recombinación genética durante la meiosis, y con esto, la posibilidad de variación de partes de la cadena de ADN (Allendorf y Luikart, 2007).

Microsatélites o STR -*Simple Tandem Repeat* o VNTRs - *Variable Number of Tandem Repeats* o SSRs - *Simple Sequence Repeats*:

Los Microsatélites son los marcadores moleculares de ADN más ampliamente usados en genética poblacional para mapeo genómico, ecología molecular y estudios de conservación. (Allendorf y Luikart 2007, Kochzius 2009). Son secuencias que se componen de repeticiones en tándem de patrones de uno a seis nucleótidos (ejemplo: CGTCGTCGTCGTCGT, el cual se puede representar como CGT<sub>5</sub>) y son altamente polimórficos, mostrando un rango de variabilidad alélica de entre 5 y 100 repeticiones (Allendorf y Luikart, 2007).

Se caracterizan por tener una alta tasa de mutación y esto genera una amplia variación alélica y altos niveles de heterocigosidad (Wright y Bentzen, 1994). Usar microsatélites provee mejor resolución para detectar estructura poblacional en áreas geográficas relativamente largas, aún en especies con alta capacidad de dispersión (Waples 1998, en Tripp-Valdez *et al*, 2010).

Entre sus principales atributos tenemos:

- Son abundantes (Wright y Bentzen, 1994).
- Algunos de ellos, y éstos son los que se identifican para estudios genéticos, presentan niveles extremadamente altos de variación alélica (polimorfismo). Esta característica los hace especialmente atractivos en especies que muestran niveles bajos de variación con otros marcadores (aloenzimas, ADN mitocondrial, entre otros.) o en especies geográficamente cercanas, en donde la diferenciación genética podría ser limitada (Wright y Bentzen, 1994). También en poblaciones pequeñas o en especies amenazadas (Allendorf y Luikart, 2007).
- Son marcadores codominantes y se pueden usar para medir el alejamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg para obtener información acerca de la estructura poblacional. (Wright y Bentzen, 1994)
- Presentan una alta tasa de mutación; usualmente fluctúa en una mutación por cada 1000-10000 meiosis ( $10^{-3} - 10^{-4}$  por generación). Éstas mutaciones se expresan como el cambio en el número de repeticiones en tándem, siendo lo usual el incremento o decremento de una unidad de repetición (Allendorf y Luikart, 2007).
- A pesar de que las repeticiones en tándem son altamente mutables, su par de *primers* son muy estables, motivo por el cual son muy efectivos e inclusive es usual utilizar *primers* descubiertos para una especie específica, en otras especies taxonómicamente diferentes (Allendorf y Luikart, 2007).

Kochzius (2009), menciona algunas de las desventajas de los microsatélites:

- Problemas en el escoreo de los genotipos (determinación del par de alelos de algún individuo): observación de *stutter bands* o bandas fantasma. Esto puede causar una confusión en la genotipificación y por ende, un error que se arrastrará en todo el proceso.
- Presencia de alelos nulos: son alelos que se muestran vacíos debido a errores durante el PCR debido a mutaciones en la secuencia donde se pegaría el *primer*. Esto puede generar el genotipificar un exceso de homocigotes.

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs - *Single nucleotide polymorphisms*)

Los SNPs son los más abundantes marcadores de polimorfismo en el genoma, con un índice de ocurrencia de uno por cada 500 pares de bases de nucleótidos en la mayoría de poblaciones naturales de animales (Brumfield *et al*, 2003 y Morin *et al*, 2004 en Allendorf y Luikart, 2007). Son unos marcadores dialélicos, que se encuentran en regiones tanto codificantes como no codificantes del ADN y son atractivos para determinar estructura poblacional por muchos motivos. Entre estos porque se pueden genotipificar rápidamente y con una baja tasa de error, además de que permiten analizar al mismo tiempo tanto las variaciones en regiones neutras como en regiones bajo selección natural y con esto producir información más detallada sobre la subdivisión población en comparación a los marcadores neutros (Ej: micosatélites) (Mariani y Bekkevold, 2014).

#### IV.4.3. Medidas de la diversidad genética y estructura poblacional

Heterocigosidad ( $H_e$ ) y Número efectivo de alelos ( $N_a$ ):

Nei (1987) en Allendorf y Luikart, 2007 define la heterocigosidad como diversidad genética y está dada por la proporción promedio de heterocigotos por locus en una población apareada aleatoriamente o la proporción esperada heterocigotos en los loci de un individuo elegido aleatoriamente. Es un valor que no se ve afectado por el tamaño muestral, siempre y cuando se examinen un gran número de loci.

El número total de alelos en un locus es usado como una medida de la variación genética; sin embargo, éste es altamente dependiente del tamaño muestral y puede no ser significativo debido a la presencia de muchos alelos de baja frecuencia (Allendorf y Luikart, 2007).

#### Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W)

Es el modelo más simple para describir las características genéticas de una población y se basa en el uso de las frecuencias alélicas en un locus para hacer comparaciones entre las heterocigosidades obtenidas del muestreo y las esperadas bajo el modelo H-W. Este modelo asume que las poblaciones son de gran tamaño, se aparean de manera aleatoria y no hay factores que puedan causar cambios genéticos entre generaciones, como mutaciones, selección natural o inmigración (Allendorf y Luikart,

2007; Hamilton, 2009). Por lo tanto este modelo asume que las poblaciones no evolucionan, lo cual significa que mantienen sus frecuencias alélicas y genotípicas constantes a lo largo de las generaciones (Allendorf y Luikart, 2007). Está basado en una situación simplificada o idealizada en donde no ocurren procesos externos y las frecuencias genotípicas son el resultado de combinaciones aleatorias (Hamilton, 2009).

Las expectativas (H-W *expectations*) de Hardy-Weinberg se utilizan comúnmente para medir las desviaciones de un modelo nulo, en el cual se cumplen los supuestos mencionados. Las poblaciones que muestran frecuencias genotípicas que no se ajustan a las expectativas H-W evidencian que ha sufrido uno o más procesos evolutivos.

#### Índice de fijación - Fis:

Los patrones de apareamiento frecuentemente no presentan el apareamiento aleatorio asumido por Hardy-Weinberg. Por tal razón, el índice de fijación (Fis) es usado para comparar cuanta heterocigosidad es presentada en una población ( $H_o$ ) en función a la esperada bajo apareamiento aleatorio ( $H_e$ ), en donde las frecuencias esperadas se encuentran en equilibrio H-W. El índice de fijación puede fluctuar desde -1 hasta +1, siendo los valores negativos indicadores de exceso de heterocigosidad mientras que los positivos, exceso de homocigotes (Hamilton, 2009).

#### Estadístico Fst o Estadístico de Wright

Es usual que las probabilidades de un apareamiento aleatorio dentro de poblaciones grandes estén limitadas, es decir, que éstas se encuentren desviadas del equilibrio H-W. Es más probable que dos individuos se reproduzcan debido a su cercanía dentro de la población. Este comportamiento genera heterogeneidad a lo largo de la población, lo que se conoce estructura poblacional (Hamilton, 2009). Fst es la medida más usada para describir la diferenciación genética en poblaciones debido a la deriva genética entre subpoblaciones, mide cuan diferentes genéticamente son dos poblaciones y refleja la proporción de la variabilidad genética. Los valores de Fst pueden variar entre 0 y 1, siendo cero para poblaciones idénticas y uno para poblaciones completamente diferentes (Wright, 1978).

IV.4.4. Generalidades en genética de poblaciones en recursos pesqueros altamente migratorios y detalles específicos de *Coryphaena hippurus* que lo diferencian del resto de recursos migratorios:

Generalmente los peces marinos muestran bajos niveles de diferenciación genética (Ward, 2000). Muchos estudios han revelado que lo genéticamente esperado para especies oceánicas pelágicas es la homogeneidad a grandes escalas geográficas (Rocha-Olivares, *et al.* 2006). Jorgensen *et al.* (2005) en Rocha-Olivares, *et al.* 2006 señalan 3 razones por las que los peces pelágicos migratorios y ampliamente distribuidos comparten características biológicas que pueden limitar la diferenciación genética entre localidades distantes. Éstas son:

- Grandes grupos de desovantes, los cuales limitan los efectos de la deriva génica.
- Ausencia de aparentes barreras para la migración, lo que permite movimientos interoceánicos y en algunos casos transoceánicos.
- Capacidad intrínseca de dispersión a grandes distancias, lo que permite altos niveles de flujo génico, tanto en etapas tempranas de la vida (transporte pasivo o transporte larval) como por migración de adultos (transporte activo).

Ward *et al.* (1994) al comparar niveles de diversidad genética en peces marinos, de agua dulce y anádromos, encontró que el grado de diferenciación genética en subpoblaciones es mayor en especies de agua dulce que en las marinas. Es probable que las subpoblaciones marinas intercambien entre 10 y 100 veces más migrantes por generación que las subpoblaciones de agua dulce, debido a la relativa ausencia de barreras para la dispersión en los ambientes marinos.

El Perico, a diferencia de otras especies pelágicas migratorias, tiene un crecimiento muy rápido. Esto permite suponer que su estado planctónico es lo suficientemente corto para limitar su tiempo a la deriva de las corrientes oceánicas y por ende, el flujo génico por transporte pasivo (Rocha-Olivares *et al.* 2006).

En un estudio de marcación realizado desde 1973 en Australia, realizado a 12 600 especímenes con un porcentaje de recuperación cercano al 0.86%, se encontró que el perico se mueve grandes distancias, siendo superiores a los 440 kilómetros con una velocidad mayor a los 20 kilómetros por día. El tiempo entre la captura y recaptura varió entre 0 y 360 días y la distancia entre el punto de inicio y el final varió entre 0 y 400 kilómetros. A pesar de esta gran movilidad, la mayoría de peces fueron capturados cerca de los objetos flotantes donde fueron marcados (Kingsford y Defries, 1999). Esto puede diferenciar a esta especie del resto de especies altamente migratoria, debido a que a pesar de tener una capacidad de movilidad alta, sus preferencias las mantienen cerca de las zonas habituales. Sin embargo, es discutible que el coeficiente de recaptura sea tan bajo; es posible que el grueso de los individuos se haya perdido en otras zonas.

#### IV.5. Trabajos previos en genética de poblaciones de *C. hippurus*

Tripp-Valdez, *et al.* (2010) mide la variación genética de cinco microsatélites (los mismos que se utilizan en el presente estudio) de individuos capturados en cinco zonas en 2005 y en ocho zonas en 2006. Su objetivo fue detectar la estructura poblacional del Perico en el golfo de California y aguas cercanas. Encontraron altos niveles de variación genética, una sutil pero significativa heterogeneidad espacial y temporal. Sin embargo, no se logró detectar diferenciación genética. Esto sugiere que a pesar de la leve heterogeneidad detectada en la región, el *C. hippurus* forma una población panmictica simple con alta variación y flujo génico.

Bayona (2011) evaluó los niveles de variabilidad genética y conectividad mediante la amplificación de cinco loci microsatelitales (los mismos que se utilizan en el presente estudio) en un total de 720 individuos provenientes de 13 localidades del océano pacífico; de las cuales ocho se encontraron en México y las cinco restantes fueron Perú, Ecuador, Hawaii, Japón y Nueva Caledonia. Los resultados arrojaron una pequeña señal de diferenciación entre poblaciones ( $F_{st} = 0.006$  y  $p = 0.002$ ) y sugiriendo la presencia de diferentes stocks de perico en el océano pacífico. Estos resultados se respaldaron en características poblacionales de la especie: dispersión limitada debido a fidelidad a sitios de agregación, estadio larvario y tiempos generacionales cortos y movilidad restringida por la temperatura superficial del agua.

En Rocha-Olivares, *et al* (2006) se evalúa los niveles de variabilidad genética y conectividad entre poblaciones a dos escalas: una regional (pacífico oriental) y una oceánica: entre el pacífico central y el oriental). Para esto usaron marcadores RFLPs (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) del gen mitocondrial NADH1. Los resultados presentaron niveles de estructura genética altamente significativos ( $\Phi_{ST} = 0,029$ ,  $P = 0,004$ , AMOVA) entre Perico muestreado en Baja California Sur, Sinaloa y Hawaii.

Díaz-Jaimes *et al* (2006) colectaron muestras de cuatro años consecutivos de cuatro localidades del pacífico central este: del 2002 al 2005 en Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Chiapas. Evaluaron la variación en 751 pares de bases del gen mitocondrial NADH sub unidad 1 para medir la presencia de estructura genética poblacional. Los análisis revelaron que no hay diferencias significativas entre las muestras en cada localidad a través de los años y tampoco al comparar las cuatro localidades.

Díaz-Jaimes *et al* (2010) estudio la conectividad y demografía histórica de *C. hippurus* en poblaciones del atlántico, índico, pacífico y mediterráneo mediante el uso de secuencias del gen mitocondrial NADH sub unidad 1. Los análisis moleculares de las varianzas – AMOVAs revelaron divergencias significativas entre océanos habiéndose definido tres grupos filogénicos localizados en el indo-pacífico, atlántico este y el mar mediterráneo. Sin embargo a nivel de estructuración poblacional no fue posible observar claramente una diferenciación genética entre las poblaciones del indo-pacífico y atlántico. Esto sostiene

## V. Materiales y métodos

### V.1. Toma de muestras:

Se obtuvieron muestras de tejido de *C. hippurus* de diferentes locaciones del Océano Pacífico Sureste, con el objetivo de cubrir el espectro latitudinal del Perú (figura 7). En el caso de las colectas correspondientes a los puntos 1, 2, 3 y 4, se realizaron en la zona de pesca a bordo de embarcaciones pesqueras artesanales; mientras que las muestras 5, 6 y 7 se tomaron en puerto en el momento del desembarque. Mayor detalle de los días de cala y de colecta de muestras, coordenadas de las calas, embarcaciones responsables de la pesca y número de muestras en el cuadro 4 y la Fig. 7. También se registró la longitud horquilla (LH) y el sexo (Cuadro 5), así como una fotografía de cada individuo).

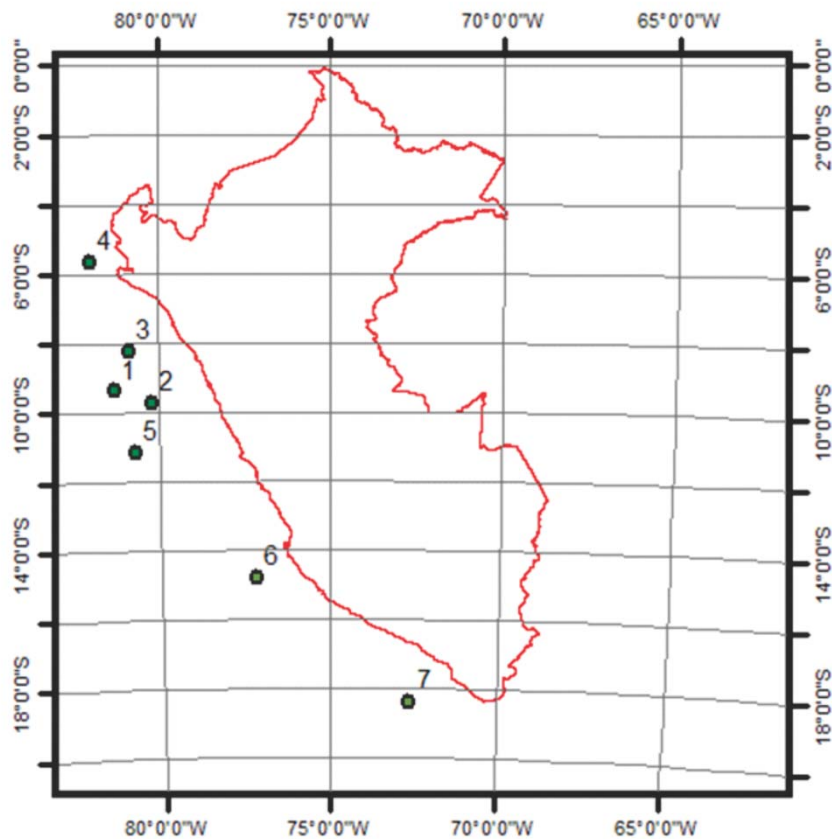


Figura 7: Locación de los puntos de colecta de muestras de *C. hippurus* en el Océano Pacífico Sureste. (1: Chimbote, 2: Casma, 3: Huanchaco, 4: Sechura, 5: Végueta, 6: Ica sur y 7: Tacna sur)



Con la intención de hacer más simple las comparaciones entre puntos, se les asignó como nombre a cada uno de los puntos de muestrales, el de la localidad pesquera más cercana a la latitud en que se hizo cada uno de los muestreos. En ese sentido y a lo largo del presente trabajo nos referiremos a los nombres de estas localidades para referirnos a cada uno de los puntos muestrales de la siguiente manera: 1) Chimbote, 2) Casma, 3) Huanchaco, 4) Sechura, 5) Végueta, 6) Ica sur y 7) Tacna sur. Asimismo, debido a la no significancia de una prueba preliminar de Fst entre pares de poblaciones (resultados no presentados), se decidió trabajar los puntos muestrales de 1) Chimbote, 2) Casma y 3) Huanchaco como uno solo. El presente trabajo se refiere a la zona Ancash-Libertad cuando menciona a esos puntos en su conjunto.

Todas las muestras se conservaron en alcohol al 70% dentro de crioviales de plástico de 2 ml de volumen y a una temperatura de entre 0 a 4 °C. Se transportaron desde el punto de colección hasta el laboratorio procurando no cortar la cadena de frío. Luego se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

Para evitar el deterioro de las muestras, por contaminación del ambiente o por descomposición, se siguió el siguiente protocolo de toma de muestras:

1.- Los materiales de colección: tijeras, pinzas, frascos colectores, botellas con alcohol etílico de 70%, hipoclorito al 10%, etc., deben de mantenerse a bordo en un lugar especial que lo proteja de la contaminación.

2.- Los frascos colectores fueron previamente llenados con alcohol etílico al 70%, dentro de ellos se sumergirán las muestras tomadas. Para el debido reconocimiento en laboratorio de las muestras, éstas deberán estar rotuladas.

3.- Antes de realizar cada colecta, se debe desinfectó la tijera y la pinza con un algodón remojado en solución de hipoclorito al 10% y luego con un algodón remojado en alcohol etílico de 70%.

4.- La colecta consiste en separar un pedazo tejido de los especímenes, ya sea de la aleta dorsal o de tejido muscular (interpectoral). En el caso de aleta dorsal se tomaron, dependiendo del tamaño del individuo, los últimos radios de la aleta; tomando 1 radio para especímenes grandes (mayores a 90 cm de longitud horquilla) y hasta 3 radios para especímenes pequeños. Para músculo se tomó un área aproximada de 2 cm<sup>2</sup>.

5.- Se colocó el tejido obtenido en el frasco con alcohol etílico al 70%. Se tapó y verificó que esté sellado herméticamente. Por último se rotuló con un código que luego facilite el reconocimiento de la muestra.

6.- Las muestras colectadas se almacenaron inmediatamente en una caja adiabática que se mantuvo a aproximadamente 4°C durante el tiempo que demoró su traslado de la embarcación al laboratorio.

7.- En el laboratorio de la *Genomics Research Unit* de la Universidad Peruana Cayetano Heredia se realizó un recambio de alcohol y se almacenaron a -80°C.

Además de la información recabada en el rotulo de cada tubo, se procuró registrar en una bitácora de campo los siguientes datos: tipo de tejido colectado, lugar de colecta, coordenadas geográficas de la colecta, fecha de la colecta, sexo de los especímenes, longitud horquilla de la especie y fotografía de la misma. El cuadro 4 detalla los datos más relevantes de cada uno de los puntos muestrales.

Cuadro 4: Detalles de las colectas de tejido de *C. hippurus* obtenido entre enero y febrero de 2014. (Calas: 1: Chimbote, 2: Casma, 3: Huanchaco, 4: Sechura, 5: Végueta, 6: Ica sur y 7: Tacna sur)

Cala	Embarcación	Día de cala	Día de colecta de muestras	Localidad	Coordenadas de cala		n
					Sur	Oeste	
1	Gustavo - TA42274-BM	15/01/2014	15/01/2014	Chimbote	9°22'	81°17'	32
2	Gustavo - TA42274-BM	17/01/2014	17/01/2014	Casma	9°44'	80°11'	14
3	Gustavo - TA42274-BM	19/01/2014	19/01/2014	Huanchaco	8°13'	80°50'	24
4	Maria Gloria - CE38516-CM	22/01/2014	22/01/2014	Sechura	5°40'	81°56'	40
5	Maria Gloria - CE38516-CM	12/01/2014	23/01/2014	Végueta	11°8'	80°40'	40
6	Don David	27/01/2014	29/01/2014	Ica Sur	14°48'	77°10'	42
7		08/02/2014	12/02/2014	Tacna Sur	18°23'	72°37'	49
							241

Cuadro 5: Sexo y talla promedio a la horquilla de los individuos de *C. hippurus* muestreados (M = macho, H = hembra, LH = longitud horquilla):

Localidad	Sexo		Talla promedio
	M	H	cm de LH
Chimbote	13	19	98,4
Casma	4	10	89,3
Huanchaco	6	17	90,5
Sechura	16	24	83,7
Végueta	-	-	-
Ica Sur	15	28	92,3
Tacna Sur	15	34	83,9
Total	69	132	89,7

## V.2. Extracción de ADN:

La extracción, cuantificación y análisis de la calidad del ADN fueron realizadas en el laboratorio *Genomics Research Unit* (GRU) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

Con la finalidad de encontrar un protocolo que permita obtener ADN de *C. hippurus* de buena calidad, optimizando tiempo y recursos, se realizaron pruebas a pequeña escala con los protocolos de extracción con buffer de Chris-lysis, fenol-cloroformo y Chris-lysis modificado (lavado adicional con acetato de amonio):

1.- Diferencias entre los protocolos de Chris-lysis (ANEXO 1) y Fenol-cloroformo (ANEXO 2): Se realizaron ambos protocolos en tejidos del mismo origen y se compararon los resultados obtenidos al visualizar la extracción en un gel de agarosa 0,9% teñido con bromuro de etidio.

2.- Diferencias entre las extracciones en muestras de diferentes orígenes: Se realizó el proceso de extracción en condiciones similares para muestras de aleta dorsal y músculo ventral. Además, la aleta dorsal no es un tejido homogéneo sino

una mezcla de músculo, piel y cartílago por lo que se consideró necesario evaluar las diferencias entre estos.

3.- Diferencias en la eficiencia para obtener amplicones de microsatélites, utilizando ADN extraído con el método Chris-lysis y ADN extraído con el mismo método pero utilizando un lavado adicional con acetato de amonio 0.3M previa reprecipitación del ADN con isopropanol.

Luego de realizar las diversas pruebas preliminares de extracción, se decidió obtener ADN genómico del total de muestras utilizando el método de Chris-lysis, debido a que es un método sencillo y rápido, lo cual permite ahorrar tiempo y dinero al disminuir la cantidad de reactivos y materiales plásticos necesarios. Este método nos dio las mejores concentraciones de ADN por microlitro y una calidad óptima. A pesar de tener una buena cantidad de ADN y una calidad adecuada, este método presentaba mediciones elevadas en las absorbancias a 230 nm de longitud de onda, por lo que se inhibieron las primeras amplificaciones de prueba. Esto fue solucionado realizando un lavado adicional con isopropanol y acetato de sodio 0.3M, lo que disminuyó la cantidad de contaminantes, reduciendo con esto las probabilidades de inhibición en las reacciones de PCR. Siguiendo este protocolo se extrajo ADN de las 241 muestras con una efectividad cercana al 100% (ANEXO 3). El ADN extraído bajo el método de Chris-lysis fue medido en un biofotómetro Eppendorf D30 para obtener la cantidad de ADN expresada en nanogramos por microlitro (ng/ul) y la calidad expresada como el cociente entre la absorbancia de 260 y 280 nanómetros de longitud de onda. Cabe mencionar que se consideran niveles óptimos de calidad entre 1,8 y 2 (Eppendorf, 2014).

### V.3. Amplificación y registro de alelos de microsatélites.

La amplificación y registro de alelos se realizó en el laboratorio *Genomics Research Unit* (GRU) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Este paso consistió en aislar los fragmentos de ADN de interés para el presente estudio, es decir, las regiones en donde se ubicaron los 5 loci de microsatélites de ADN nuclear al perico para poder aislarlos del resto del ADN mediante la aplicación de la técnica PCR. Luego estos productos fueron registrados por tamaños (en pares de bases), en donde cada tamaño representa un determinado alelo. Siendo los alelos de microsatélites, expresados en pares de bases como

unidad de medida, los datos de entrada para todos los análisis posteriores de diversidad genética y estructuración poblacional.

Mediante diluciones, se llevó a una concentración de 10 ng/ul a cada una de las muestras de ADN de *Coryphaena hippurus*, por ser una cantidad manejable para las reacciones de PCR. Para seguir un orden adecuado, que además permita facilitar el trabajo en los pasos siguientes, las muestras de ADN diluido se colocaron en placas de PCR de 96 pocillos y 200 ml de volumen (Cuadro 6).

Cuadro 6: Distribución de las muestras en placas de 96 pocillos para PCR. (Muestras: A1-A32: Chimbote, B1-B14: Casma, C1-C24: Huanchaco, D1-D40: Sechura, E1-40: Végueta, F1-F42: Ica sur y G1-G49: Tacna sur. Los cuadrados en negro muestras posiciones vacías en la placa).

**Placa 1**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	A9	A16	A24		B7	C1	C9	C16	C24		D15
B	A2	A10	A17	A25	A32	B8	C2	C10	C17	D1	D8	D16
C	A3	A11	A18	A26	B1	B9	C3	C11	C18	D2	D9	D17
D	A4	A12	A19	A27	B2	B10	C4	C12	C19	D3	D10	D18
E	A5	A13	A20	A28	B3	B11	C5	C13	C20	D4	D11	D19
F	A6	A14	A21	A29	B4	B12	C6	C14	C21	D5	D12	D20
G	A7	A15	A22	A30	B5	B13	C7	C15	C22	D6	D13	D21
H	A8		A23	A31	B6	B14	C8		C23	D7	D14	D22

**Placa 2**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	D23	D31	D38	E6		E21	E29	E37	F4	F12		F27
B	D24	D32	D39	E7	E14	E22	E30	E38	F5	F13	F20	F28
C	D25	D33	D40	E8	E15	E23	E31	E39	F6	F14	F21	F29
D	D26	D34	E1	E9	E16	E24	E32	E40	F7	F15	F22	F30
E	D27	D35	E2	E10	E17	E25	E33	F1	F8	F16	F23	F31
F	D28	D36	E3	E11	E18	E26	E34	F2	F9	F17	F24	F32
G	D29	D37	E4	E12	E19	E27	E35	F3	F10	F18	F25	F33
H	D30		E5	E13	E20	E28	E36		F11	F19	F26	F34

### Placa 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	F35	G1	G8	G16		G31	G39	G47	F4			
B	F36	G2	G9	G17	G24	G32	G40	G48	G3			
C	F37	G3	G10	G18	G25	G33	G41	G49	A12			
D	F38	G4	G11	G19	G26	G34	G42	A1	C21			
E	F39	G5	G12	G20	G27	G35	G43	B9	D36			
F	F40	G6	G13	G21	G28	G36	G44	C12	E33			
G	F41	G7	G14	G22	G29	G37	G45	D10	F26			
H	F42		G15	G23	G30	G38	G46	E8	G30			

Para la amplificación de ADN se usó un termociclador Mastercycler® pro de la marca Eppendorf, procurando usar placas de 96 pocillos, organizadas de la misma manera que las placas de dilución para asegurar la trazabilidad. Se procuró amplificar el íntegro de las muestras para cada uno de los loci de microsatélites. Los insumos necesarios para las reacciones de PCR fueron: Agua NFW (agua libre de nucleasas), Taq polimerasa y su buffer, cloruro de magnesio (MgCl), dNTPs (nucleótidos), primers *forward* y *reverse* (cuadro 7), M13 IRDye® 800 (fluróforo que permite la lectura de los microsatélites en LiCor) y ADN. La combinación de estos insumos (exceptuando el ADN) en proporciones adecuadas para llevar a cabo una reacción de PCR exitosa se denomina MasterMix.

Cuadro 7: Lista de primers utilizados para cada locus. F: secuencia *forward* y R: secuencia *reverse* (Tomado de Tripp-Valdez *et al*, 2010).

Nombre del Locus	Primers
Chi002	F: GAAAAACTCACACGGTCACTTG R: GGCTTGCCAACCTGAGATTA
Chi008	F: ATTGATGAGGGTTCAGACGG R: GGCAGCAGTTCAGGAGGTTA
Chi008A	F: GGGCTCATGACACAAATTCC R: CCAAACATGTGAGTGCTGCT
Chi023	F: GATGGGAGACTCCAACCTGA R: CCCATCTTGTGGAGGTTGAT
Chi037	F: GATATCAGGCCTCCTGCTTG R: GGGATTGGTTCCTCACTCT

En total se usaron 5 fórmulas para preparar el MasterMix correspondiente para cada locus (las concentraciones utilizadas se detallan en cuadro 8). Luego se adicionaron alícuotas de 7,5 ul del mismo en placas de PCR de 96 pocillos, las cuales en cada pocillo contenían 2.5 ul de ADN a 10 ng/ul de concentración de una muestra determinada. Para evitar fallas de amplificación, esta mezcla se homogenizó en un termomixer (*Eppendorf ThermoMixer®*) a 800 RPM durante 5 minutos.



Cuadro 8: Concentraciones finales usadas para la amplificación de cada uno de los locus de microsatélites.

Locus	Buffer	MgCl	dNTPs	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	M13	Taq	ADN
Chi002	1X	1.5 mM	0.2 mM	0.6 mM	0.6 mM	0.06 X	0.05 U	2.5 ng/ul
Chi008	1X	1.5 mM	0.2 mM	1 mM	1 mM	0.07 X	0.05 U	2.5 ng/ul
Chi008A	1X	1.5 mM	0.2 mM	0.5 mM	0.5 mM	0.06 X	0.05 U	2.5 ng/ul
Chi023	1X	1.5 mM	0.2 mM	1 mM	1 mM	0.05 X	0.05 U	2.5 ng/ul
Chi037	1X	1.5 mM	0.2 mM	0.7 mM	0.7 mM	0.07 X	0.05 U	2.5 ng/ul

Las placas homogenizadas con MasterMix más ADN, fueron amplificadas mediante la técnica de PCR en un termociclador Eppendorf programado para hacer 31 ciclos con la secuencia a.- 95° C de temperatura de denaturalización durante un minuto, b.- temperatura de alineamiento durante un minuto (cuadro 9) y c.- 72° C de temperatura de extensión durante un minuto. Adicionalmente de los 31 ciclos, se programó una denaturalización inicial a 95° C durante 5 minutos y una extensión al final de 72° C luego de los 31 ciclos.

Cuadro 9: Temperaturas de alineamiento para los 5 loci de microsatélites de perico (Natalia Bayona, comunicación personal).

Primer	T °C
Chi008	61
Chi023	58
Chi002	60
Chi008A	62
Chi037	60

A los productos de la PCR, de 10 ul de volumen final por pocillo, se les adicionaron 5 ul de *Blue stop solution*. Se denaturalizaron a 94 °C durante 5 minutos en un termociclador *Eppendorf*, seguido de un shock de frío, al exponer las mismas a una cubeta llena de hielos durante al menos un minuto. Esto con la finalidad de mantener las hebras de ADN amplificado separadas para facilitar la lectura de los microsatélites en el analizador genético LiCor 4300 de marca *Bioscience*.

Para visualizar el tamaño de los alelos de microsatélite, en pares de bases (bp) en el LiCor, se sembró 0.5 ul de cada muestra en un gel de poliacrilamida de 6.5 % (mezcla de gel matrix 6,5% marca LiCor, perfultato de amonio y TEMED – tetra metil etil endiamina). Así mismo se sembró el *ladder* 50 bp- 350 bp IRDye®, el cual es un marcador estándar de tamaño que sirve de referencia al arrojar marcas de tamaños conocidos. Los geles se instalan de forma vertical en el equipo. Para mayor información acerca de las especificaciones técnicas del funcionamiento del mismo se puede revisar LiCor (2012).

Los productos de PCR se separan por electroforesis durante una hora y treinta minutos a 1500 voltios. Los alelos de microsatélite de cada locus en cada individuo se visualizaron en un equipo LiCor (un ejemplo puede verse en el ANEXO 4). Posteriormente estos resultados fueron analizados en el Software SAGA GT para Microsatélite (LiCor, 2005). Este programa permite genotipificar cada individuo; es decir, asignar un tamaño, en número de pares de bases, comparando el tamaño que muestran los individuos en las imágenes que se obtuvieron comparadas con el tamaño que muestran los *ladders*. Se realizó este análisis en cada muestra y por cada locus, obteniendo una tabla de doble entrada en donde se tienen los datos de los tamaños de los microsatélites para cada alelo, sean homocigotos o heterocigotos.

#### V.4 Procesamiento y análisis de datos.

El presente trabajo realizó el análisis de la diversidad genética y de la estructuración poblacional mediante la realización de un conjunto de pruebas detalladas en la figura 7. La diversidad genética se define como las medidas que cuantifican la magnitud de la variabilidad genética dentro de una población (Hughes *et al.*, 2008) y la estructuración poblacional como la heterogeneidad en las frecuencias alélicas a través de una población, causada por un limitado flujo génico (Hamilton, 2009).

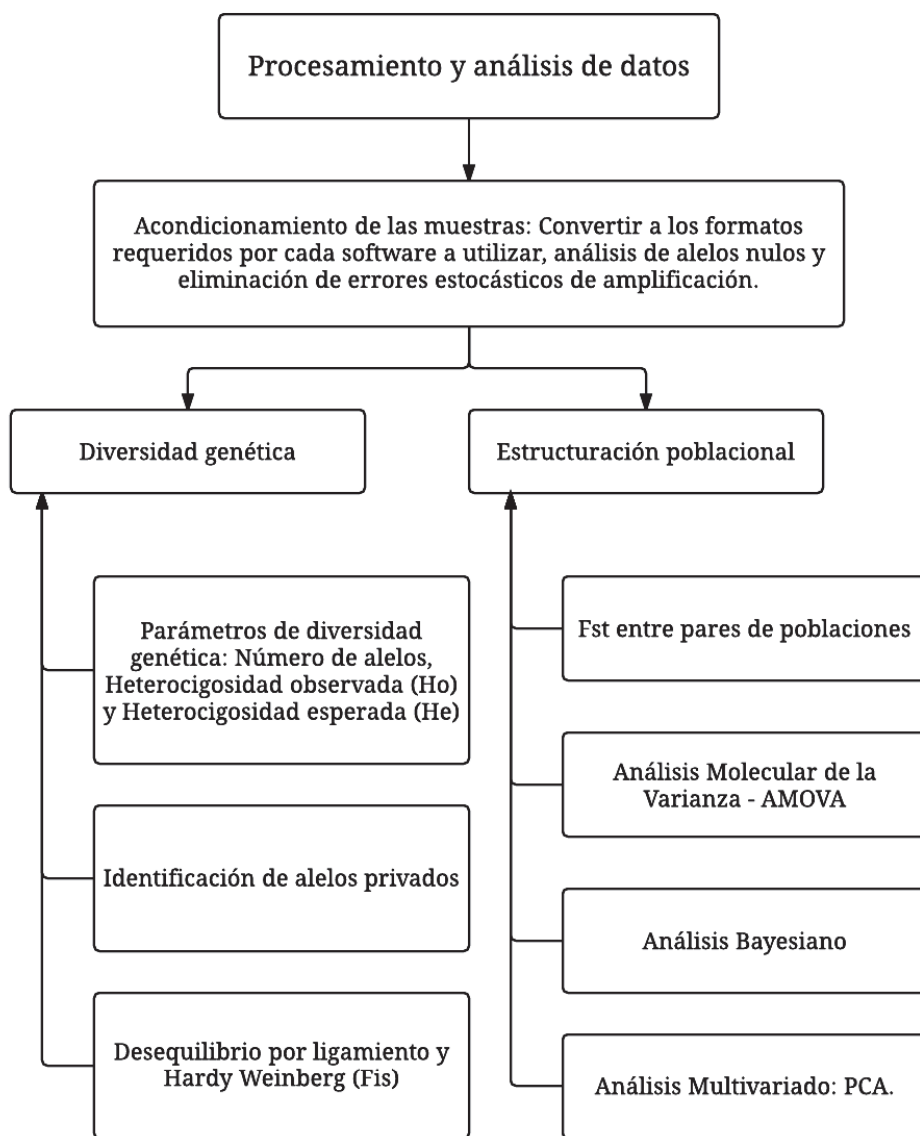


Figura 7: Pruebas realizadas para definir la diversidad genética y la estructuración poblacional.

#### V.4.1. Análisis de la diversidad genética

Antes de usar cada uno de los programas estadísticos que se mencionarán a continuación, cabe mencionar que se usó el programa CONVERT, en su versión 1.31 (Glaubitz, 2004), el cual es un programa que facilita la conversión de datos genéticos diploides a el formato requerido por los programas GDA, GENEPOP, ARLEQUIN, POP GENE, MICROSAT, PHYLIP y STRUCTURE. La finalidad fue transformar los datos de alelos registrados por individuo y locus al formato requerido por cada programa utilizado en el presente estudio.

Para calcular los niveles de variabilidad genética, se usó el software GeneAIEx 6.5 siguiendo los protocolos establecidos para microsatélites de organismos diploides en Peakall y Smouse (2012) y Blyton y Flanagan (2012). De esta manera se calculó el número de alelos ( $N_a$ ), la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) para cada uno de los 5 puntos de muestrales de *Coryphaena hippurus* a lo largo de la costa peruana: A = Sechura, B = Ancash-Libertad, C = Végueta, D = Pisco Sur y E = Tacna Sur. Asimismo se identificó la presencia de alelos privados por cada población y locus.

El perico es un individuo diploide, por lo tanto cada locus de microsatélite debe presentar dos alelos. Estos alelos se visualizan como bandas en el programa SAGA GT y cada una de estas representa un tamaño de pares de bases determinado. Si el individuo es heterocigoto se deben ver dos bandas de diferentes tamaños, pero si el individuo es homocigoto solo se visualizará una sola banda, asumiendo que representa dos alelos de un mismo tamaño. Sin embargo, en este último caso, cabe la posibilidad de que ese individuo sea un heterocigoto en el cual solo se ha podido visualizar un solo alelo. El otro alelo o alelo nulo, no amplificó por error. Se usó el Programa Micro-Checker para corregir errores de genotificación debido a alelos nulos, *stutter bands* u otros errores. Este programa estima la frecuencia de alelos nulos, que por error se genotificaron como homocigotes, y permite ajustar las frecuencias y genotipos alélicos de los alelos amplificados, permitiendo su uso en análisis de genética poblacional (Van Oosterhout *et al*, 2004). Luego de esto se recalcularon los niveles de variabilidad genética:  $N_a$ ,  $H_e$  y  $H_o$  usando nuevamente el programa GeneAIEx 6.5.

## Desequilibrio por ligamiento y Hardy Weinberg

El desequilibrio por ligamiento, es una prueba que compara pares de loci para comprobar su independencia. Mediante el planteamiento de la hipótesis nula de que los genotipos (pares de alelos presentados por cada muestra) en un locus son independientes de los genotipos de otro locus (Rousset, 2008). La finalidad es comprobar si cada uno de los pares de loci se comportan como unidades independientes entre sí (Morales, 2009). Para evaluar si los *loci* utilizados en el presente estudio se segregan de forma independiente, se usó Genepop versión 4.3 (Rousset, 2008 y Excoffier y Heckel, 2006).

Para determinar si las poblaciones estaban en equilibrio Hardy-Weinberg, se usó el test de probabilidad en el programa Genepop 4.3 (Rousset, 2008 y Excoffier y Heckel, 2006), usando como parámetros de la cadena de Markov 10000 dememorizaciones, 1000 *batches* y 10000 iteraciones por *batch*. Esta operación consistió en computar una prueba estadística  $\chi^2$  a toda la data para producir una matriz de *p-values* por cada población y cada locus (35 en total, 7 poblaciones y 5 loci), así como el cálculo del índice de fijación – Fis, estimado según el método de Weir y Cockerman (1984).

### V.4.2. Estructura poblacional

#### V.4.2.1. Fst entre pares de puntos muestrales

La homogeneidad de las frecuencias alélicas de los microsatélites, entre todos los pares de muestras, fue evaluado usando el test exacto de Fisher usando también el software Genepop 4.3 (Rousset, 2008) usando 10000 dememorizaciones, 1000 *batches* y 10000 iteraciones por *batch*. De esta prueba se obtuvieron los *p-values* de las comparaciones entre cada par de poblaciones. Asimismo los niveles de diferenciación genética entre cada uno de los pares de puntos muestrales se analizó mediante el cálculo del estadístico Fst de Wright (Weir y Cockerman, 1984).

#### V.4.3.2. Análisis Molecular de Varianzas – AMOVA

Por último se computó un Análisis Molecular de Varianzas – AMOVA global para poder distinguir cuánto de la variación total se debe a varianzas propias de los individuos,

de cada una de sus poblaciones y entre las poblaciones. La finalidad del mismo fue obtener un valor de  $F_{st}$  global. Adicionalmente se decidió formar dos agrupaciones: 1.- Tacna Sur y 2.- El resto de puntos muestrales. La finalidad fue evaluar la estructuración genética jerárquica de las muestras haciendo otra AMOVA, que pueda diferenciar la contribución relativa entre estos dos grupos, dentro de los mismos y entre las poblaciones. Estos análisis fueron realizados usando el software Arlequin versión 3.5.2 (Excoffier y Lischer, 2015) usando 10000 permutaciones en cada caso. En todos los casos los *p-value* fueron ajustados mediante la corrección subsecuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

#### V.4.3.3. Análisis bayesiano

Adicionalmente se hizo un análisis bayesiano para asignación de individuos con el uso del software *Structure* 2.3.4 (Pritchard *et al*, 2010) para tener más argumentos para discutir sobre la estructura poblacional más allá de lo obtenido por el análisis entre pares de  $F_{st}$ . Se decidió trabajar con los supuestos de un modelo de mezcla (*admixture model*) y frecuencias alélicas correlacionadas entre poblaciones muestrales. Se usaron los siguientes parámetros: 1.- un millón ( $10^7$ ) de cadenas de Markov – Monte Carlo con un *burn-in period* de medio millón de repeticiones ( $0,5 \times 10^7$ ) y 2.- Número de sub-poblaciones asumidas o *clusters* ( $k$ ) entre uno y siete, repitiendo la prueba tres veces para cada número *cluster* asumidos. Para visualizar cual es el  $k$  más apropiado para las muestras se estimó el estadístico *ad hoc* de Evanno -  $\Delta k$  (Evanno *et al*, 2005) en el software *Structure Harvester* (Earl y Von Holdt, 2012).

#### V.4.3.4. Análisis de componentes principales

También se hizo un análisis multivariado de componentes principales (PCA, *principal components analysis*), la cual es una poderosa herramienta para identificar patrones en la data en una forma en que se resalten las similitudes y diferencias (Smith, 2002), buscándolas de una forma exploratoria; esto quiere decir que no requieren de fuertes suposiciones como el equilibrio H-W o el desequilibrio por ligamiento (Jombart, 2009). Se usó el paquete *ade4* del Software Adegnet (Jombart, 2014a). Básicamente los productos de esta prueba son un gráfico de dispersión, en la cual se pueden visualizar cada una de las

muestras, y un gráfico que muestra los *eigenvalues*, indicador del monto de varianza representado por cada uno de los componentes principales.

## VI. Resultados y discusión

### VI.1. Amplificación y registro de Alelos

Los resultados de la amplificación y registro de alelos por individuo y locus se presentan en el ANEXO 5. Del total de muestras extraídas, para el 93% se obtuvo una amplificación y genotipificación exitosa (asignación de un tamaño para cada alelo), lo que nos confirma que las condiciones de amplificación que se utilizaron en el presenta trabajo han sido óptimas. Lo mismo fue comprobado usando el paquete genético del *software* R, Adegnet 1.4-1 (Jombart 2014), mediante el cuadro 10, el cual nos señala que hay un 6.83% de datos que no se pudieron registrar.

Cuadro 10: Porcentaje de muestras registradas con éxito en 5 loci de microsatélites de *Coryphaena hippurus*. En paréntesis el porcentaje de alelos que no se pudieron registrar por errores de amplificación, alelos nulos u otros errores estocásticos.

Punto de muestreo	N° muestras extraídas	N° de muestras registradas exitosamente				
		CHI008-A	CHI002	CHI023	CHI037	CHI008
Chimbote	32	31 (3,1%)	31 (3,1%)	31 (3,1%)	29 (9,4%)	31 (3,1%)
Casma	14	14 (0%)	14 (0%)	14 (0%)	14 (0%)	13 (7,1%)
Huanchaco	24	22 (4,4%)	22 (4,4%)	20 (13%)	20 (3%)	20 (3%)
Sechura	40	37 (7,5%)	38 (5%)	39 (2,5%)	36 (10%)	36 (10%)
Végueta	40	39 (2,5%)	34 (15%)	35 (12,5%)	35 (12,5%)	32 (20%)
Ica sur	42	38(9,5%)	39(7,1)	41(2,4%)	41(2,4%)	33 (21,4%)



			%)			
Tacna sur	49	48 (2%)	49(0%)	48 (2%)	49 (0%)	45 (8,2%)
Total	241	229 (4,6%)	227 (5,4%)	228 (5%)	224 (6,7%)	210 (12,5%)
Porcentaje		95,4%	94,6%	95%	93,3%	87,5%

## VI.2. Procesamiento y análisis de datos

### VI.2.1. Análisis de la diversidad genética:

En la figura 8 podemos visualizar la relación entre el tamaño muestral y el número de alelos encontrados para cada población. Cabe mencionar que el número de alelos representa un conteo del número de alelos diferentes presentes en cada una de las poblaciones muestrales en el íntegro de los loci. El número de alelos totales fluctuó desde 58 para Végueta (n=40) hasta 69 para Ancash-Libertad (n=70).

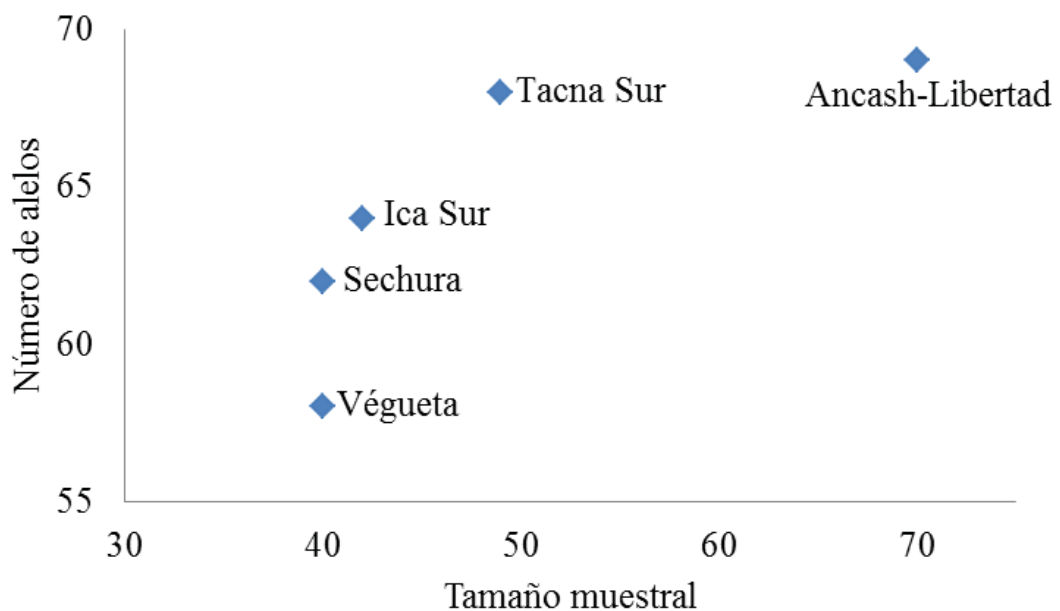


Figura 8: Numero de alelos en el total de loci por cada punto muestral.

En general se muestra una buena lectura de alelos para cada una de las cinco poblaciones consideradas. Ancash-Libertad, el punto con más tamaño muestral ( $n=70$ ), no presenta un número de alelos más numeroso que Tacna Sur, el cual tiene un tamaño muestral de 49. Ambos están en el mismo nivel. Esto hace pensar que se han registrado los alelos de cada punto muestral de una manera que sean representativos.

Al analizar el número de alelos promedio por cada locus (figura 9), vemos que Chi008 es el que presenta la mayor cantidad de alelos diferentes, siendo el más polimórfico. Mientras tanto Chi002 presenta la menor cantidad de alelos. A pesar de que todos los loci son polimórficos, no todos tienen el mismo poder informativo. Estos valores son consistentes con los presentados por Tripp-Valdez *et al.* (2010).

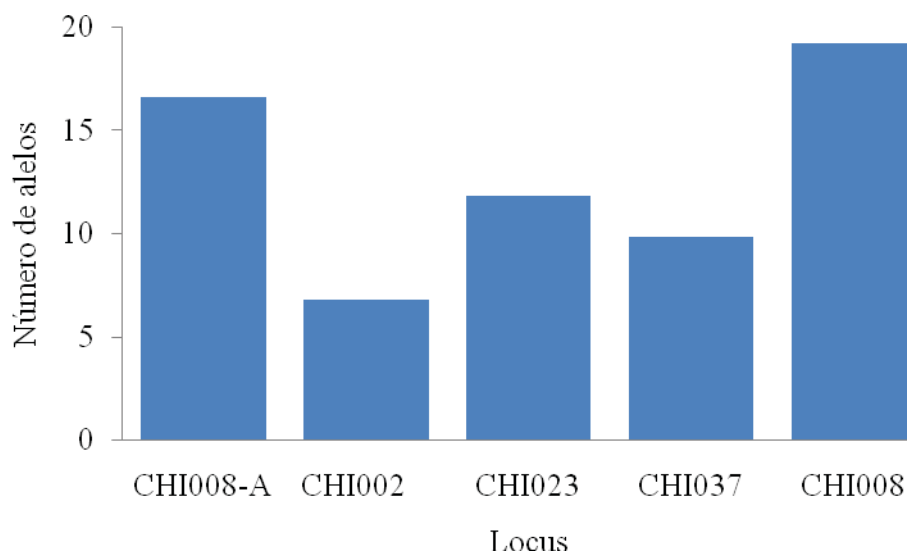


Figura 9: Número total de alelos en promedio por cada locus.

El cuadro 11 nos presenta los resultados del análisis, realizado por el software Micro-Checker, para evaluar la presencia de alelos nulos en cada uno de los loci por población. Éstos se corrigieron mediante el uso del mismo software. Luego teniendo los genotipos corregidos, se procedió a calcular los índices de diversidad genética.

Cuadro 11: Presencia de alelos nulos, por locus y población, detectados y corregidos por el programa Micro-Checker.

	<b>Chi008A</b>	<b>Chi002</b>	<b>Chi023</b>	<b>Chi037</b>	<b>Chi008</b>
Sechura	SI	SI	SI	SI	SI
Ancash-Libertad	SI	SI	SI	SI	NO
Végueta	SI	SI	SI	SI	SI
Ica Sur	NO	SI	SI	SI	SI
Tacna Sur	SI	SI	SI	SI	SI

En el cuadro 12 se ven los resultados que muestran el número de alelos y la heterocigosidad observada y esperada. El número de alelos, en promedio, para los 5 loci y para todos los puntos de muestreo fue 13, variando entre 6,8 para el locus Chi002 hasta 19,2 para Chi008. En general todos los puntos muestrales presentaron igual número de alelos en promedio para todos los loci, éste fue entre 12 y 14 alelos.

Por el lado de la heterocigosidad media observada, para todos los loci y todas las poblaciones, ésta fue en promedio de 0,75; fluctuando entre 0,73 (Végueta) y 0,77 (Ancash-Libertad).

Cuadro 12: Resumen de la diversidad genética para 5 loci de microsatélites en 5 puntos de muestreo de perico en el océano pacífico sureste.

Punto de muestreo	Parámetros	Locus					Promedio
		CHI008-A	CHI002	CHI023	CHI037	CHI008	
<b>Sechura</b>	<b>N</b>	37	25	32	27	35	31
	<b>Na</b>	18	6	11	9	18	12
	<b>Ho</b>	0,811	0,720	0,750	0,704	0,771	0,751
	<b>He</b>	0,911	0,792	0,877	0,796	0,913	0,858
<b>Ancash-Libertad</b>	<b>N</b>	64	55	55	41	64	56
	<b>Na</b>	17	9	12	10	21	14
	<b>Ho</b>	0,813	0,745	0,764	0,732	0,797	0,770
	<b>He</b>	0,912	0,774	0,845	0,793	0,870	0,839
<b>Végueta</b>	<b>N</b>	34	22	25	25	31	27
	<b>Na</b>	14	6	12	10	16	12
	<b>Ho</b>	0,765	0,682	0,720	0,720	0,742	0,726
	<b>He</b>	0,905	0,754	0,843	0,808	0,891	0,840
<b>Ica Sur</b>	<b>N</b>	38	28	24	35	33	32
	<b>Na</b>	15	8	13	8	20	13
	<b>Ho</b>	0,842	0,714	0,708	0,686	0,788	0,748
	<b>He</b>	0,907	0,765	0,891	0,784	0,927	0,855
<b>Tacna Sur</b>	<b>N</b>	47	28	37	39	45	39
	<b>Na</b>	19	5	11	12	21	14
	<b>Ho</b>	0,787	0,607	0,811	0,744	0,756	0,741
	<b>He</b>	0,911	0,650	0,874	0,829	0,936	0,840
Total	<b>N</b>	44,000	31,600	34,600	33,400	41,600	37
	<b>Na</b>	16,600	6,800	11,800	9,800	19,200	12,84
	<b>Ho</b>	0,803	0,694	0,751	0,717	0,771	0,747
	<b>He</b>	0,909	0,747	0,866	0,802	0,908	0,846

En cuanto al número y frecuencia de alelos privados, estos se reportan en el cuadro 13. Se encontraron alelos privados en todas las poblaciones y en todos los loci excepto Chi002. El presente trabajo reporta un número y diversidad de alelos privados (cuadro 13) relativamente altos en comparación con los resultados reportados por Bayona (2011).

Cuadro 13: Alelos privados por población y locus. Entre paréntesis la frecuencia alélica.

Zona	Chi008A	Chi002	Chi023	Chi037	Chi008
Sechura	171 (0,027) / 181 (0,014)				100 (0,014)
Ancash- Libertad				112 (0,012)	116 (0,008) / 186 (0,008)
Végueta				88 (0,060)	
Ica Sur			107 (0,021) / 135 (0,042)		114 (0,015) / 128 (0,015)
Tacna Sur			139 (0,014)	114 (0,013)	120 (0,100) /124 (0,044)

Se comparó la relación entre la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y la observada ( $H_o$ ) para cada locus, antes y después de corregir las frecuencias alélicas con Microchecker. En la figura 10 se puede observar que antes de realizar la corrección, se pueden apreciar tres loci en los cuales la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) es baja, en relación con la

heterocigosidad esperada ( $H_e$ ). Luego de la corrección de los errores de genotipificación, alelos nulos y demás errores estocásticos de amplificación, se aprecia que esta baja  $H_o$  en esos 3 loci se debe principalmente a errores de genotipificación más que a una baja diversidad.

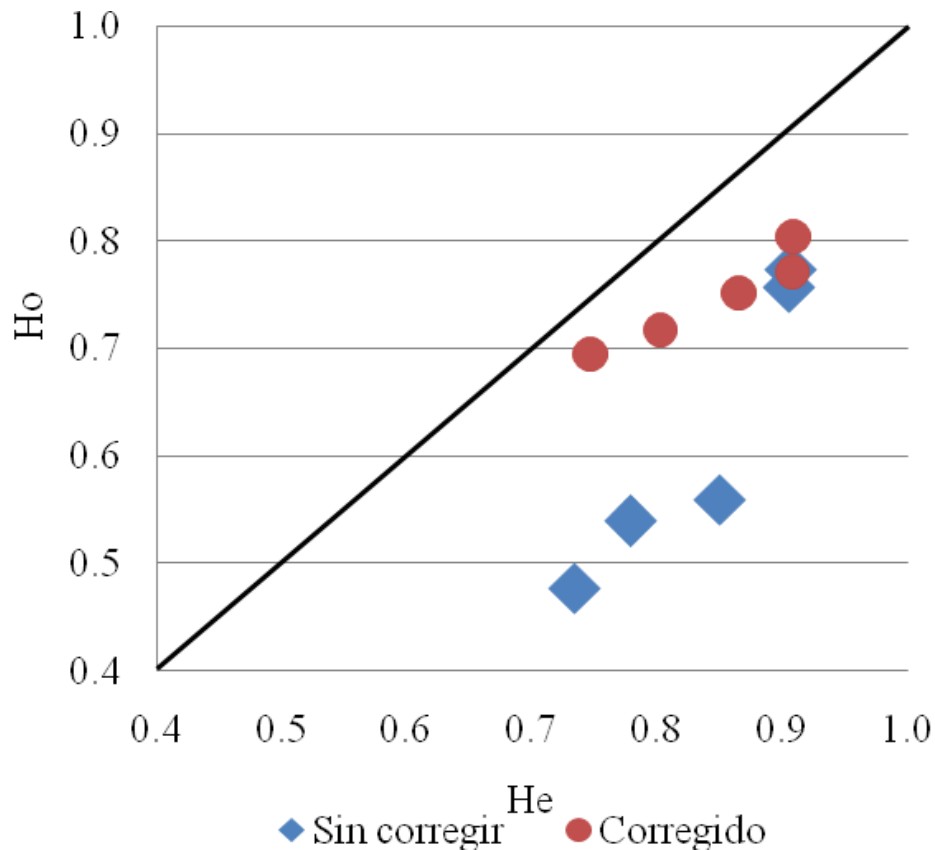


Figura 10: Heterocigosidad observada vs Heterocigosidad esperada para cada Loci, con y sin corrección con Microchecker.

En la figura 11 se hace la comparación entre las  $H_e$  y  $H_o$  en todas las poblaciones evaluadas, antes y después de realizar las correcciones de alelos nulos y errores de genotipificación. Se observa que la heterocigosidad observada es mayor luego de la corrección, es decir, disminuye el exceso de homocigotos presentes en la primera evaluación. Sin embargo, en todas las poblaciones la  $H_o$  corregida está por debajo del  $H_e$  bajo el supuesto de equilibrio Hardy-Wainberg. Se puede observar que a pesar de la corrección tenemos un déficit de heterocigotos en todas las poblaciones.

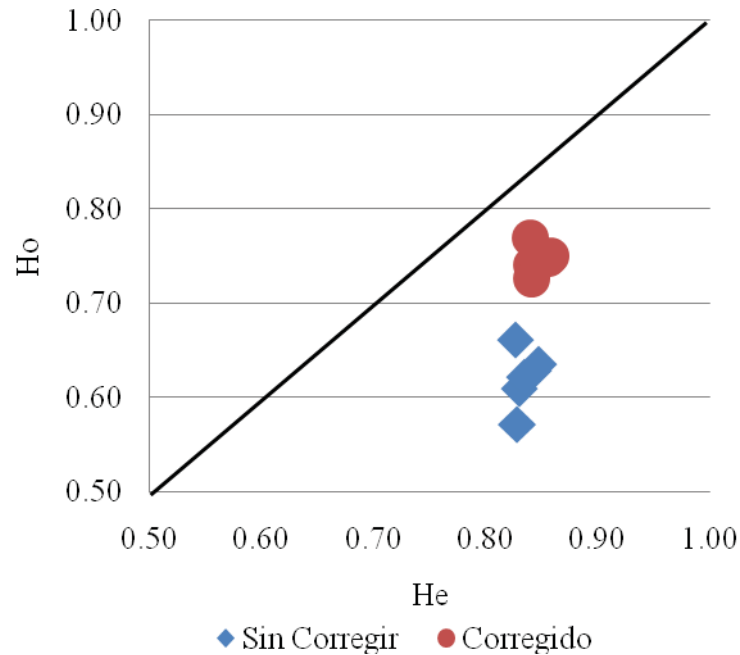


Figura 11: Heterocigosidad observada vs Heterocigosidad esperada para cada población, con y sin corrección con Microchecker.

Tripp-Valdez *et al* (2010), obtuvieron un número de alelos promedio de 14,27, el cual fluctuó entre 11,4 y 18 en los 5 loci de microsatélites. Por su parte Bayona (2011) obtuvo un promedio general de 12,6 alelos, fluctuando en un rango de entre 10,6 y 15. Este último trabajo muestra valores similares al del presente trabajo ( $N_a = 12,84$ ). El alto nivel de polimorfismo que presentan cada uno de los loci, se soporta en el estudio realizado por Brooker *et al* (1994), quien comparó marcadores microsatélites en peces teleósteos (trucha arcoíris, salmón atlántico y bacalao del atlántico) y algunos mamíferos (humanos, porcinos y caninos). El principal descubrimiento de esta comparación fue que el largo de las cadenas de microsatélites de los peces fue al menos el doble que cualquiera de las cadenas de los mamíferos, lo cual les confiere una mayor probabilidad de mutar. Esto les concede un gran potencial como marcadores genéticos en estudios poblacionales.

Comparando las heterocigosidades de los trabajos de Tripp-Valdez *et al* (2010) y Bayona (2011), podemos observar que en general el valor del presente trabajo es menor que el calculado por estos autores. El valor de la  $H_e$  promedio del presente trabajo fue de 0,85 y el de  $H_o$  promedio, 0,75. Por su parte Bayona (2011) obtuvo un valor similar (0.83) para

He; sin embargo su  $H_o$  fue también de 0.83, mayor a la del presente trabajo. Valores similares a los de Bayona fueron reportados también por Tripp-Valdez *et al* (2010):  $H_o = 0.86$  y  $H_e = 0.83$ ). Podemos inferir que para el caso del perico muestreado para el presente estudio, el nivel de homocigosis observado es más elevado que el obtenido en otras partes del océano pacífico.

Otros autores, que han trabajado con especies altamente migratorias han reportado valores en los que las heterocigidades esperadas son mayores a las observadas. Por ejemplo Muths *et al* (2009) encontró los siguientes valores en un estudio poblacional en pez espada (*Xiphias gladius*):  $H_e = 0.771 - 0.784$  y  $H_o = 0.640$  y  $0.720$ , mientras que Gonzalez *et al* (2008) para atún *Atlantic big eye* (*Thunnus obesus*) obtuvo  $H_e = 0.901$  y  $H_o = 0.742$ .

La prueba de ligamiento entre pares de loci por localidad resultó no significativa en cada una de las comparaciones (cuadro 14), por lo que se asume que todos los loci se comportaron como unidades independientes entre sí.

Cuadro 14: Comparaciones entre pares de loci del test de desequilibrio por ligamiento realizado en GenePop v. 4.3.

Par de Loci		Valor P
CHI008-A	CHI002	0.712355
CHI008-A	CHI023	0.9318
CHI002	CHI023	0.729033
CHI008-A	CHI037	0.677822
CHI002	CHI037	0.716514
CHI023	CHI037	0.882469
CHI008-A	CHI008	1
CHI002	CHI008	0.714454
CHI023	CHI008	0.985918
CHI037	CHI008	0.619602

De las 25 pruebas para medir la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (un test por locus en cada población, cuadro 15), solo cuatro fueron significativas con un p-



$value < 0.05$  (corregido con Bonferroni:  $p\ value < 0,002$ ). Estas fueron Végueta para el locus Chi008A ( $p = 0,0005$ ), Végueta para el locus Chi008 ( $p = 0,0004$ ), Ica Sur para el locus Chi023 ( $p = 0,0014$ ), Ica para el locus Chi008 ( $0,0002$ ) y Tana Sur para el locus Chi008 ( $0,0000$ )

Cuadro 15 Índice de fijación – Fis (Weir y Cockerman) para cada una de las 25 pruebas para medir desequilibrio del modelo H-E. Los  $p\text{-value}$  se muestran entre paréntesis y los valores significativos para la desviación al equilibrio H-W se encuentran en negrita.

	Fis (Weir y Cockerman)				
	Chi008A	Chi002	Chi023	Chi037	Chi008
Sechura	0.1234 (0.2802)	0.1111 (0.1817)	0.1603 (0.0206)	0.1349 (0.0074)	0.1692 (0.1107)
Ancash- Libertad	0.1170 (0.4827)	0.0465 (0.6668)	0.1057 (0.0247)	0.0899 (0.2183)	0.0922 (0.0138)
Végueta	<b>0.1698</b> <b>(0.0005)</b>	0.1189 (0.3119)	0.1660 (0.0476)	0.1290 (0.0569)	<b>0.1834</b> <b>(0.0004)</b>
Ica Sur	0.0850 (0.0469)	0.0847 (0.0721)	<b>0.2250</b> <b>(0.0014)</b>	0.1397 (0.1119)	<b>0.1651</b> <b>(0.0002)</b>
Tacna Sur	0.1469 (0.0183)	0.0838 (0.7791)	0.0859 (0.0168)	0.1163 (0.0584)	<b>0.2038</b> <b>(0.0000)</b>

A pesar de que solo cinco de los Fis son estadísticamente significativos en su desviación del equilibrio H-W; en general, cada uno de los 25 valores Fis calculados se desvían del equilibrio para el lado positivo, es decir, evidencian una posible deficiencia de heterocigosis. Sin embargo no se ha definido un patrón claro de desviaciones del equilibrio H-W para alguna de las poblaciones a través de todos sus loci.

Tripp-Valdez *et al* (2010) menciona que la desviación positiva del equilibrio H-W es algo recurrente en muchos peces marinos. Las principales consecuencias de este déficit de heterocigotos se relacionan con los sistemas reproductivos propios de los peces, la presencia de alelos nulos y al efecto Wahlund (Tripp-Valdez *et al*, 2010). Kotoulas *et*

al(2006), en un estudio realizado para analizar la estructuración poblacional global del pez espada (*Xiphias gradius*), señala que el déficit de heterocigosis también puede ser producto de una sub estructuración de la población, lo cual es esperable en una especie altamente migratoria con distribución amplia. Los individuos en una población tienden a reproducirse con aquellos que estén más cerca (Holsinger, 2012). La mayoría de poblaciones naturales se desvía en cierto grado de la condición ideal de apareamiento aleatorio, sobre todo en aquellas especies cuyo rango de distribución excede la distancia que recorre un individuo en su periodo de vida, por lo cual es improbable que el entrecruzamiento sea aleatorio (Bayona, 2011). Otros estudios en especies altamente migratorias presentan también un patrón marcado de déficit de heterocigosidad (Muths *et al*, 2009 y Gonzalez *et al*, 2008)

Para el caso particular del *Coryphaena hippurus* del Golfo de California, usando los mismos microsatélites que el presente estudio, en Tripp-Valdez *et al* (2010) se encontró que la mayoría de desviaciones al equilibrio H-W fueron hacia el exceso de heterocigosis. En ese trabajo se menciona que esto es debido a la mezcla y la reproducción entre individuos de diferentes cohortes, lo que podría haber ocasionado diferentes composiciones alélicas. Sin embargo en ese estudio tampoco se encontraron patrones claros que se repitan en todos los loci de una locación, lo que deja abierta la posibilidad de que esta desviación del equilibrio sea una consecuencia de eventos estocásticos en la distribución de las frecuencias alélicas. Por su parte, Bayona (2011), en su estudio genético poblacional con cobertura en todo el océano pacífico, encontró déficit de heterocigotos en diez de las 65 pruebas de desviación al equilibrio H-E que realizó; sin embargo no pudo atribuir esta desviación al efecto Wahlund (deficiencia de heterocigotos debido a la subestructuración poblacional) debido a que no encontró un patrón claro en todos los loci para las localidades que se desvían de H-W.

El perico es un desovador parcial y aun no se ha definido áreas específicas de desove, como si se ha hecho para especies como *Thunnus obesus*, *Thunnus thynnus* y *Negaprion brevirostri*, en las cuales se ha reportado un efecto Wahlund (Bayona, 2011).

### VI.2.2. Estructura poblacional

El  $F_{st}$  global obtenido fue de 0,0092, valor altamente significativo ( $p$ -value = 0,000). Al analizar los valores de  $F_{st}$  por locus se visualiza que los que aportan más a generar esta diferenciación son Chi002 ( $F_{st} = 0,0275$ ,  $p$ -value = 0,000) y Chi008 ( $F_{st} = 0,0187$ ,  $p$ -value = 0,000).

Comparando el  $F_{st}$  entre pares de poblaciones mediante y su significancia (cuadro 13,  $p$ -value < 0,05 previamente corregido por Bonferroni), se visualiza que solo los valores relacionados con la población Tacna Sur mostraron diferencias significativas. Este punto muestral ha diferido de todos y cada uno de los demás puntos de muestreo (Sechura, Ancash-Libertad, Végueta e Ica Sur).

Cuadro 16:  $F_{st}$  y  $p$ -value de las comparaciones realizadas entre pares de poblaciones. Valores arriba de la diagonal:  $p$ -value y valores abajo de la diagonal:  $F_{st}$ . En negrita: valores que se desvían del equilibrio con un  $p$ -value < 0.05 ( $p$ -value < 0.005, luego de ser corregidos mediante Bonferroni)

	Sechura	Ancash-Libertad	Végueta	Ica Sur	Tacna Sur
Sechura	-	0.116975	0.085748	0.021975	<b>0.000000</b>
Ancash-Libertad	0.0001	-	0.001505	0.002915	<b>0.000000</b>
Végueta	0.0003	0.0061	-	0.091140	<b>0.000000</b>
Ica Sur	0.0004	0.0045	-0.0012	-	<b>0.000005</b>
Tacna Sur	<b>0.0175</b>	<b>0.0287</b>	<b>0.0093</b>	<b>0.0103</b>	-

El cuadro 14 muestra un análisis jerárquico AMOVA. En el cual  $F_{st}$  es igual a 0,01003; bastante similar al obtenido en el cálculo del  $F_{st}$  global calculado con Genepop v. 4.2. Además el valor  $F_{is}$  es igual a 0,138; valor que también es coherente con los análisis previos realizados. Por último el 85,15% de la varianza es explicada por la variación de los individuos.

Cuadro 17: Análisis Molecular de Varianza – AMOVA entre las poblaciones muestreadas de *Coryphaena hippurus* en el océano pacífico peruano.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Varianza</b>	<b>Porcentaje de la variación</b>
Entre poblaciones	21.668	0.02172	1,004%
Dentro de las poblaciones	446.615	0.29973	13,85%
Dentro de individuos	349.500	184.267	85,15%
Total	817.784	216.412	100

Adicionalmente se hizo un AMOVA asumiendo dos agrupaciones: 1.- la localidad de Tacna Sur y 2.- el resto de puntos muestrales (cuadro 18). Esto se hizo debido a que los  $F_{st}$  por pares de poblaciones mostraron que la localidad de Tacna Sur presentó diferenciación significativa con respecto a los demás puntos muestrales. El valor  $F_{ct}$  entre estas agrupaciones fue de 0,0189; lo que quiere decir que alrededor del 1,9% de la varianza es explicada al comparar estas dos agrupaciones. Este valor podría estar sosteniendo la hipótesis de existencia de estructuración poblacional en la región Tacna.

Cuadro 18: Análisis Molecular de Varianza – AMOVA formando dos grupos: 1.- Tacna Sur y 2.- Todas las demás poblaciones de *Coryphaena hippurus* en el océano pacífico peruano.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Varianza</b>	<b>Porcentaje de la variación</b>
Entre Tacna Sur y el resto de poblaciones	7.200	0.04149	1,891
Entre poblaciones dentro de estos dos grupos	8.289	0.00448	0,204
Entre individuos dentro de estos dos grupos	440.073	0.26930	12,276
Dentro de individuos	350.000	187.845	85,628
Total	805.563	219.373	100

El Fst global obtenido en este trabajo es relativamente superior al reportado por Bayona (2011), quien obtuvo un Fst de 0.0058 ( $p\text{-value} = 0,000$ ) al analizar muestras de todo el océano pacífico; mientras que Tripp-Valdez (2010) obtuvo un Fst de 0.01 al hacer el análisis en el Golfo de California, zona de menor extensión pero más accidentada que la presentada por Bayona (2011). Estos valores coinciden con los encontrados para otras especies migratorias: 1.- pez espada (Fst = 0.02) en Muths *et al* (2009), 2.- Tiburón de coral entre 0.025 y 0.148 en Vignaud *et al* (2013) y 3.- albacora (*Thunnus alalunga*) (Fst = 0.013) en Davies *et al* (2011).

Los peces marinos tienen valores bajos de Fst en comparación con otras especies. Ward *et al* (1994), promediaron una muestra de 57 especies diferentes de peces marinos, obteniendo un Fst de  $0.062 \pm 0.011$ ; mientras que en especies de aguas dulce, en promedio de 49 especies, obtuvieron un Fst de  $0.222 \pm 0.031$ . El presente trabajo, a pesar de tener valores mayores que los de Bayona (2011) y Tripp-Valdez (2010), presentó un número mucho menor al del promedio presentado por Ward (1994) para especies marinas. Sin

embargo esto no lo hace insignificante, dado que es bastante sólido cuando restringimos el análisis de Ward *et al* (1994) a especies marinas altamente migratorias.

En este estudio Tacna Sur es el punto geográfico de muestreo más austral de todos y tal vez sea uno de los extremos sur de la distribución del recurso. Aunque se han reportado desembarques del recurso más al sur, en Chile, éstos no han sido de gran magnitud. En el 2013 se han registrado 478 toneladas métricas desembarcadas (SERNAPESCA, 2014). Estos desembarques solo se han registrado en las tres zonas más al norte de Chile: 1.- La región XV, Arica y Parinacota, con 175 toneladas; 2.- La región I, Tarapacá, con 249 toneladas y 3.- La región II, Antofagasta, con 54 toneladas. Es muy probable que por su biología reproductiva y tiempo de vida corto, el perico, en su extremo sur de distribución no tenga las mismas probabilidades de reproducirse con individuos de otras zonas de su amplio espectro de distribución. Evaluando una serie de tiempo de desembarques chilenos desde el 2006 al 2014 (Figura 12), se puede ver que los mayores desembarques se han realizado en esos años en la XV o I región de Chile, es decir, las regiones septentrionales.

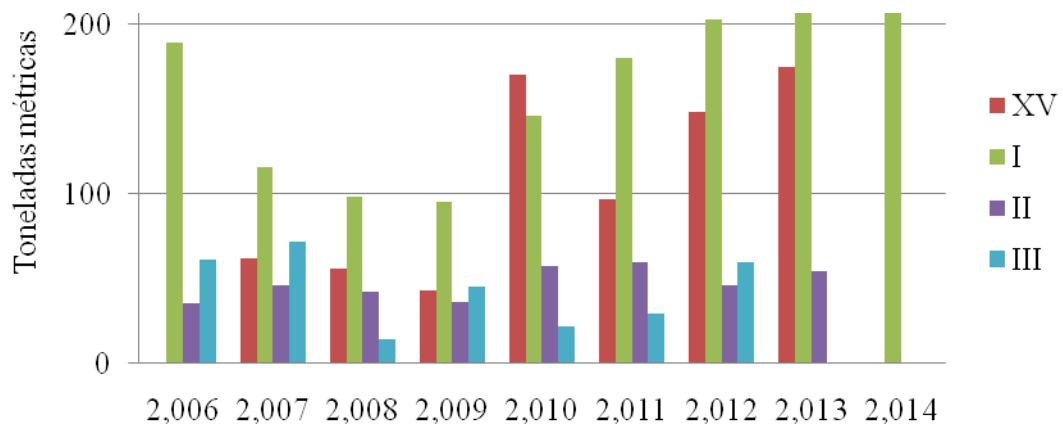


Figura 12: Desembarques en Chile en las Regiones XV: Arica y Parinacota, I: Tarapacá, II: Antofagasta y III: Atacama.

El perico al ser poiquilotermo, es decir, al carecer de mecanismos reguladores de su temperatura corporal, necesita mantenerse en una temperatura específica para su supervivencia y óptimo desarrollo. Está restringido a aguas tropicales y subtropicales y su

acercamiento a aguas peruanas está directamente relacionado al ingreso de aguas con estas características. Por tal razón, el análisis del acercamiento y alejamiento de las temperaturas tropicales y subtropicales con respecto a la costa peruana, es una herramienta básica utilizada por la mayoría de pescadores artesanales de perico en Perú (comunicación personal con Gustavo Fiestas Purizaca, armado pesquero de la zona de Paita - Piura). Estos al no estar provistos con mejores tecnologías que permitan identificar al recurso, siguen al mismo en su amplia distribución utilizando los gráficos satelitales de Temperatura Superficial del Mar publicados en el portal del Instituto del Mar del Perú – IMARPE (en línea: [http://satelite.imarpe.gob.pe/uprsig/sst\\_prov.html](http://satelite.imarpe.gob.pe/uprsig/sst_prov.html)).

En la Figura 13 vemos una secuencia de gráficos de temperatura superficial del mar (TSM) desde octubre de 2013 hasta diciembre de 2013. En esta época las aguas cálidas, representadas por las masas de agua en tonalidades verdes y amarillas, empiezan a acercarse al Perú desde el noroeste hasta las costas de las regiones del norte de Perú; sin embargo otra parte de estas aguas ingresan de manera paralela a la costa directamente al sur del país. En las Figuras X.A y X.B podemos ver que en estos meses del año, las costas de los extremos norte y sur del país, tuvieron aguas cálidas mientras que entre ambas masas de agua tuvimos aún una gran masa de agua fría. Para el mes de diciembre 2013 (Figuras X.C y X.D) siguió en aumento la temperatura superficial del mar conservando ese núcleo de temperatura particular para el extremo sur del país, el cual siguió siendo más caliente que el agua del sur-centro del país.



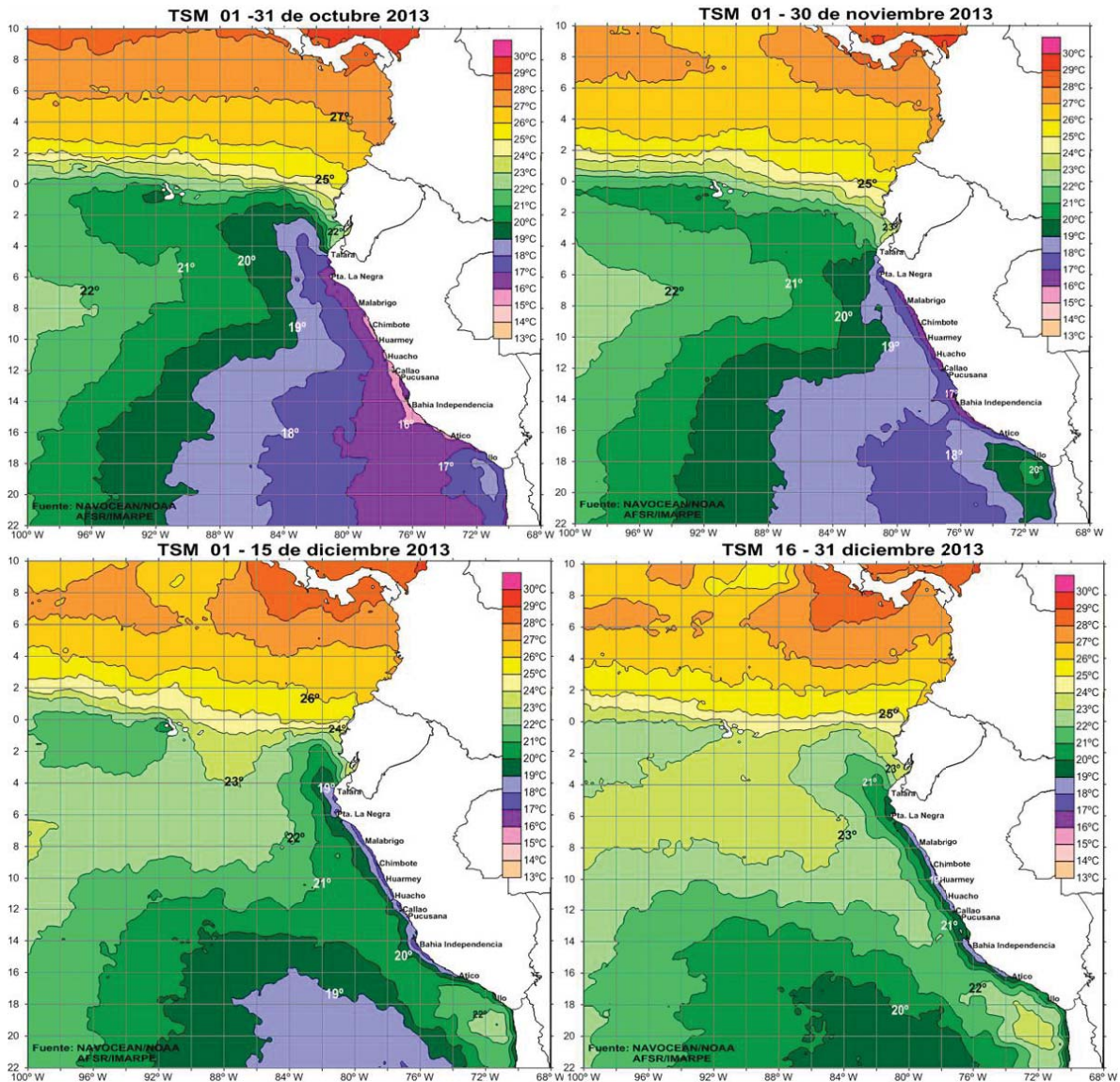


Figura 13: Temperatura Superficial del Océano Pacífico Sureste entre octubre y diciembre de 2013. Fuente: IMARPE. (A.- Del 1 al 31 de octubre de 2013. B.- Del 1 al 30 de noviembre de 2013. C.- del 1 al 15 de diciembre de 2013. D.- Del 16 al 31 de diciembre de 2013).

En la Figura 14 podemos ver los gráficos de temperatura superficial del mar en las épocas en donde se dieron los más importantes desembarques de *C. hippurus*, así mismo es la época en la que se colectaron las muestras de tejido para el presente trabajo. Podemos ver que la TSM siguió el mismo patrón de meses previos: una masa de agua cálida en el sur del país y una masa intermedia menos cálida.



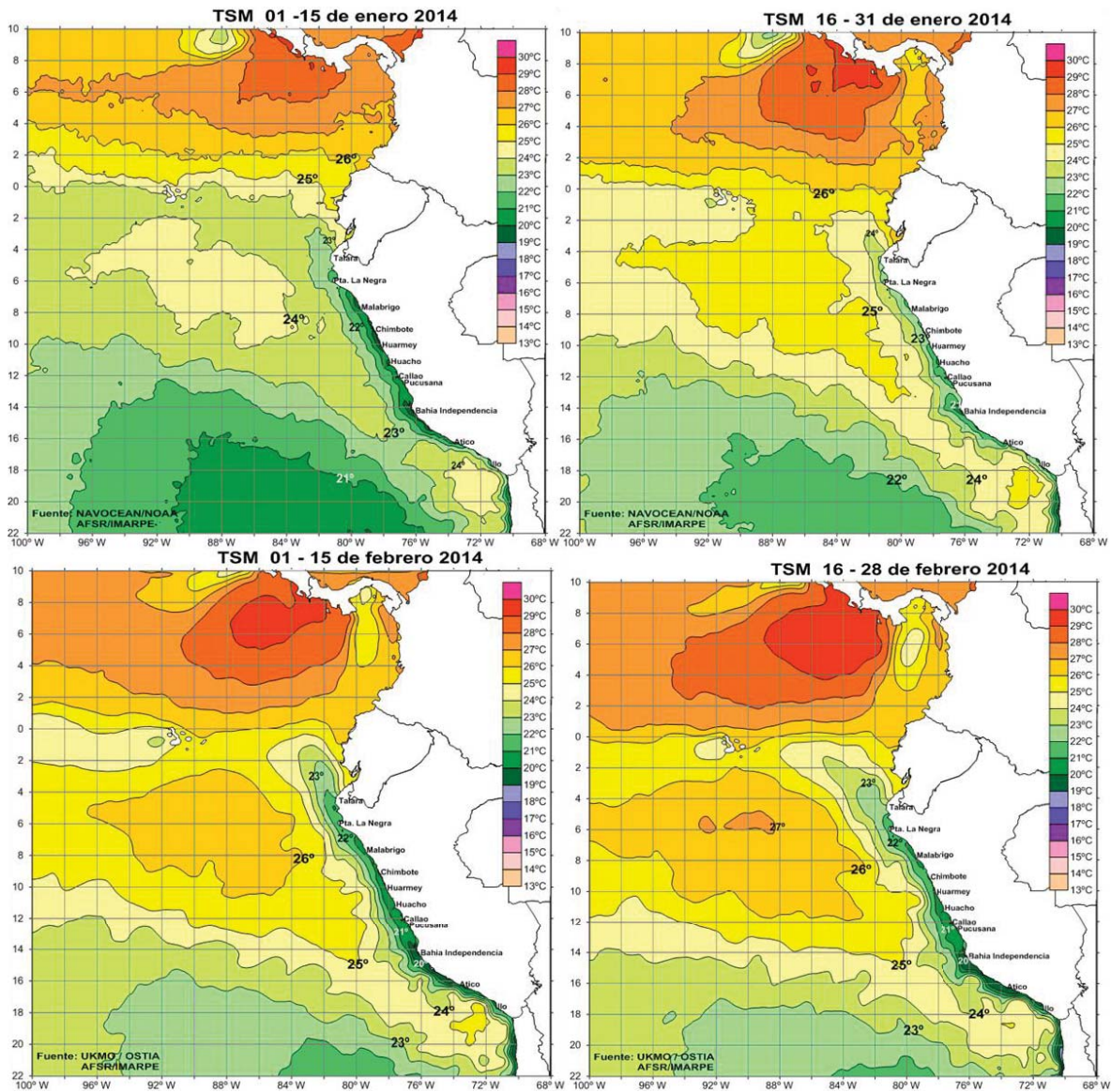


Figura 14: Temperatura Superficial del Océano Pacífico Sureste entre enero y febrero de 2014. Fuente: IMARPE. (A.- Del 1 al 15 de enero de 2014. B.- Del 16 al 31 de enero de 2014. C.- del 1 al 15 de febrero de 2014. D.- Del 16 al 28 de febrero de 2014).

La flota pesquera especializada en la pesca de perico está bien diferenciada en el norte y el sur del país, debido al esfuerzo de pesca que deben de realizar. En el norte son de mayor capacidad de bodega (10-30 toneladas métricas) mientras que en el sur van desde las 4 a 15 toneladas métricas de capacidad de bodega. En el norte se requiere hacer viajes más largos para poder llegar a las zonas de pesca mientras que en el sur los viajes son más cortos (De la Puente *et al*, 2015). Esto quiere decir que en la práctica existen dos dinámicas

de pesca para el mismo recurso: una con mayor extensión geográfica para el corredor norte-centro del país y otra más simple y pequeña para el sur del país.

El software Structure 2.4.3 evidencia la posibilidad de tener dos *clusters*, al mostrar  $k = 2$  como más el probable (figura 15), debido a que es el que presenta la menor desviación estándar y la mayor probabilidad; sin embargo se considera que raramente el logaritmo de la probabilidad de data  $L(k)$  sirve para hallar el verdadero valor de  $k$ , motivo por el cual se utilizó también la variación de  $k$  ( $\Delta k$ ) (figura 16), la cual muestra mayor precisión en la definición del número de *clusters* (Evanno *et al*, 2005). La Figura 16 muestra consistencia en la hipótesis inicial, dejando evidencia la formación de dos *clusters* en las muestras de *Coryphaena hippurus* en el océano pacífico peruano.

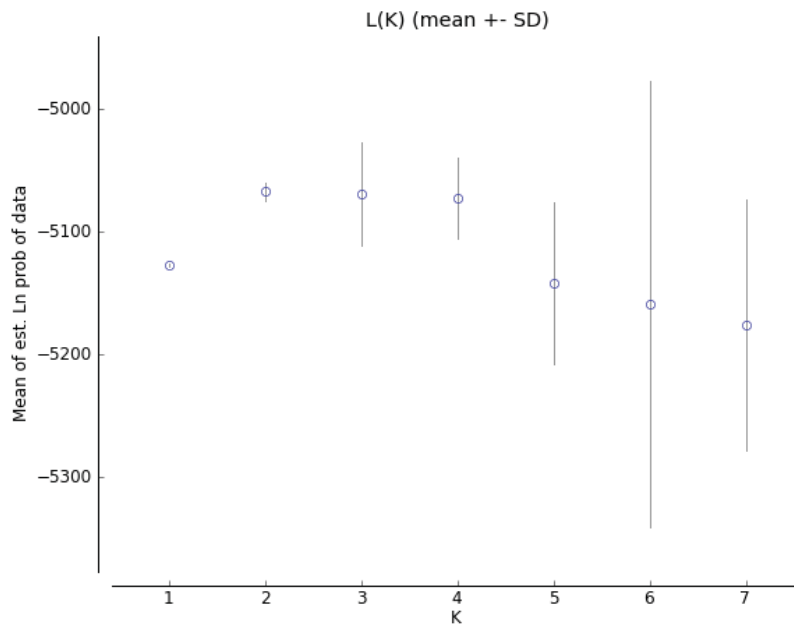


Figura 15: Gráfica del logaritmo de la probabilidad de data  $L(k)$  y su desviación estándar a lo largo de los posibles números de *clusters* ( $k$ ).

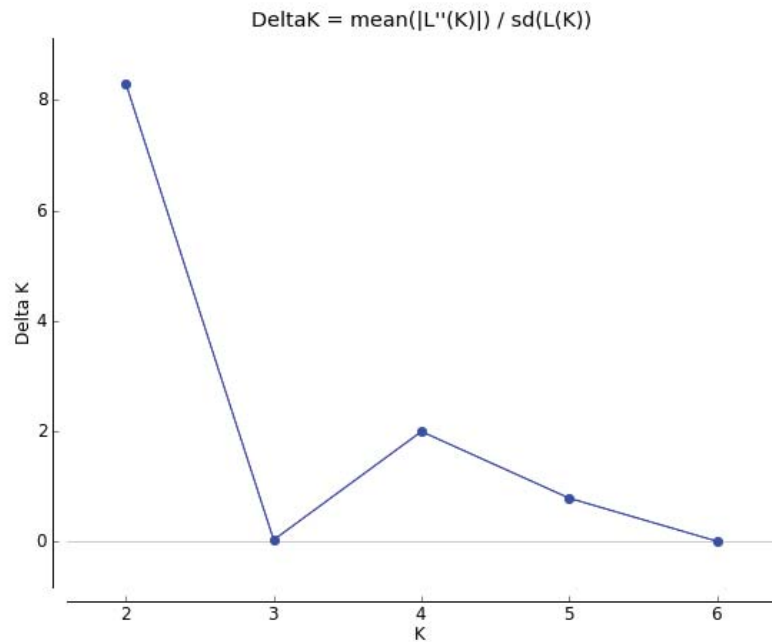


Figura 16: Variación de  $k$  a lo largo de los posibles números de clusters evaluados.

La figura 17 parte del supuesto de que hay dos poblaciones ( $k = 2$ ), y analiza la probabilidad, de cada uno de los individuos muestreados, de pertenecer a una u otra población. La población uno está representada en color verde mientras que la población dos en rojo. En términos generales esta gráfica muestra una gran mezcla entre todos los individuos; sin embargo en las muestras recogidas en Tacna sur (número 7 del eje horizontal) se pueden apreciar diferencias respecto al resto de los puntos de muestreo.

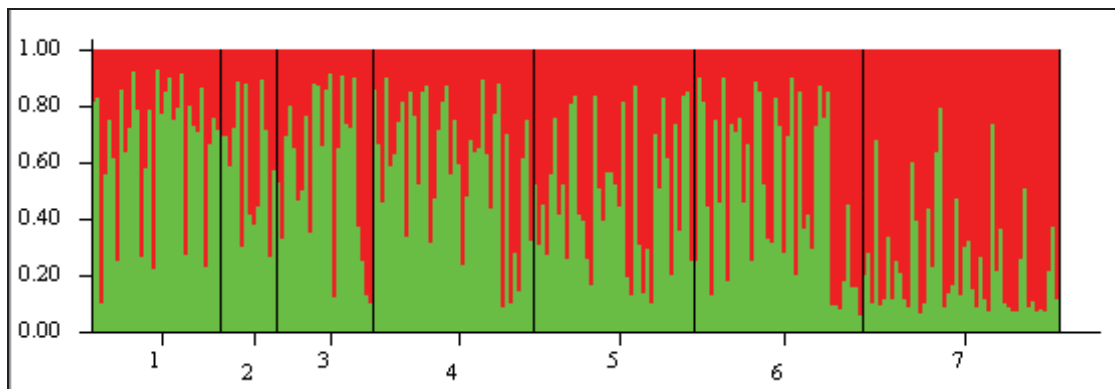


Figura 17: Gráfica de probabilidades, por región muestreada (1: Chimbote, 2: Casma, 3: Huanchaco, 4: Sechura, 5: Végueta, 6: Ica sur y 7: Tacna sur), bajo el supuesto de que hay dos poblaciones ( $k = 2$ ).

El análisis de componentes principales – PCA no brindó información que pueda ser útil para sostener la hipótesis de existencia de dos poblaciones. La figura 18 no muestra una formación de *clusters* mas si una mezcla entre todas las poblaciones. Los *eigenvalues* tampoco siguen el patrón habitual que muestran en poblaciones estructuradas.

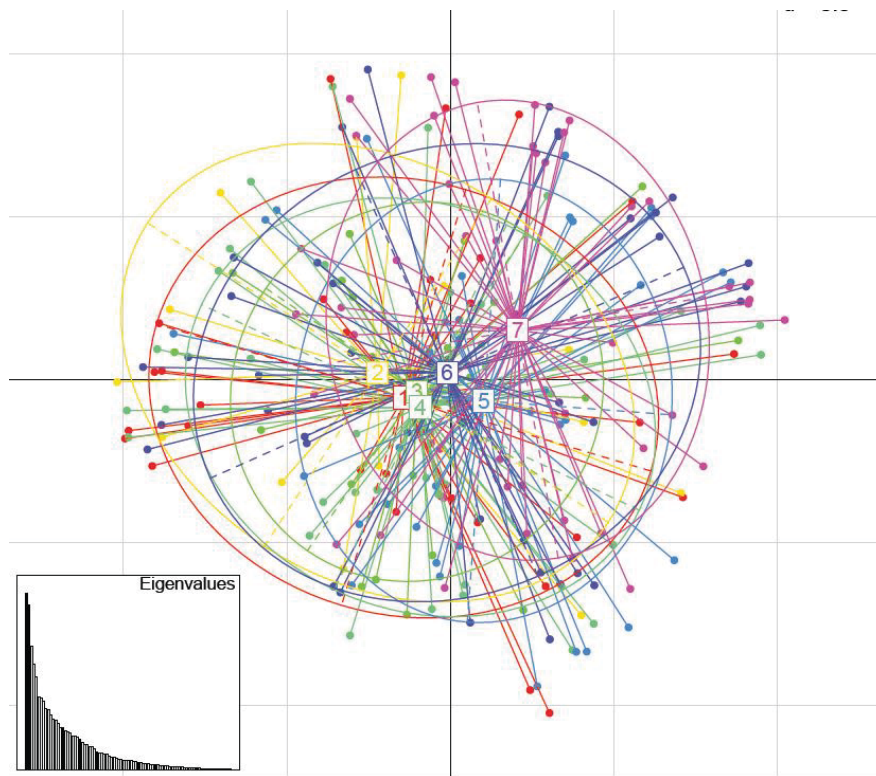


Figura 18: Análisis de componentes principales (PCA) en las muestras de *Coryphaena hippurus* del pacífico peruano. 1: Chimbote, 2: Casma, 3: Huanchaco, 4: Sechura, 5: Végueta, 6: Ica sur y 7: Tacna sur.

## VII. Conclusiones

1. La diversidad genética observada en los marcadores moleculares es alta en las poblaciones del pacífico peruano, indicio de buena salud genética del recurso en la zona.
2. Hay estructuración poblacional significativa entre las muestras de perico tomadas en el océano pacífico peruano durante los meses de enero y febrero de 2014.  $F_{st} = 0,009$  y  $p\text{-value} = 0,000$ . El sur del país, en comparación con el resto de puntos muestrales, muestra grandes niveles de diferenciación.  $F_{ct} = 0,01891$ .  $0,0093 < F_{st} < 0,0337$  y  $p\text{-value} = 0,000$ .

## VIII. Recomendaciones

1. Repetir el presente estudio utilizando un mayor número de loci de microsátélites y otros marcadores moleculares (ej: ADN mitocondrial NADH1) con la finalidad de comparar estos estudios con los resultados del presente estudio.
2. Repetir el estudio haciendo un muestreo más amplio, que abarque colectas realizadas en diferentes años y en diferentes estaciones del año.
3. Tomando como base los resultados de este estudio, se recomienda a la administración de este recurso evaluar la necesidad de manejar el perico tomando en cuenta dos dinámicas bien diferenciadas: la del norte-centro del país y la del sur.
4. Para futuros trabajos genéticos con peces marinos se recomienda usar el protocolo de extracción de ADN de bajo costo usado en la presente tesis. Es una buena forma de efectivizar los recursos invertidos en la investigación genética pesquera.

## IX. Referencias bibliográficas

Aguirre, E. 2007. Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. pp. 49-61. En: Eguarte, L., Souza, V., y Aguirre, X. 2007. Ecología Molecular (compiladores) Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. 592 pp.

Allendorf, A. W. y Luikart, G. 2007. Conservation and the Genetics of populations. Blackwell Publishing. Pp. 663.

Antoniou, A y Magoulas, A, 2014. Application of mitochondrial DNA in stock identification. 257-295 pp. En: Cadrin, S. X., Kerr, L.A. y Mariani, S. Editores. 2014. Stock identification methods: Applications in Fishery science. Second edition. 566 pp. Elsevier.

Ayala, L. y Sánchez-Scaglioni, R. 2014. Captura, esfuerzo y captura incidental de la pesca con espinel en el centro de Perú. Revista peruana de biología 21(3): 243 – 250 (Diciembre 2014).

Barriga, E. (2014). Investigación biológica, pesquera y poblacional de Perico *Coryphaena hippurus* en el Perú. (Diapositivas). Primera reunión técnica sobre el dorado, Manta-Ecuador.

Bayona, N. 2011. Caracterización genética del pez dorado *Coryphaena hippurus* en el océano pacífico mediante marcadores microsatélites. Tesis *Mg. Sc.* Universidad Nacional Autónoma de México.

Baker, S. y Pichler, F. 2009. Hector's dolphin population structure and conservation. En: Hamilton, M. B. 2009. Population genetics. Editado por Wiley-Blackwell. Pp. 396.

Blyton, M. y Flanagan, N. 2012. A comprehensive guide to GeneAIEx 6.5. Australian National University. 131 pp.



Brooker, A., Cooke, D., Bentzen, P., Wright J., y Doyle, R. 1994. Organization of microsatellite differs between mammals and cold-water teleost fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1994, 51(9): 1959-1966, 10.1139/f94-198.

Brophy, D. 2014. Analysis of growth marks in calcified structures: insights into stock structure and migration pathways. 141-170 pp. En: Cadrin, S. X., Kerr, L.A. y Mariani, S. Editores. 2014. *Stock identification methods: Applications in Fishery science*. Second edition. 566 pp. Elsevier.

Cadrin, S.X., Karr, L.A. y Mariani, S. 2014. Stock Identification Methods: An Overview. 1-5 pp. En: Cadrin, S. X., Kerr, L.A. y Mariani, S. Editores. 2014. *Stock identification methods: Applications in Fishery science*. Second edition. 566 pp. Elsevier.

Cadrin, S.C. 2014. Morphometric landmarks. 109-128. En: Cadrin, S. X., Kerr, L.A. y Mariani, S. Editores. 2014. *Stock identification methods: Applications in Fishery science*. Second edition. 566 pp. Elsevier.

Castillo, A. 2007. La selección natural a nivel molecular. pp. 11-48. En: Eguarte, L., Souza, V., y Aguirre, X. 2007. *Ecología Molecular (compiladores)* Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. 592 pp.

Chase, P.D. 2014. Meristics. 171-184 pp. En: Cadrin, S. X., Kerr, L.A. y Mariani, S. Editores. 2014. *Stock identification methods: Applications in Fishery science*. Second edition. 566 pp. Elsevier.

CIAT. 2014. Informe de la primera reunión técnica sobre el dorado, Manta – Ecuador. Octubre, 2014.

Cubillos, L. 2005. Biología pesquera & evaluación de stocks. Laboratorio Evaluación de poblaciones marinas & Análisis de Pesquerías, Departamento de Oceanografía, UDEC, Concepción. 198 p.

Collette, B. 1999. Coryphaenidae. Dolphinfishes, "dolphins". p. 2656-2658. En Carpenter, K., y Niem, V. (editores.) *FAO species identification guide for fishery purposes*.



The living marine resources of the Western Central Pacific. Volume 4. Bony fishes part 2 (Mugilidae to Carangidae). FAO, Rome.

Davies, C., Gosling, E., Was, A., Brophy, D., Tysklind, N. 2011. Microsatellite analysis of albacore tuna (*Thunnus alalunga*): Population genetic structure in the North-East Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. Mar Biol.

De la Puente, S., Flores, D., Grillo, J. y Paredes, C. 2015. Caracterización y análisis de la cadena productiva de perico (*Coryphaena hippurus*) desembarcado en las principales regiones de la costa peruana. Consultoría elaborada para WWF-Perú por Inteligencia Financiera SAC. Lima, 107p.

Díaz-Jaimes, P., Uribe-Alcocer, M., Ortega-García, S., Jean-Dominique, D. 2006. Spatial and temporal mitochondrial DNA genetic homogeneity of dolphinfish populations (*Coryphaena hippurus*) in the eastern central Pacific. Fisheries Research 80 (2006) 333-338.

Díaz-Jaimes, P., Uribe-Alcocer, M., Rocha-Olivares, A., García de León, F.J., Nortmoon, P., Durand, J.D. 2010. Global phylogeography of the dolphinfish (*Coryphaena hippurus*): The influence of large effective population size and recent dispersal on the divergence of a marine pelagic cosmopolitan species. Molecular Phylogenetics and Evolution 57 (2010) 1209–1218.

Earl, D. y Von Holdt, B. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.

Eguiarte, L. E y Souza, V. 2007. Introducción a la ecología molecular. Pp.1-7. En: Eguarte, L., Souza, V., y Aguirre, X. 2007. Ecología Molecular (compiladores) Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. 592 pp.

Eppendorf. 2014. Operating manual: Eppendorf BioPhotometer® D30.

Excoffier, J y Heckel, G. 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. Review. University of Berne. Doi:10.1038/nrg1904.

Excoffier, L. y Lischer, H. 2015. Arlequin v. 3.5. An Integrated software package for population genetics data analysis. Swiss Institute of Bioinformatics. 176 pp.

Evanno, G., Regnaut, S y Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* (2005) 14, 2611–2620.

Falcón, L. I. y Valera, A. 2007. Extracción de ácidos nucleicos. Pp. 499-516. . En: Eguarte, L., Souza, V., y Aguirre, X. 2007. *Ecología Molecular (compiladores)* Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. 592 pp.

FAO. 2014. Global Production by production source 1950-2012.

FAO. 2015a. Fisheries and aquaculture software. FishStatJ - software for fishery statistical time serie. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department (online). Rome.

FAO. 2015b. Species fact sheets: *Coryphaena hippurus* (Linnaeus, 1758). En Linea: <http://www.fao.org/fishery/species/3130/en>

FAO, 1994. World review of highly migratory species and straddling stocks. FAO Fisheries Technical Paper. No. 337. Rome, FAO. 1994. 70 p.

Figarelli, 2007. DNA Amplification in DNA analyst training of nfstc. En línea: <http://projects.nfstc.org/>

Glaubitz, J, C. 2004. CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes* 4: 309-310.

Gonzalez, E., Beerli, P., Zardoya, R., 2008. Genetic structuring and migration patterns of Atlantic bigeye tuna, *Thunnus obesus* (Lowe, 1839). *BMC Evol. Biol.* 8, 252.

Grahl-Nielsen, O. 2014. Fatty acid profiles as natural marks for stock identification. 235–256 pp. En: Cadrin, S. X., Kerr, L.A. y Mariani, S. Editores. 2014. *Stock identification methods: Applications in Fishery science*. Second edition. 566 pp. Elsevier.

Grünwald, N., Kamvar, Z., y Everhart, S. 2015. Population genetics in R. Corvalis, Oregón, USA. En línea: [http://grunwaldlab.github.io/Population\\_Genetics\\_in\\_R](http://grunwaldlab.github.io/Population_Genetics_in_R)

Hamilton, M. B. 2009. Population genetics. Editado por Wiley-Blackwell. Pp. 396.

Hare, J.A. y Richardson, D.E. 2014. The use of early life stages in stock identification studies. 329-364. En: Cadrin, S. X., Kerr, L.A. y Mariani, S. Editores. 2014. Stock identification methods: Applications in Fishery science. Second edition. 566 pp. Elsevier.

Harper, H., Cochrum, K., Grodsky, G., Martin, D., Mayes, P., Rodwell, V., Tyler, D., Wallin, J. 1980. Bioquímica de Harper. 7ma Edición. Editorial el Manual Moderno S.A. México. Pp 793.

Holsinger, K. 2012. Lecture Notes in Population Genetics. University of Connecticut.

Hughes, R., Inouye, B., Johnson, M., Underwood, N., Vellend, M. 2008. Ecological consequences of genetic diversity. Ecology Letters. Volume 11, Issue 6, pages 609-623, June 2008.

INEI - PRODUCE. 2012. Primer Censo Nacional de la Pesca Artesanal del Ámbito Marino 2012 – Información del armador artesanal y sus embarcaciones.

INEI - PRODUCE. 2012. Primer Censo Nacional de la Pesca Artesanal del Ámbito Marino 2012 – Resultados Generales.

ITP (Instituto Tecnológico Pesquero del Perú) e IMARPE (Instituto del Mar del Perú). 1996. Compendio biológico tecnológico de las principales especies hidrobiológicas comerciales del Perú.

Jombart T. 2008. Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics 24: 1403-1405. doi: 10.1093/bioinformatics/btn129 [linkto a free pdf]

Jombart, T., Pontier, D., y Dufour, A-B. 2009. Genetic markers in the playground of multivariate analysis. *Heredity* (2009) 102, 330–341; doi:10.1038/hdy.2008.130.

Jombart, T. 2014. An introduction to ADEGENET 1.4-1. Imperial College London.

Keer, L.A. y Campana S.E. 2014. Chemical composition of fish hard parts as natural marker of fish stocks. 205-234 pp. En: Cadrin, S. X., Kerr, L.A. y Mariani, S. Editores. 2014. Stock identification methods: Applications in Fishery science. Second edition. 566 pp. Elsevier.

Kingsford, M. y Defries, A. 1999. The ecology of and fishery for *Coryphaena* spp. In the water around Australia and New Zealand. *SCI. MAR.*, 63 (3-4): 267-275

Kochzius, M. 2009. Trends in Fishery Genetics. pp 453-493 En: Beamish, R y Rothschild, B. 2009. The Future of Fisheries Science in North America. Fish & Fisheries Series. Volume 31 2009.

Kotoulas, G., Mejuto, J., Antoniou, A., Kasapidis, P., Tserpes, G., Piccinetti, C., Peristeraki, P., García-Cortés, B., Oikonomaki, K., de la Serna, J., y Magoulas, A., 2006. Global genetic structure of swordfish (*Xiphias gladius*) as revealed by microsatellite DNA markers. *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 61: 79-88.

Laird P. W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, MA., Jaenisch, R., Berns, A. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* 1991 Aug 11;19(15):4293.

Lavayen, F. 2014. Estudio de la biología reproductiva de “*Coryphaena hippurus*” durante el periodo comprendido de octubre 2008 a diciembre 2012. (Diapositivas). Primera reunión técnica sobre el dorado, Manta-Ecuador.

Licor. 2005. Saga GT version 3.2. Automated Microsatellite Analysis software – user guide. [http://biosupport.licor.com/docs/2005/SagaGT\\_UG-07545.pdf](http://biosupport.licor.com/docs/2005/SagaGT_UG-07545.pdf)

Licor. 2012. Applications Manual Model 4300 DNA analyzer. [http://biosupport.licor.com/docs/Applications\\_Manual\\_4300\\_DNA\\_Analyzer.pdf](http://biosupport.licor.com/docs/Applications_Manual_4300_DNA_Analyzer.pdf)

MacKenzie, K y Abaunza, P. 2014. Parasites as biological tags. 185-203 pp. En: Cadrin, S. X., Kerr, L.A. y Mariani, S. Editores. 2014. Stock identification methods: Applications in Fishery science. Second edition. 566 pp. Elsevier.

Mariani, S. y Bekkevold, D. The nuclear genome: neutral and adaptive markers in fisheries science. 297- 327. En: Cadrin, S. X., Kerr, L.A. y Mariani, S. Editores. 2014. Stock identification methods: Applications in Fishery science. Second edition. 566 pp. Elsevier.

McDonald, J., 2014. The Handbook of Biological Statistics. En línea: <http://www.biostathandbook.com/fishers.html>

Muths, D., Grewe, P., Jean, C., Bourjea, J., 2009. Genetic population structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) in the southwest Indian Ocean: sex-biased differentiation, congruency between markers and its incidence in a way of stock assessment. Fish. Res. 97, 263-269.

Mero, P. 2014. Fecundidad parcial del Dorado (*Coryphaena hippurus*) capturado en aguas del océano pacífico suroriental durante el periodo de 2011-2012. (Diapositivas). Primera reunión técnica sobre el dorado, Manta-Ecuador.

Morales, H. 2009. Estructura genética del atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) en el Océano Pacífico oriental, obtenida mediante microsatélites. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.

Nei, M. 1973 Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc Natl Acad Sci USA, 70: 3321-3323. Oxenford H.A y Hunte W. 1986. A preliminary investigation of the stock structure of the dolphin, *Coryphaena hippurus*, in the western central Atlantic. Fish. Bull. 84(2): 451-460.

Oxenford, H. 1999. Biology of the dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the western central Atlantic: a review. SCI. MAR., 63 (3-4): 277-301

Palko, B., Beardsley, G., Richards, W. 1982. Synopsis of biological data on dolphin-fishes, *Coryphaena hippurus* and *Coryphaena equiseles* Linnaeus. NOAA Technical Report NMFS Circular 443. 28 p.

Peakall, R y Smouse, P.E. 2012. GeneALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.

Pritchard, J. K., Wen, X., Falush, D., 2010. Documentation for *structure software*: Version 2.3. University of Chicago. Pp. 39.

PRODUCE. 2012. Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola. Ministerio de la Producción. Perú. Pp 180.

PRODUCE. 2015. Base de datos del Primer Censo de la Pesca Artesanal del ámbito Marino – CENPAR. Consultado el 16 de marzo de 2015. Disponible en: <http://www.produce.gob.pe/index.php/estadisticas/censo-pesquero-artesanal>

PRODUCE – DGP (Dirección General de Políticas). Ministerio de la Producción. 2014a. Data: Desembarque de recurso hidrobiológicos marítimos 2000-12, según punto de desembarque.

PRODUCE – DGP (Dirección General de Políticas). Ministerio de la Producción. 2014b. Data: Desembarque de recurso hidrobiológicos marítimos 2000-12, según utilización.

PROMPERU. 2015. Informe Anual: Desarrollo del comercio exterior pesquero 2014. 90pp.

PROMPERU. 2014. Informe Anual: Desarrollo del comercio exterior pesquero 2013. 90pp.

PROMPERU. 2013. Informe Anual: Desarrollo del comercio exterior pesquero 2012. 85pp.

PROMPERU. 2012. Informe Anual: Desarrollo del comercio exterior pesquero 2011. 92pp.

PROMPERU. 2011. Informe Anual: Desarrollo del comercio exterior pesquero 2010. 88pp.

Rice, W. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1), 1989, 223-225.

Rivadeneira, Y. 2014. Determinación de la edad y crecimiento en escamas de Dorados (*Coryphaena hippurus*) capturado en aguas del océano pacífico suroriental durante el periodo de junio 2009 a diciembre 2012. (Diapositivas). Primera reunión técnica sobre el dorado, Manta-Ecuador.

Rocha, M y Gasca, J. 2007. Ecología molecular de la conservación. Pp. 251-278. En: Eguarte, L., Souza, V., y Aguirre, X. 2007. Ecología Molecular (compiladores) Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. 592 pp.

Rocha-Olivares, A., Bobadilla, M., Ortega-García, S., Saavedra-Sotelo, N, Sandoval-Castillo, JR. 2006. Variabilidad mitocondrial del dorado *Coryphaena hippurus* en poblaciones del pacífico. *Ciencias Marinas* (2006), 32(3): 569-578.

Rousset, F. 2008. GenePop 4.3 for Windows/Linux/Mac OSX. Pp. 53.

Secor, D.H. 2014. The unit stock concept: Bounded fish and fisheries. 7-28 pp. En: Cadrin, S. X., Kerr, L.A. y Mariani, S. Editores. 2014. Stock identification methods: Applications in Fishery science. Second edition. 566 p. Elsevier.

SERNAPESCA. 2014. Anuario estadístico de la pesca artesanal 2013 por especie y por region – Servicio Nacional de Pesca de Chile. En línea: <https://goo.gl/jNT9aT>

Smith, L. 2002. A tutorial on Principal Components Analysis,

Solano-Sare, A., Tresierra-Aguilar, A., García-Nolasco, V., Dioses, T., Marin, W., Sánchez, C., Wosnitza-Mendo, C. 2008. Biología y pesquería del Perico. Instituto del Mar del Perú. Callao.

Solano, A., Tresierra, A., García, V., Goicochea, C., Blaskovic, V., Buitrón, B., Chacón, G. (en prensa) Biología y pesquería del perico o dorado *Coryphaena hippurus* en Febrero 2010. Instituto del Mar del Perú. Informe ISSN 0378-7702. Volumen 42, número 1. Callao – Perú.

Sparre, P. y Venema, S. C. 1997. Introducción a la evaluación de recursos pesqueros tropicales. Parte 1. Manual. FAO Documento Técnico de Pesca. №. 306.1 Rev. 2: 420 pp.

Tripp-Valdez, M. A., García de León, F. J., Ortega-García, S., Lluch-Cota, D., López-Martínez, J., & Cruz, P. 2010. Population genetic structure of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the Gulf of California, using microsatellite loci. *Fisheries Research*, 105(3), 172–177.

Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W., Wills, D. y Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* (2004) 4, 535-538.

Vignaud, T., Clua, E., Mourier, J., Maynard, J., Planes S. 2013. Microsatellite Analyses of Blacktip Reef Sharks (*Carcharhinus melanopterus*) in a Fragmented Environment Show Structured Clusters. *Sunnucks P*, ed. PLoS ONE. 2013;8(4):e61067. doi:10.1371/journal.pone.0061067.

Ward, R. D., Woodwark, M. y Skibinski, D. O. F. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*, 44:213-232.

Ward, R. D. 2000. Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* 420: 191-201, 2000.

Weir, B. y Cockerham, C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.

Wright, J. M. y Bentzen, P. 1994. Points of view. Microsatellites: genetic markers for the future. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4, 384-388 (1994)



Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of population. Vol IV. Variability within and among natural populations. University of Chicago.

## X. Anexos

ANEXO 1: Protocolo de extracción de ADN con buffer de extracción de Chris-lysis (método modificado de Laird P. W. *et al*, 1991)

- 1.- Rotular 2 juegos de tubos Eppendorf de 1,5 ml
- 2.- Colocar 0.25 cm<sup>2</sup> de tejido a digerir en 500 ul de buffer Chris-lysis y 7 ul de proteínasa K e incubar con agitación constante (700 RPM) a 56°C durante 30 minutos, agitar en un vortex a mitad del proceso y al finalizar.
- 3.- Centrifugar 5 minutos a 8000 RPM.
- 4.- Trasvasar el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf con 500 ul de isopropanol y mezclar por inversión.
- 5.- Centrifugar 5 minutos a 8000 RPM.
- 6.- Eliminar el sobrenadante y adicionar 500 ul de etanol al 95%.
- 7.- Centrifugar 5 minutos a 8000 RPM.
- 8.- Eliminar el sobrenadante (usar una pipeta para retirar las últimas gotas) y dejar reposar las muestras con las tapas abiertas por 30 minutos a 37°C en un ambiente limpio.
- 9.- Resuspender el ADN en un volumen de entre 50 a 150 ul de buffer TE.
- 10.- Confirmar aislamiento, integridad y calidad de ADN en un gel de agarosa 0.8-1% y cantidad y calidad en un espectrofotómetro midiendo las razones de absorbancia 260/280 y 230/260.

Preparación del buffer de Chris-lysis:

- 1.- Preparar las siguientes soluciones:
  - 25 ml de TRIS – HCl 1M a pH 8.5 – 100 mM.
  - 25 ml de EDTA 0.5 M – 50 mM.
  - 50 ml de SDS 10% – 2%.
  - 10 ml de NaCl 1M – 20 mM.
- 2.- Mezclarlas en un matraz y aforar con agua destilada a 250 ml. Calentar a temperatura de 40-60°C para facilitar la disolución del SDS.
- 3.- Trasvasar a una botella de vidrio y esterilizar en una autoclave.

## ANEXO 2: Protocolo de extracción de ADN usando Fenol-Cloroformo.

- 1.- Rotular 4 juegos de tubos Eppendorf de 1,5 ml
- 2.- Colocar 0.25 cm<sup>2</sup> de tejido a digerir en 243 ul de buffer Chris-lysis y 7 ul de proteínasa K e incubar en baño maría de un día para otro a 56°C.
- 3.- Centrifugar 10 minutos a 8000 RPM.
- 4.- Trasvasar el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf y mezclar con 250 ul de la mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en la proporción 25:24:1.
- 5.- Centrifugar 10 minutos a 8000 RPM.
- 6.- Trasvasar el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml y mezclar con 250 ul de la mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en la proporción 24:1.
- 7.- Centrifugar 10 minutos a 8000 RPM.
- 8.- Trasvasar el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml, agregar 10 ul de acetato de sodio 3M y 220 ul de etanol al 95%. Mezclar por inversión y enfriar a -20°C por 25 minutos.
- 9.- Centrifugar 10 minutos a 8000 RPM.
- 10.- Descartar el sobrenadante y agregar 220 ul de etanol al 70%.
- 11.- Centrifugar 10 minutos a 8000 RPM.
- 12.- Eliminar el sobrenadante (usar una pipeta para retirar las últimas gotas) y dejar reposar las muestras con las tapas abiertas por 30 minutos a 37°C en un ambiente limpio.
- 13.- Resuspender el ADN en un volumen de 50 ul de buffer TE.
- 14.- Confirmar aislamiento, integridad y calidad del ADN en un gel de agarosa 0.8-1% y cantidad y calidad en un espectrofotómetro midiendo las razones de absorbancia 260/280 y 230/260.

ANEXO3: Cantidad y calidad de ADN medido en un biofotómetro Eppendorf

Punto de muestreo	Número de muestra	Cantidad de ADN ng/ $\mu$ L	Calidad A260/A280
Chimbote	A01	136	1.93
	A02	390	1.94
	A03	826	1.97
	A04	254	1.97
	A05	250	1.98
	A06	135	1.96
	A07	329	1.87
	A08	285	2.01
	A09	960	1.86
	A10	157	2.00
	A11	182	1.91
	A12	131	1.96
	A13	254	1.96
	A14	572	1.89
	A15	160	1.95
	A16	253	1.91
	A17	235	1.91
	A18	275	1.90
	A19	220	1.93
	A20	291	1.99
	A21	240	1.97
	A22	289	1.87
	A23	235	2.01
	A24	183	1.93
	A25	271	1.96
	A26	294	1.94
	A27	472	1.96

	A28	182	1.93
	A29	109	1.87
	A30	301	1.96
	A31	232	1.95
	A32	140	2.03
Casma	B01	181	1.95
	B02	521	1.86
	B03	348	1.99
	B04	114	1.99
	B05	236	1.97
	B06	332	1.94
	B07	165	1.99
	B08	206	2.03
	B09	151	1.99
	B10	186	1.96
	B11	355	2.00
	B12	159	2.00
	B13	405	1.94
	B14	859	1.95
Huanchaco	C01	105	1.45
	C02	168	1.96
	C03	375	1.82
	C04	312	1.84
	C05	173	1.94
	C06	346	1.77
	C07	59	1.83
	C08	334	1.92
	C09	210	1.82
	C10	174	1.72
	C11	501	1.88

	C12	152	1.93
	C13	119	1.74
	C14	324	1.71
	C15	376	1.87
	C16	208	1.99
	C17	278	1.79
	C18	282	1.73
	C19	174	1.55
	C20	508	1.83
	C21	846	1.65
	C22	399	1.56
	C23	398	1.75
	C24	840	1.81
Sechura	D01	108	2.04
	D02	279	2.03
	D03	661	1.99
	D04	588	1.92
	D05	556	1.93
	D06	511	1.93
	D07	659	1.96
	D08	611	2.01
	D09	438	1.95
	D10	623	1.91
	D11	232	1.99
	D12	467	1.95
	D13	754	1.97
	D14	385	1.98
	D15	612	1.98
	D16	928	2.08
	D17	872	1.96

	D18	875	1.84
	D19	418	1.95
	D20	860	1.83
	D21	1138	2.01
	D22	449	1.87
	D23	455	1.89
	D24	532	1.95
	D25	1121	1.96
	D26	550	1.95
	D27	707	2.01
	D28	744	2.24
	D29	655	1.97
	D30	321	1.80
	D31	1153	1.90
	D32	1192	2.05
	D33	815	1.98
	D34	977	1.94
	D35	907	1.99
	D36	867	1.94
	D37	754	1.91
	D38	743	1.97
	D39	671	1.94
	D40	948	1.97
Végueta	E01	381	1.92
	E02	338	1.94
	E03	671	1.92
	E04	242	1.71
	E05	329	1.75
	E06	457	1.96
	E07	961	1.99

E08	738	1.94
E09	577	1.94
E10	449	1.52
E11	229	1.94
E12	332	1.74
E13	301	1.92
E14	371	1.97
E15	303	1.96
E16	508	1.95
E17	408	1.94
E18	540	1.92
E19	387	1.95
E20	334	1.93
E21	529	1.76
E22	191	1.72
E23	377	1.95
E24	524	1.94
E25	211	1.71
E26	481	1.96
E27	579	1.97
E28	244	1.72
E29	369	1.92
E30	393	1.93
E31	236	1.59
E32	261	1.65
E33	172	1.92
E34	421	1.90
E35	450	1.78
E36	335	1.91
E37	984	1.92



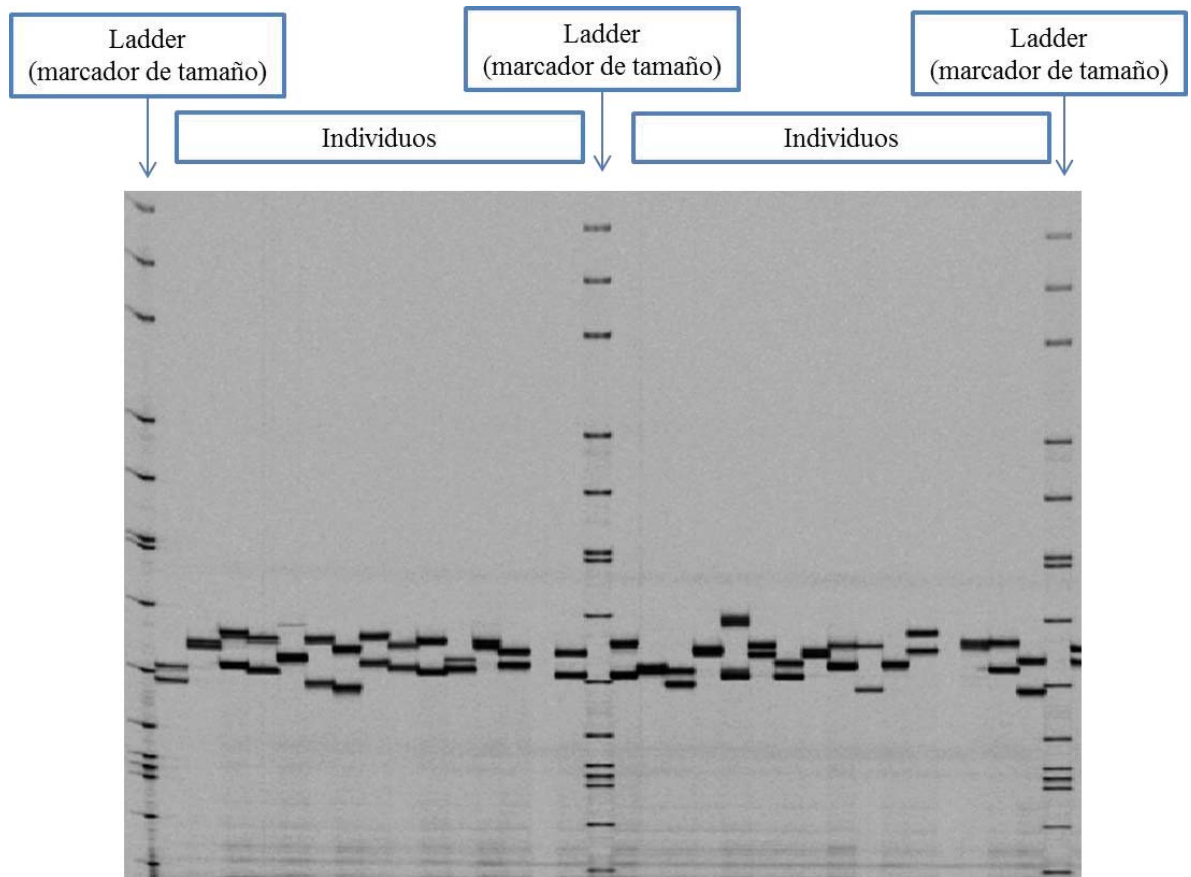
	E38	295	1.85
	E39	381	1.93
	E40	633	1.94
Ica Sur	F01	268	1.93
	F02	779	1.94
	F03	478	1.98
	F04	441	1.97
	F05	447	1.92
	F06	515	1.99
	F07	431	2.02
	F08	562	1.95
	F09	427	1.96
	F10	323	1.95
	F11	623	1.97
	F12	383	1.96
	F13	842	1.91
	F14	373	1.97
	F15	491	1.91
	F16	565	1.94
	F17	433	1.96
	F18	718	1.90
	F19	272	1.93
	F20	363	1.94
	F21	307	1.91
	F22	555	1.96
	F23	376	1.97
	F24	367	1.94
	F25	330	1.96
	F26	409	1.98
	F27	396	1.97

	F28	511	1.93
	F29	494	1.97
	F30	314	1.95
	F31	558	1.99
	F32	436	1.93
	F33	579	1.97
	F34	742	1.96
	F35	398	1.93
	F36	570	1.88
	F37	302	1.94
	F38	337	1.98
	F39	557	1.96
	F40	748	1.98
	F41	347	1.96
	F42	332	1.94
Tacna sur	G01	256	2.06
	G02	186	2.03
	G03	136	2.10
	G04	287	1.96
	G05	182	1.98
	G06	299	1.99
	G07	321.32	1.99
	G08	135	1.99
	G09	439	1.94
	G10	263	1.99
	G11	336	1.96
	G12	201	1.99
	G13	202	1.94
	G14	133	1.97
	G15	263	1.99

G16	487	1.92
G17	229	1.99
G18	224	2.04
G19	288	1.99
G20	130	1.99
G21	198	2.01
G22	142	2.06
G23	241	2.04
G24	151	2.03
G25	311	2.02
G26	84	1.88
G27	85	1.89
G28	121	1.93
G29	192	1.71
G30	183	1.96
G31	272	1.69
G32	238	1.97
G33	183	1.94
G34	267	1.99
G35	277	1.96
G36	257	1.93
G37	189	2.04
G38	101	2.01
G39	334	1.84
G40	318	1.95
G41	110	1.93
G42	358	1.74
G43	249	1.98
G44	1068	1.86
G45	536	1.85

	G46	490	1.83
	G47	197	1.95
	G48	235	1.99
	G49	259	1.82

ANEXO 4: Imagen que muestra las imágenes generadas por el equipo LiCor de los alelos de microsatélite que presentan diferentes individuos para un locus determinado.



ANEXO 5: Resultado del escoreo de alelos en el programa SAGA GT, por individuo en cada locus.

Punto de muestreo	Individuo	Locus									
		CHI008-A		CHI002		CHI023		CHI037		CHI008	
Chimbote	A01	141	147	122	122	123	129	98	98	138	154
	A02	157	157	122	122	129	133	100	100	136	154
	A03	149	163	118	120	113	127	102	96	158	158
	A04	147	161	116	120	119	129	96	96	138	170
	A05	151	153	120	120	123	123	98	98	138	150
	A06	141	161	120	124	123	125	98	98	146	150
	A07	139	157	120	120	113	127	100	90	134	146
	A08	151	163	122	122	123	123	98	98	146	150
	A09	149	159	120	124	123	123	100	90	138	160
	A10	147	163	120	122	125	127	100	96	138	150
	A11	149	149	124	126	123	123	100	100	134	146
	A12	159	161	126	126	121	121	98	98	134	154
	A13	151	157	120	120	117	127	96	96	150	186
	A14	?	?	124	126	123	137	90	98	150	154
	A15	147	157	120	124	115	121	96	96	138	146
	A16	147	163	122	126	127	137	110	98	158	158
	A17	149	151	126	126	115	123	100	100	138	138
	A18	143	149	120	120	115	115	100	100	152	152
	A19	161	161	124	124	115	123	104	104	138	146
	A20	147	173	124	124	115	129	100	100	146	166
	A21	159	163	118	124	123	129	100	100	134	146
	A22	147	155	120	122	115	127	102	102	138	150
	A23	159	159	122	124	121	123	100	100	138	150
	A24	153	163	120	120	127	131	94	98	138	150
	A25	143	163	124	128	123	127	?	?	138	138
	A26	155	155	120	126	123	127	98	98	138	138

	A27	161	169	124	126	?	?	?	?	138	150
	A28	143	143	122	122	115	125	100	100	146	170
	A29	165	165	?	?	117	123	?	?	?	?
	A30	153	165	124	124	115	125	98	98	138	138
	A31	143	157	122	126	127	127	106	98	146	150
	A32	157	163	126	126	113	113	100	100	138	138
Casma	B01	163	163	122	124	125	125	100	100	?	?
	B02	151	155	120	120	123	123	100	100	154	158
	B03	155	163	120	124	121	121	104	94	138	166
	B04	149	161	120	126	123	123	98	98	134	134
	B05	155	159	122	122	115	123	100	98	138	146
	B06	155	161	120	124	115	127	90	98	134	162
	B07	151	155	122	126	123	123	100	104	134	150
	B08	145	161	124	124	125	125	98	98	116	152
	B09	159	161	120	124	125	125	102	98	142	146
	B10	159	159	124	130	115	127	100	100	134	160
	B11	159	159	122	124	121	127	100	100	138	154
	B12	159	159	120	126	127	131	100	100	138	138
	B13	159	175	122	126	125	131	102	94	152	152
	B14	151	159	120	120	127	127	100	96	138	166
Huanchaco	C01	147	161	118	128	117	123	90	96	138	138
	C02	153	159	120	120	123	123	98	98	138	156
	C03	?	?	122	122	127	127	102	98	154	170
	C04	151	161	122	124	123	123	?	?	138	140
	C05	157	161	?	?	123	129	?	?	136	144
	C06	159	161	120	126	123	133	98	102	136	146
	C07	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
	C08	153	157	120	124	117	127	96	100	146	150
	C09	153	175	120	122	?	?	100	96	?	?
	C10	149	151	124	124	?	?	100	102	?	?

	C11	155	157	122	122	123	123	?	?	144	150
	C12	153	153	122	122	127	127	98	98	138	164
	C13	149	151	120	126	123	123	100	98	146	166
	C14	161	161	122	124	123	123	100	98	146	146
	C15	159	175	120	120	127	113	96	98	134	146
	C16	151	159	122	124	125	129	102	96	136	154
	C17	151	151	120	124	123	129	100	100	138	144
	C18	155	161	120	122	115	127	100	96	138	152
	C19	155	161	120	122	115	127	100	96	138	144
	C20	147	151	126	126	?	?	100	100	132	150
	C21	149	153	120	122	121	123	112	96	158	152
	C22	157	159	124	132	127	113	96	96	154	160
	C23	141	153	120	126	113	123	102	104	130	136
	C24	175	175	120	126	113	127	104	96	?	?
Sechura	D01	159	161	124	126	121	123	100	98	?	?
	D02	161	161	126	128	123	123	102	96	?	?
	D03	161	181	126	128	123	123	102	96	152	134
	D04	147	161	122	122	123	123	100	98	138	148
	D05	147	153	122	122	113	119	102	98	154	162
	D06	?	?	120	120	115	131	100	100	152	138
	D07	173	173	120	122	127	131	100	100	150	150
	D08	151	173	124	124	115	127	102	102	150	134
	D09	147	163	118	122	125	115	98	98	160	146
	D10	153	157	?	?	121	133	100	100	138	150
	D11	157	157	124	126	115	127	100	104	134	164
	D12	163	167	124	124	127	123	98	98	134	146
	D13	147	157	124	124	127	127	102	98	146	154
	D14	?	?	122	122	127	117	100	100	134	138
	D15	151	167	120	126	115	127	100	100	130	130
	D16	161	161	120	120	123	125	102	98	144	144



	D17	145	157	124	124	123	125	100	100	136	164
	D18	151	155	122	122	127	127	100	100	132	148
	D19	157	161	124	124	127	127	100	100	134	134
	D20	147	151	120	124	?	?	?	?	144	160
	D21	?	?	?	?	119	129	?	?	?	?
	D22	159	159	120	122	127	117	100	104	166	166
	D23	149	153	120	124	125	125	?	?	100	136
	D24	135	171	122	124	121	121	?	?	136	154
	D25	149	157	122	122	121	121	86	96	152	154
	D26	151	151	120	124	117	121	102	94	166	166
	D27	149	161	120	124	125	125	102	102	154	154
	D28	149	153	122	122	119	119	96	98	138	150
	D29	145	147	120	124	123	129	96	98	134	170
	D30	153	161	120	120	115	123	98	98	?	?
	D31	153	171	122	124	119	119	102	98	134	150
	D32	147	161	122	128	119	119	98	98	138	154
	D33	159	175	118	120	115	125	104	98	158	164
	D34	151	157	120	120	121	129	100	106	134	154
	D35	163	163	118	118	125	127	102	96	134	134
	D36	157	165	118	120	119	119	96	96	134	158
	D37	155	165	118	118	115	127	98	98	138	160
	D38	147	155	120	120	123	123	98	98	146	170
	D39	151	157	122	122	125	129	92	96	138	138
	D40	141	147	120	120	123	133	92	96	138	146
Végueta	E01	149	161	120	120	121	125	?	?	134	134
	E02	149	155	?	?	111	115	102	94	134	154
	E03	149	161	120	120	119	123	94	94	?	?
	E04	151	151	118	118	123	125	94	94	134	138
	E05	139	151	120	122	119	123	102	94	134	138
	E06	159	159	122	122	123	123	102	102	?	?

E07	143	159	120	120	123	123	106	98	?	?
E08	147	149	118	124	123	123	?	?	134	162
E09	159	163	116	116	?	?	102	102	146	146
E10	157	163	120	124	115	123	?	?	138	138
E11	153	153	120	124	115	115	100	100	146	154
E12	149	159	120	120	115	115	98	98	?	?
E13	147	151	120	120	111	115	98	98	154	166
E14	147	153	120	120	127	113	?	?	146	158
E15	165	165	118	118	123	125	98	98	134	138
E16	151	161	120	122	123	123	98	98	146	146
E17	153	157	120	124	123	123	96	96	154	158
E18	151	159	118	120	123	127	88	98	138	138
E19	151	159	122	122	131	115	102	98	134	148
E20	151	151	124	124	123	137	88	98	150	164
E21	159	163	118	124	121	127	100	100	144	158
E22	151	163	116	124	123	123	100	98	140	148
E23	153	153	120	126	?	?	100	100	138	152
E24	137	151	120	126	?	?	92	96	154	158
E25	159	159	?	?	?	?	88	98	142	162
E26	149	161	122	124	?	?	98	98	146	146
E27	137	137	122	122	127	127	102	98	134	134
E28	145	163	120	122	125	125	94	98	148	156
E29	159	163	118	122	125	125	100	104	146	142
E30	163	163	120	120	113	113	102	98	?	?
E31	155	155	120	120	123	123	100	100	?	?
E32	149	155	126	126	123	123	104	96	154	168
E33	?	?	?	?	129	119	?	?	152	138
E34	149	161	122	122	117	125	96	96	144	144
E35	145	145	?	?	115	115	108	96	146	158
E36	157	163	118	122	119	119	98	98	146	146

	E37	151	153	120	120	115	115	104	98	146	158
	E38	149	149	122	122	119	125	98	98	?	?
	E39	151	157	?	?	121	129	100	98	?	?
	E40	161	161	?	?	115	127	102	98	140	162
Ica Sur	F01	?	?	120	120	?	?	98	98	154	160
	F02	147	147	?	?	123	127	100	100	150	150
	F03	147	147	120	124	125	129	100	98	?	?
	F04	141	149	122	126	113	113	100	104	138	158
	F05	153	159	120	120	113	113	98	98	?	?
	F06	149	159	124	126	127	133	100	102	?	?
	F07	?	?	?	?	123	123	?	?	140	152
	F08	143	151	122	122	123	129	100	98	?	?
	F09	159	159	?	?	127	133	100	96	130	130
	F10	145	149	120	122	115	121	100	98	?	?
	F11	155	159	122	128	115	121	98	98	134	146
	F12	143	155	124	132	119	119	98	98	134	146
	F13	145	161	124	128	115	115	102	104	142	154
	F14	?	?	118	124	119	119	100	94	?	?
	F15	155	161	120	120	125	127	104	98	?	?
	F16	?	?	122	124	119	125	100	100	138	148
	F17	143	151	120	122	115	115	100	100	?	?
	F18	159	159	120	122	113	113	100	104	138	150
	F19	155	155	120	120	127	127	102	104	134	146
	F20	145	155	120	120	113	113	100	100	134	134
	F21	153	157	120	120	117	123	100	100	146	138
	F22	149	153	122	126	117	117	98	98	152	154
	F23	141	155	122	122	107	113	98	98	132	132
	F24	157	161	122	132	115	115	104	98	150	154
	F25	151	155	122	126	119	119	100	100	132	132
	F26	151	157	120	120	117	117	104	98	136	114

	F27	153	161	122	124	123	123	104	98	138	152
	F28	151	155	118	120	123	123	106	98	132	152
	F29	159	173	120	122	123	123	100	110	140	144
	F30	141	153	122	130	115	115	100	100	128	136
	F31	145	159	122	122	123	123	102	104	138	148
	F32	143	147	124	124	121	121	100	100	132	158
	F33	153	157	120	122	115	115	102	98	146	146
	F34	159	159	124	124	117	119	98	98	150	150
	F35	155	163	120	120	135	135	98	98	?	?
	F36	151	163	118	118	115	123	96	96	136	168
	F37	155	163	120	120	115	127	106	96	156	162
	F38	139	153	118	122	123	127	100	94	140	160
	F39	143	149	118	118	115	123	94	98	138	146
	F40	153	169	120	120	115	127	104	110	146	154
	F41	141	155	120	120	133	133	94	98	148	154
	F42	153	169	120	120	131	131	94	98	140	156
Tacna sur	G01	151	157	116	116	125	125	90	98	140	150
	G02	159	165	120	120	123	123	100	92	144	148
	G03	141	163	120	120	127	127	100	92	136	58
	G04	151	161	120	124	115	123	102	98	144	148
	G05	141	159	120	120	113	115	102	98	136	136
	G06	155	155	118	120	113	113	102	98	?	?
	G07	159	163	122	122	113	125	104	98	132	164
	G08	163	163	116	116	115	127	100	96	148	156
	G09	141	161	120	120	115	127	98	98	134	134
	G10	151	165	118	118	121	123	94	98	132	144
	G11	155	161	118	118	123	123	94	98	140	156
	G12	159	165	120	120	113	127	100	94	140	156
	G13	149	163	120	122	123	127	100	94	144	166
	G14	143	163	120	120	117	117	100	96	?	?

G15	163	163	120	120	123	127	110	110	136	162
G16	159	175	120	120	123	127	110	96	?	?
G17	163	173	118	122	123	129	100	98	134	158
G18	161	169	116	120	123	131	100	100	148	162
G19	155	157	120	120	121	121	94	98	150	150
G20	149	149	120	120	125	125	100	100	146	150
G21	153	159	120	120	113	121	94	94	140	156
G22	159	159	120	120	115	125	98	98	134	151
G23	161	161	118	118	127	139	98	98	136	138
G24	163	173	120	124	123	123	96	98	134	164
G25	149	159	116	120	115	121	94	96	136	158
G26	155	161	116	120	115	123	100	96	132	136
G27	147	157	116	118	123	127	100	94	134	164
G28	157	161	118	118	123	131	96	96	136	152
G29	159	167	120	120	127	131	96	96	140	154
G30	155	161	118	120	125	129	96	96	146	164
G31	153	159	118	118	123	123	108	108	?	?
G32	159	159	118	118	125	125	86	96	134	158
G33	151	151	120	122	113	123	100	102	154	154
G34	159	167	118	116	117	127	104	98	150	150
G35	157	159	120	120	121	121	102	94	150	156
G36	143	163	118	118	113	127	102	98	140	148
G37	159	169	120	120	113	123	98	98	140	160
G38	155	163	118	118	111	115	96	96	144	158
G39	153	163	120	120	117	127	104	114	120	120
G40	149	161	120	122	127	127	98	98	120	160
G41	?	?	120	120	?	?	100	100	140	154
G42	141	147	118	120	125	125	98	98	124	124
G43	151	157	118	120	131	131	98	98	130	130
G44	137	139	116	124	113	113	98	98	124	124

	G45	155	155	118	120	127	127	96	102	120	130
	G46	153	153	118	118	125	125	98	104	120	130
	G47	151	151	120	120	125	129	98	98	120	120
	G48	135	143	122	122	117	117	100	98	130	130
	G49	153	161	120	120	123	131	98	98	120	120