



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Programa de Magister en Ciencias con Mención en Zoología

**“Determinación de Unidades Poblacionales de Anchoqueta
(*Engraulis ringens*) en Chile”**



Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Mención Zoología

VICTORIA CAROLINA HERRERA YÁÑEZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2019

Profesor Guía: Ricardo Galleguillos González
Dpto. de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

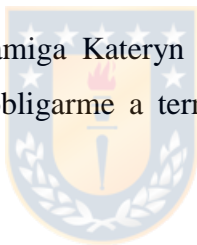
AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi profesor guía el Dr. Ricardo Galleguillos, mi colega y encargada del Laboratorio de Genética y Acuicultura de la Universidad de Concepción ACUIGEN, Mg. Sandra Ferrada Fuentes, y al Dr. Cristian B. Canales Aguirre por su ayuda y apoyo constante en este proceso ya que sin ellos me hubiera sido imposible realizar este trabajo.

A Cecilia Briceño la mejor secretaria de la Universidad de Concepción por todo el apoyo y ánimo brindado para terminar esta tesis.

Agradecer en primer lugar a mi familia, en especial a mi madre y abuela por darme la posibilidad de estudiar y darme su apoyo incondicional en todo aspecto.

A mi compañera de generación y amiga Kateryn Pino y en especial al Dr. (c) Oscar Inostroza-Michael por literalmente obligarme a terminar la tesis, darme todo su apoyo, ayuda y contención.



Al Dr. Enrique Rodríguez del Departamento de Zoología de la Universidad de Concepción por su siempre buena disposición para ayudarme y realizar comentarios a este trabajo.

Finalmente agradecer a la fuente de financiamiento para la realización de esta tesis de postgrado al Proyecto FIPA N° 2015-22: “Determinación de unidades poblacionales de anchoveta (*Engraulis ringens*) en Chile”

TABLA DE CONTENIDOS

Índice Tablas.....	v
Índice Figuras.....	vii
Índice Anexos.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
Pesquerías y la importancia de determinar unidades poblacionales.....	1
Especie en estudio.....	2
Estudios previos en la especie modelo.....	5
Hipótesis.....	8
Objetivos.....	8
METODOLOGÍA.....	9
Sitios de muestreo y recolección de muestras.....	9
Extracción de ADN genómico, visualización y cuantificación.....	9
Estandarización de loci microsatélites.....	11
Prueba de polimorfismo en microsatélites obtenidos.....	11
Análisis preliminares: identificación de errores de genotipación y presencia de alelos nulos.....	12
Bases de datos genéticos para los análisis estadísticos.....	13
Parámetros de diversidad genética para loci microsatélites.....	13
Análisis de poder estadístico para loci microsatélites.....	13
Estructuración poblacional para loci microsatélites.....	14
Detección de estructura genética poblacional sin información previa.....	14
RESULTADOS.....	20
Extracción de ADN, visualización y cuantificación.....	20
Desarrollo de marcadores microsatélites mediante NGS.....	20
Análisis preliminares: identificación de errores de genotipación y presencia de alelos nulos.....	20
Parámetros de diversidad genética para loci microsatélites.....	21
Análisis de poder estadístico para loci microsatélites.....	21
Estructuración poblacional para loci microsatélites.....	21
Detección de estructura genética poblacional sin información previa.....	22
DISCUSIÓN.....	32

CONCLUSIONES.....37
REFERENCIAS.....38
ANEXOS.....48



ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Muestras de <i>Engraulis ringens</i> utilizadas en este estudio.....	17
Tabla 2. Comparación de modelos de frecuencias alélicas correlacionadas y no correlacionadas obtenido en Geneland mediante el Factor de Bayes para <i>Engraulis ringens</i> . Valores en negrita corresponden a los modelos que muestran mayor evidencia de ajuste a los datos en la base de datos: base de datos adultos 2008, base de datos juveniles 2015, y la base de datos combinada 2008- 2015.....	19
Tabla 3. Parámetros de variabilidad genética de <i>Engraulis ringens</i> para muestras del año 2008.....	23
Tabla 4. Parámetros de variabilidad genética utilizando muestras de 2015: Zona I vs Zona III. Estimadores para los 15 loci microsatélites para las Zona I y Zona III de las muestras correspondientes al año 2015.....	24
Tabla 5. Parámetros de variabilidad genética utilizando muestras del año 2008 vs año 2015.....	25
Tabla 6. Estimados del poder estadístico de 15 loci microsatélites. Valores de probabilidad χ^2 y Test de Fisher para detectar niveles de diferenciación poblacional (F_{st}) por promedio de test exacto de Fisher's y Xi^2 , algoritmo implementado en Powsim (Ryman & Palm 2006).....	25
Tabla 7. Índice de estructuración poblacional F_{st} por pares de zonas para muestras del año 2008.....	26
Tabla 8. Índice de estructuración poblacional R_{st} por pares de zonas para muestras del año 2008.....	26

Tabla 9. Índice de estructuración poblacional F_{st} / R_{st} por pares de zonas para muestras del año 2015.....26

Tabla 10. Índice de estructuración poblacional F_{st} / R_{st} por pares muestras del año 2008 vs año 2015.....26



ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Desembarques histórico de <i>E. ringens</i> desde el año 1960 – 2017.....	7
Figura 2. Mapa que indica las zonas que fueron muestreadas y utilizadas en el presente estudio	18
Figura 3. (A) Densidad de frecuencias para cada número de <i>cluster</i> genéticos testeados. (B) Mapa de isolíneas de probabilidades para los dos conglomerado genéticos (1-2) obtenidos mediante el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas en la base de datos de individuos adultos (año 2008).....	27
Figura 4. (A) Densidad de frecuencias para cada número de <i>cluster</i> genéticos testeados. (B) Mapa de isolíneas de probabilidades para los dos conglomerado genéticos (1-2) obtenidos mediante el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas en la base de datos de individuos juveniles (año 2015).....	28
Figura 5. Densidad de frecuencias para cada número de <i>cluster</i> genéticos testeados, obtenidos mediante el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas para la base de datos de genotipos combinada 2008-2015.....	29
Figura 6. Gráficos de coeficientes de ancestría individual obtenidos en el software Structure para: (A) Bases de datos genotipos 2008 para K=6. (B) Base de datos genotipos 2015 para K= 2. (C) Base de datos genotipos combinadas para años 2008-2015 para K= 8. Valor Q: Probabilidad de asignación de cada individuo.	30
Figura 7. Método de Pritchard (Pritchard et al. 2000). Gráfico del comportamiento del logaritmo de probabilidad Ln p(D) para: (A) Bases de datos genotipos 2008. (B) Base de datos genotipos 2015. (C) Base de datos genotipos combinadas para años 2008-2015.....	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Detalles de 15 loci microsátélites polimórficos desarrollados para *E. ringens*.....48



RESUMEN

Un aspecto fundamental para la evaluación y manejo de las poblaciones explotadas por extracción pesquera es la identificación y evaluación de la conectividad entre poblaciones.

La anchoveta (*Engraulis ringens* Jenyns, 1842) es un recurso pesquero pelágico, cuya distribución latitudinal va desde el norte del Perú (~6° S) hasta el sur de la costa chilena aproximadamente hasta los 44°30'. Poseen una distribución geográfica ligada fundamentalmente a la costa, un ciclo de vida corto, con una longevidad máxima de cinco años, tasas de crecimiento rápido y una elevada mortalidad natural. Esta especie sostiene una de las pesquerías más importantes a nivel mundial, caracterizada por enormes variaciones temporales en sus desembarques.

En el presente estudio, usando 15 loci microsatélites, se evaluó la hipótesis nula de que *E. ringens* no presenta estructuración genética espacial ni temporal a lo largo de su distribución geográfica Chilena. De acuerdo a los resultados obtenidos por los análisis realizados, no es posible rechazar la hipótesis propuesta, ya que no hay evidencia de quiebres o discontinuidades genéticas significativas a través del rango de estudio de la especie a una escala espacial y temporal, por lo tanto *E. ringens* podría estar actuando como una única unidad panmíctica.

Palabras clave: *E. ringens*, microsatélites, estructuración poblacional

ABSTRACT

A critical aspect for the adequate assessment and management of natural populations exploited by fishing activity is the populations' identification and its connectivity. The Peruvian anchovy (*Engraulis ringens* Jenyns, 1842) is a pelagic stock widely distributed, from northern Peru (~6° S) to southern Chile (ca. 44°30'), mainly distributed in coastal areas, have it a short life cycle, with maximum longevity of five years, fast growth rates and high rates of mortality. This species sustains one the world most important fisheries, characterized by enormous temporal variation in landings.

In this study, we development 15 microsatellite loci to test the hypothesis that state that *E. ringens* is neither genetically, spatial or temporal structured in its Chilean distributional range. Our results show no evidence of significant genetic discontinuities neither on spatial nor temporal scales. This result suggests that *E. ringens* would behave as a single panmictic unit.



Keywords: *E. ringens*, microsatellite loci, Population structure

INTRODUCCIÓN

Pesquerías y la importancia de determinar unidades poblacionales

Un aspecto fundamental para la evaluación y manejo de las poblaciones explotadas es la identificación y evaluación de la conectividad entre unidades afectadas por extracción pesquera. La estimación del grado de conectividad a través del rango de distribución de especies comercialmente importantes o que se encuentran amenazadas, ha tenido gran interés tanto para la industria pesquera, los científicos y las entidades gubernamentales que regulan y fiscalizan los recursos, pues para un manejo efectivo de estos recursos es requisito el conocimiento de los patrones de estructuración espacial, así como la identificación de poblaciones (Begg & Waldman 1999; Fazares 2007; Machado 2009). Además de conocer el patrón espacial, un aspecto clave en el proceso de identificación de unidades poblacionales, es verificar la estabilidad temporal para efectuar procesos de monitoreo con propósitos de manejo pesquero.

Históricamente, se han utilizado diversas fuentes de evidencia para identificar y caracterizar poblaciones entre los que se encuentran: i) las características de su ciclo de vida (e.g. Begg 2005), análisis de morfología tradicional y geométrica del cuerpo (e.g. Turan 2004), microquímica de otolitos (e.g. Ashford 2006), marcas parasitarias (e.g. Oliva 1999), y mediante aproximaciones genéticas (e.g. Canales-Aguirre et al. 2010). Esta última se diferencia de las demás técnicas debido a que los marcadores genéticos tienen una componente heredable y es la única que no se ve afectada por cambios que puedan existir en el medio ambiente (Karanja et al. 2009).

En general podemos utilizar marcadores de origen mitocondrial y nuclear, y el uso de uno u otro, u ambos va a depender de la problemática biológica que se plantee. Generalmente genes de origen mitocondrial han sido utilizados principalmente en responder preguntas en un contexto de filogeografía (Wang 2010) y por otro lado marcadores nucleares altamente repetitivos como los microsátélites han sido utilizados para responder preguntas en un

contexto histórico reciente, recapitulando información estimada de 10-100 generaciones (Selkoe & Toonen 2006).

Dentro de los marcadores genéticos los microsatélites son muy utilizados en la evaluación de unidades poblacionales y determinación de variabilidad genética (Jarne & Lagoda 1996). Los marcadores moleculares tipo microsatélites (SSRs: *Simple Sequence Repeats*; STRs: *Short Tandem Repeats*) corresponden a regiones no codificantes, de origen y función aún desconocida, a pesar de que la hipótesis más aceptada apunta a que pueden estar relacionados con el empaquetamiento y la condensación del ADN en los cromosomas (Vanhala et al., 1998). Aunque con baja frecuencia en las regiones codificantes y, quizás también en los telómeros, su presencia en estas regiones se ha descrito asociada a enfermedades (Armour et al. 1994; Tautz & Schlotterer 1994).

Estas regiones están compuestas por motivos básicos de repetición de 1-6 nucleótidos de largo, organizados en bloques con 5-50 repeticiones en serie (Hancock 1999). Se encuentran ampliamente distribuidas en el genoma de organismos eucariontes y procariontes, donde es posible observar una región microsatélite cada 10 kilobases (Zane et al. 2002). Estos marcadores moleculares responderían a un modelo de herencia mendeliana codominante (De Woody & Avise 2000), con un elevado polimorfismo, lo que explica su frecuente utilización en estudios poblacionales (Selkoe & Toonen 2006).

Especie en estudio

La anchoveta (*Engraulis ringens* Jenyns, 1842) es un recurso pesquero pelágico, cuya distribución latitudinal se limita al Océano Pacífico SE y depende fuertemente de la dinámica de la Corriente de Humboldt, comprendiendo desde el norte del Perú (~6° S) hasta el sur de la costa chilena (Whitehead et al. 1988). No existe claridad acerca del límite sur de distribución de esta especie, aunque es claro que incluye la zona de fiordos en la Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo, existiendo reportes de huevos y larvas hasta los 45°45' (Bustos et al. 2008) y de adultos hasta los 44°30' (Niklitschek et al. 2009).

Esta especie posee una distribución geográfica ligada fundamentalmente a la costa, un ciclo de vida corto, con una longevidad máxima de cinco años, tasas de crecimiento rápido y una elevada mortalidad natural (Aliaga et al. 2001). Es una especie que conforma cardúmenes altamente densos y fuertemente influenciadas por factores, ya sea bióticos, como la oferta (calidad y cantidad) de alimento, abióticos (variabilidad estacional, interanual (eventos ENOS) y decadal), que pueden afectar las distintas etapas de su ciclo vital (Cubillos et al. 2002, 2001, 1998; Cubillos & Arcos 2002; Cubillos & Arancibia 1993; Yáñez et al. 1992). Existe una variada y abundante literatura bien fundamentada que apoya la tesis que las fluctuaciones en el ambiente físico tienen un notable impacto en la pesquería de la anchoveta en diferentes escalas de tiempo y espacio (Yáñez et al. 1992; Espino 1999; Lombarte 1990; Cubillos & Arcos 2002; Cubillos et al. 1998). Dentro de estas fluctuaciones El Niño y La Niña aparecen como los más relevantes a la hora de explicar los cambios en abundancia, vulnerabilidad y distribución de esta especie (Avaria et al. 2004).

Desempeña un papel ecológico clave en el Sistema de Corriente de Humboldt porque es la principal presa de depredadores como aves, mamíferos marinos (lobos, focas, ballenas) y peces silvestres de mayor tamaño que proporcionan otras oportunidades de pesca y/o alimento directo para el consumo humano (jurel, sierra, merluzas, congrios, cojinobas, corvinas, etc.) (Cury & Shannon 2004; Espinoza & Bertrand 2008; Pauly et al. 2009; Pikitch et al. 2012; Utne-Palm et al. 2010). A nivel mundial, se ha indicado que una reducción en la disponibilidad de estas especies (producto de condiciones ambientales, actividad pesquera o una combinación de ambas), puede tener impactos directos y de largo plazo que fundamentalmente pueden cambiar la estructura y funcionamiento de un ecosistema (Pauly et al. 2009; Pikitch et al. 2012; Utne-Palm et al. 2010).

Engraulis ringens es un desovante parcial (Alheit et al. 1984), cuya actividad de desove se distribuye entre los meses de julio y diciembre (Cubillos et al. 1999), alcanzando un máximo entre Agosto y Septiembre, tanto en el extremo norte (Alheit et al. 1984) como en el extremo sur (Cubillos et al. 1999) de su área principal de distribución. Este último periodo coincide con la predominancia de vientos del norte, los que favorecerían la advección de huevos, larvas y juveniles tempranos hacia las zonas costeras hacia el sur

(Castro et al. 2000, Cubillos et al. 2007). Los eventos reproductivos se concentran en aguas superficiales de hasta 50 metros de profundidad en el día y suben en la noche, entre 2 y 80 km de la costa (Aliga et al. 2001). Al cabo de 2 a tres días, eclosiona una larva 2,5 a 2,7 mm de longitud (Hernández et al. 2000). Su alimentación basada en estudios del análisis del contenido estomacal de juveniles y adultos típicamente informan que el contenido del estómago está dominado (en términos numéricos) por el fitoplancton siendo clásicamente consideradas como fitoplanctívoras (Espinoza & Bertrand 2008; Medina et al. 2015; Ryther 1969), aunque recientemente Pizarro et al. (2019) muestra resultados basados en valores de isótopos estables, en donde indica que la contribución del fitoplancton a los tejidos somáticos de *E. ringens* es mínima y que el zooplancton representa la principal fuente de alimento asimilada.

La anchoveta sostiene una de las pesquerías más importantes a nivel mundial y también en Chile, caracterizada por enormes variaciones temporales en sus desembarques en escalas de años y décadas (Figura 1), correlacionadas con fluctuaciones ambientales (Pauly 1987; Chavez et al. 2003). En el manejo de la especie en Chile se proponen tres UP (unidades de pesquería): UP XIV-II, correspondiente a las regiones de Arica y Parinacota, Tarapacá y Antofagasta (18°-25° S), UP III-IV, comprendida por las Regiones de Atacama y Coquimbo (25°-32° S) y UP V-X, que incluye desde la Región de Valparaíso hasta la Región de Los Lagos (32°-42° S). En lo referente al estado del recurso pesquero, la UP XV-II se encuentra declarada en régimen de sobreexplotación, la UP III-IV se declara en plena explotación, mientras que la unidad V-X se encuentra declarada como agotada, desde el año 2013 (Subpesca 2019). La administración del recurso en Chile contempla vedas de reclutamiento, orientadas a mitigar la sobrepesca por crecimiento, y vedas reproductivas, orientadas a favorecer el éxito reproductivo y a reducir el esfuerzo y la mortalidad por pesca anual. Solo como ejemplo para la UP V-X para el año 2019 hay estimaciones de biomasa total de 605.670 toneladas y de abundancia de 40.577 millones de ejemplares (Subpesca 2019). Sin embargo, no se ha establecido si estas unidades de pesquería se correlacionan con propiedades intrínsecas de la especie, como podrían ser límites poblacionales naturales.

Estudios previos en la especie modelo

Dentro de los antecedentes poblacionales para *E. ringens*, diferentes aproximaciones han generado resultados contrastantes. Aguayo (1976), basado en diferencias en las variables de edad y crecimiento sugiere la presencia de tres stocks ecológicos: norte de Perú, costa sur de Perú y norte de Chile. Jordan (1980), basándose en la presencia de huevos en el plancton y caracteres merísticos, morfológicos, marcaje - recaptura y aspectos fisiológicos encuentra también tres subunidades poblacionales, las cuales se distribuyen desde Zorritos hasta Atico, Perú (4°30' a 16°00'LS), desde Atico hasta Antofagasta, Chile (24°00'LS) y desde Antofagasta a Talcahuano, Chile (36°00'LS). Por otro lado, análisis de caracteres morfométricos y merísticos evidenciando variaciones latitudinales en el crecimiento diferencial (Barrueto 1993; Hernández 1994), análisis parasitológicos indicando alta diferencia cualitativa y cuantitativa en la parasitofauna (Galleguillos et al. 1996; Valdivia et al. 2007) y hábitos migratorios a través de estudios de marcaje y recaptura (Serra & Gil 1975) sustentan la hipótesis de dos stocks ecológicos para la costa chilena.

Sin embargo, los estudios genéticos realizados a esta especie han generado resultados diferentes a los obtenidos a partir de la evidencia fenotípica. Galleguillos et al. (1996) mediante el análisis de proteínas polimórficas de los sistemas AAT-1, AAT-2, EST-1 y IDH-1 concluye que no existirían diferencias significativas entre ejemplares provenientes desde Talcahuano, Iquique y Caldera ($F_{st} = 0,005$ y $0,015$, $p > 0,05$). Ferrada et al. (2002) confirma estos resultados por medio del análisis del gen nuclear calmodulina y el espaciador transcrito interno del ADN ribosomal. Posteriores análisis de cuatro loci microsatélites y la región control del ADN mitocondrial evidencian que se trata de una unidad panmíctica desde el norte del Perú hasta Chiloé (Ferrada et al. 2009). Un estudio realizado en especímenes de Perú, basados en microsatélites heterólogos (Rojas 2010), estableció que existe solo una unidad poblacional para áreas comprendidas entre las localidades de Salaverry y Pisco.

A pesar de la gran importancia y utilidad de los microsatélites como marcadores moleculares para estudios de estructuración genética poblacional (Jarne & Lagoda 1996) el

uso de dichos marcadores moleculares en teleósteos es escaso en comparación con otras categorías taxonómicas, no existiendo reporte de aislamiento y caracterización de loci microsátélites específicos para *E. ringens*. Por esta razón, se desarrolló y aplicó microsátélites especie específicos para *E. ringens*. Esto a pesar de la disponibilidad de microsátélites heterólogos, pues se considera que la utilización de estos, podría afectar las estimaciones de diversidad y divergencia genética, evidenciándose un mayor número de loci polimórficos, mayor riqueza alélica, e incrementando los estimados de la heterocigosidad observada (Meneses et al. 2010). Además, cabe mencionar que en ninguno de los estudios genéticos citados anteriormente se ha realizado una comparación temporal para corroborar si este patrón es estable a lo largo del tiempo, o si podría verse afectado por las fluctuaciones del ambiente.

Teniendo en cuenta la escasa evidencia de diferenciación genética encontrada para esta especie, en la costa chilena (Galleguillos et al. 1996; Ferrada et al. 2002) y peruana (Rojas 2010), nuestro análisis molecular se concentrará en la comparación de las dos zonas de estudio más extremas, que es donde se esperaría encontrar mayores diferencias moleculares entre grupos. Además de adicionar muestras del año 2008 correspondientes a 6 localidades (5 en Chile y 1 para Perú) con el fin de realizar una comparación temporal. De esta manera, buscaremos desafiar la hipótesis vigente de panmixia (una única población), utilizando marcadores moleculares de tipo microsátélites, desarrollados específicamente para *E. ringens*.

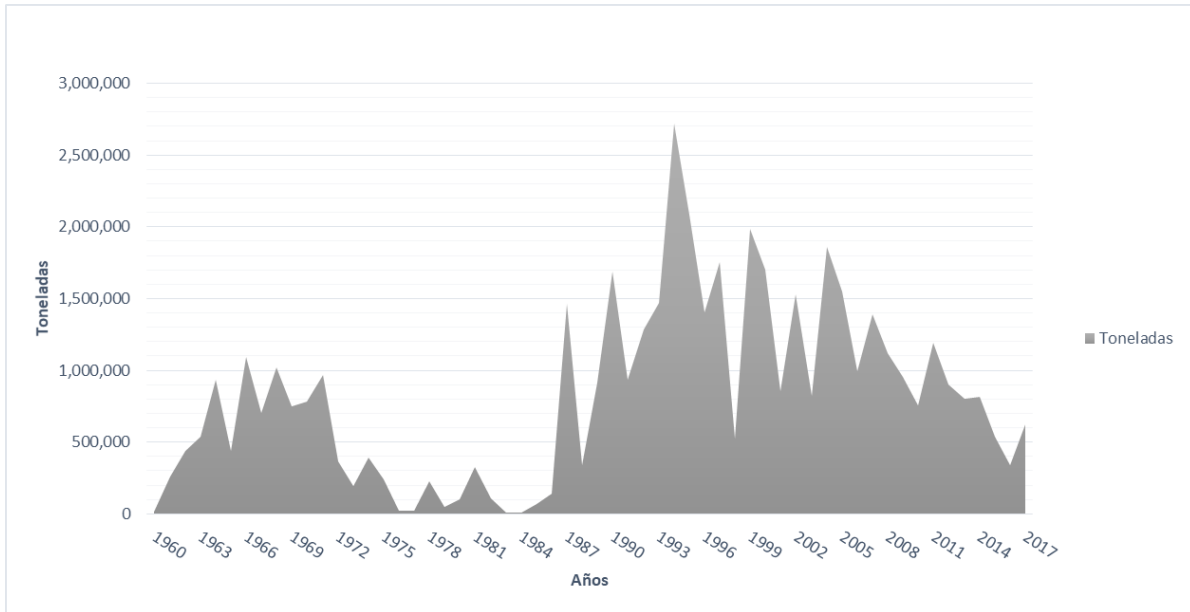


Figura 1. Desembarques histórico de *E. ringens* desde el año 1960 – 2017 en Chile. Fuente: elaboración propia.



HIPOTESIS

Engraulis ringens se comporta como una unidad panmíctica a lo largo de su rango de distribución en Chile.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la estructura genética de la anchoveta *E. ringens* en Chile a través del análisis genético de loci microsatélites a escala espacial y temporal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1: Estandarizar la técnica de amplificación por PCR para los loci microsatélites especie específicos desarrollados para la anchoveta.

Objetivo 2: Estimar la diversidad genética espacial y temporal utilizando las muestras de *E. ringens* correspondientes a los años 2008 y 2015.

Objetivo 3: Evaluar estructura genética espacial y temporal utilizando las muestras de *E. ringens* correspondientes a los años 2008 y 2015.

METODOLOGÍA

Sitios de muestreo y recolección de muestras

Durante el año 2008 se recolectaron seis localidades, 5 en Chile y 1 para Perú. Los sitios de muestreo de Norte a Sur fueron: Callao – Perú (Zona A), Región de Tarapacá (Zona E), Región de Valparaíso (Zona F), Región del Biobío (Zona B), Región de los Ríos (Zona D) y Región de los Lagos (Zona C). A cada una de estas zonas se asignó un solo punto de coordenadas correspondiente al lance desde donde fueron obtenidos los ejemplares (ver Figura 2 y Tabla 1).

Los ejemplares recolectados durante el año 2015 corresponden a las UP: XIV-II (Zona I) regiones de Arica y Parinacota, Tarapacá y Antofagasta (18°-25° S), y la UP V-X (Zona III), que incluye desde la Región de Valparaíso hasta la Región de Los Lagos (32°-42° S). Para este muestreo se cuenta con 18 lances distribuidos entre las dos zonas, cada lance presenta una coordenada (ver Figura 2 y Tabla 1).

Se realizó una comparación espacial de manera independiente de las muestras recolectadas durante los años 2008 (comparación de las seis zonas muestreadas) y 2015 (comparación de dos zonas muestreadas). Y para evaluar la estabilidad temporal de las eventuales diferencias genéticas, se compararon en conjunto las muestras obtenidas en los años 2008 y 2015 (ver Figura 2 y Tabla 1).

Extracción de ADN genómico, visualización y cuantificación

A los individuos recolectados en 2015 se les extrajo un trozo de musculatura esquelética proveniente principalmente desde la zona del pedúnculo caudal, depositándose en etanol absoluto dentro de tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. y almacenados hasta realizar su extracción de ADN. Los individuos colectados en el año 2008 se encontraban almacenados en el Laboratorio de Genética y Acuicultura de la Universidad de Concepción.

El ADN genómico total se obtuvo mediante el kit comercial de purificación de ADN “Nucleo Spin®” (Macherey-Nagel) siguiendo los pasos descritos por el distribuidor e incorporando algunas modificaciones. Específicamente se siguieron los siguientes pasos:

Se depositaron 25 mg. de tejido en cada tubo de micro centrifuga 1,5 ml, se agregaron 180 µl de Buffer T1 y 25 µl de Proteinasa K, se agitaron por inversión y se incubaron a 56°C por toda la noche. A la mañana siguiente se agitaron las muestras antes de añadir 200 µl de buffer B3 e incubar a 70° C por 10 minutos. Se centrifugo por 5 minutos a 11.000 rpm.

Luego se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5ml y se añadió 210 µl de etanol (96-100%) a la muestra, se agito vigorosamente.

Para cada muestra se colocó una columna NucleoSpin Tissue en un tubo de recogida, y se aplicó la muestra en la columna. Se centrifugo durante 2 minutos a 11.000 rpm. Se descartó el flujo a través de la columna y se colocó un nuevo tubo de colección.

Posteriormente se realizó el primer lavado añadiendo 500 µl de Buffer BW y se centrifugo por 2 minutos a 11.000 rpm. Se desechó el flujo y se colocó un nuevo tubo de colección.

Para el segundo lavado se añadió 600 µl de Buffer B5 a la columna y se centrifugo por 2 minutos a 11.000 rpm. Se desechó el flujo a través de la columna y se colocó un nuevo tubo de colección. Para secar la membrana de sílice y remover el etanol residual, se centrifugo la columna por 1 minuto a 11.000 rpm.

Por ultimo para eluir el ADN se colocó la columna NucleoSpin Tissue en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. y se añadió 100 µl de Buffer BE precalentado (70° C), se incubo a temperatura ambiente por 1 minuto y finalmente se centrifugo por 1 minuto a 11.000 rpm.

El ADN genómico total fue visualizado mediante una matriz de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio para determinar el éxito de la extracción, esto es, determinar si presenta ADN de alto peso molecular (> 10.000 pb) o fragmentado. Se estimó la calidad y cantidad de ADN extraído utilizando un Biofotómetro, el cual registra absorbancias a 230 nm (hidratos de carbono, péptidos, fenoles y combinaciones aromáticas), 260 nm (ADN), 280 nm (proteínas y fenol) y 320 nm (turbidez) de cada muestra. Además, nos entrega la razón de absorbancias A260/280 y A260/230, para determinar la calidad de nuestro ADN. Posterior a conocer la calidad y cantidad del ADN de cada una de las muestras se procedió

a generar una dilución de trabajo a una concentración final de 100 ng/μL. La utilización de una concentración menor a la extraída se fundamenta en que para los posteriores análisis (amplificación por PCR) el exceso de ADN puede inhibir la reacción y por lo tanto no amplificar los loci de interés.

Estandarización de loci microsatélites

Para la estandarización de marcadores microsatélites útiles para la identificación y caracterización de poblaciones en *E. ringens*, se comenzó por estandarizar al menos 15 loci microsatélites a partir de 80 parejas de partidores que fueron sintetizados por la empresa OMIC solutions (<http://omics-solutions.cl>) del centro nacional de genómica y bioinformática de Chile.

Las condiciones de amplificación fueron igual para todos los loci microsatélites y fue la siguiente: Tampon PCR 1X, MgCl₂ 3mM, primer F (0,4 μM), primer R (0,4μM), dNTPs (0,8 mM), Taq polimerasa (0,1 U/μL). El programa utilizado en el termociclador correspondió a un protocolo touchdown, el cual aumenta la especificidad del *annealing* (hibridación de los partidores en la región flanqueante del locus objetivo) incorporando en los primeros ciclos temperaturas altas, comenzando a disminuir 0,5°C por cada ciclo transcurrido hasta alcanzar una temperatura de *annealing* final de 55°C. Específicamente el programa de termociclado fue: denaturación inicial a 95°C por 300s, seguido de 20 ciclos con los siguientes pasos: denaturación a 95°C por 30s, *annealing* a 65-55°C (*touchdown*) por 30s, extensión a 72°C por 30s. Posteriormente, siguieron 20 ciclos con los siguientes pasos: denaturación a 95°C por 30s, *annealing* a 55°C por 30s, y extensión a 72°C por 30s. Finalmente un ciclo de extensión a 72°C por 300s.

Prueba de polimorfismo en microsatélites obtenidos

Utilizando las condiciones antes mencionadas se probó el polimorfismo de las 80 parejas de partidores diseñados. El éxito de cada amplificación fue verificado mediante electroforesis en un gel de agarosa UltraPure™ Agarose 1000 (Invitrogen™) al 4 % y visualizado

mediante tinción con bromuro de etidio. Para determinar el tamaño del amplicón se utilizó marcadores de peso molecular de 50 y 100 pares de bases (pb).

Para las parejas de partidores que mostraron una amplificación exitosa (32 parejas), su partidador *forward* fue marcado con los fluoróforos NED, PET, 6-FAM y VIC de AppliedBiosystems. Posteriormente estas 32 parejas fueron amplificadas en un total de 48 individuos muestreados en la Zona I en el año 2015. Las muestras que mostraron una amplificación exitosa se enviaron en tubos eppendorf de 0,2 ml bien selladas y correctamente identificadas en un volumen mínimo de 5 μ l a la Universidad de Guelph, Canadá en donde se realizó un análisis de fragmentos en un secuenciador ABI 3730xl (AppliedBiosystems) con un estándar de peso molecular LIZ500. El análisis de fragmentos consiste en una electroforesis capilar de las muestras de ADN y se realiza en capilares de cristal de silicio rellenos de un polímero especial. Las muestras, inyectadas en el capilar, migran hacia la célula de detección donde un láser de argón excita los fluoróforos a diferentes longitudes de onda (λ) permitiendo el análisis de múltiples fragmentos al mismo tiempo, que se mueven por la aplicación del campo eléctrico hacia el polo positivo y se separan de acuerdo con la longitud del mismo, de tal forma que los de menor peso molecular viajan más rápido a través del capilar, mientras que los de mayor peso lo hacen más lentamente.

Para la determinación de los genotipos obtenidos se utilizó el programa Peak Scanner v1.0 (AppliedBiosystems). Individuos que presentaron más del 50 % de genotipos *missing* fueron excluidos de los posteriores análisis.

Análisis preliminares: identificación de errores de genotipación y presencia de alelos nulos

Con la finalidad de evitar un sesgo en el análisis poblacional, debido a la asignación incorrecta de genotipos producto de ADN degradado, bajas concentraciones de ADN o mutaciones en la región que flanquea el microsatélite objetivo (alelos nulos), se comprobó la calidad de la base de datos. Para esto se identificó errores de genotipado debido a presencia de alelos nulos (alelos no amplificados) con el algoritmo de Brookfield (Brookfield 1996), dominancia de alelos cortos, anotaciones de bandas tartamudas

(repetidas) y errores tipográficos, mediante el programa Micro-Checker v2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004).

Bases de datos genéticos para los análisis estadísticos

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados, la totalidad de datos genotípicos fueron organizados en tres bases de datos multilocus. En la primera base de datos se organizaron y compararon muestras de adultos correspondientes a 2008: Zonas A, B, C, D, E y F. En la segunda base de datos se organizaron las muestras de juveniles correspondientes a 2015: Zona I y Zona III. En la tercera base de datos se agruparon las muestras para hacer una comparación temporal entre el año 2008 y año 2015.

Parámetros de diversidad genética para loci microsatélites

Para los microsatélites utilizados se estimó las frecuencias alélicas de cada uno de los quince loci analizados, así como, el número de alelos (N_a). Además se estimó la heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e) que fueron obtenidos en el programa Genalex v6.5 (Peakall & Smouse 2012). Se realizó un test de equilibrio de Hardy & Weinberg (H&W) en el programa Arlequin v3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Estos parámetros de diversidad genética fueron realizados para cada una de las bases de datos bajo estudio.

Análisis de poder estadístico para loci microsatélites

El programa Powsim v4.0 (Ryman & Jorde 2001; Ryman & Palm 2006) fue utilizado para evaluar el poder estadístico o error tipo II en los análisis realizados (aceptar H_0 cuando esta es falsa, siendo esta H_0 homogeneidad genética) (Laikre et al. 2005; Ryman et al. 2006; Larsson et al. 2007; Canales-Aguirre et al. 2010), y el error tipo I (α) de 0,05. El poder estadístico fue estimado para los 15 loci microsatélites en conjunto, y así detectar diferenciación genética para varios niveles de F_{st} simulados. En las simulaciones se utilizó un tamaño efectivo poblacional de $N_e=70.000$, y diferentes valores de deriva generacional

($t=0$, $t=10$, $t=15$, $t=20$, $t=40$) para obtener los valores F_{st} hipotéticos, donde sólo la simulación $t=0$ supone ausencia de deriva génica. Cada simulación fue corrida 10.000 veces y el poder estadístico fue determinado como la proporción de simulaciones que tanto el test exacto de Fisher como el test chi-cuadrado detectaban como significativas con un nivel de $p < 0,05$. Una vez evaluado y confirmado el poder estadístico del set de microsatélites, se procedió a estimar los niveles de divergencia genética existentes entre variados niveles de agrupación de las muestras.

Estructuración poblacional para loci microsatélites

Para estimar el grado de divergencia genética entre las agrupaciones bajo estudio se utilizó el índice F_{st} de (Weir & Cockerham 1984), y su análogo R_{st} (Slatkin 1995) por pares de zonas, para las bases de datos. El índice F_{st} estima el grado de estructuración genética que se presenta en la distribución geográfica de la especie en estudio. Valores F_{st} cercanos a 1 sugieren una fuerte estructuración genética y aislamiento reproductivo, mientras que índices F_{st} cercanos a 0 indicarían una débil estructuración genética y alto flujo génico, siempre y cuando este índice sea estadísticamente significativo, $p \leq 0,01$.

Detección de estructura genética poblacional sin información previa

Para identificar la presencia de estructuración poblacional en *Engraulis ringens* se utilizó una aproximación Bayesiana en el programa Geneland v. 4.0.2 (Guillot et al. 2005a; Guillot et al. 2005b; Guillot 2008) implementado como paquete en R (<http://cran.r-project.org/>).

Este programa utiliza la información genética y la localización geográfica (coordenadas geográficas) de los individuos muestreados (en este caso coordenadas de los lances), y permite estimar el número más probable de poblaciones (i.e. conglomerado genéticos), sus límites geográficos, y la incertidumbre de la asignación de individuos a las poblaciones identificadas (Guillot et al. 2005a). Un conglomerado genético correspondería a un grupo de individuos que comparten variantes genéticas (genotipos más similares) entre sí (Mank & Avise 2004). Para identificar el número más probable de poblaciones (K), se testeó un

rango de K entre 1 a 8 ($K=1-8$), donde $K=1$ significa que los datos genéticos dan cuenta de una sola población (no hay estructuración) y $K=n$ que los datos dan cuenta de “ n ” poblaciones en el set de datos analizados. Los datos genéticos utilizados correspondieron al genotipo multilocus de cada individuo. Dado que Geneland es un análisis Bayesiano, la inclusión de valores previos son importantes para obtención de resultados precisos, por lo tanto, se testeó diferentes modelos de frecuencias alélicas (i.e. modelo correlacionado y modelo no correlacionado).

Se corrió un millón de generaciones muestreando cada 1.000 iteraciones. Luego, se comparó el ajuste de ambos modelos por medio de la prueba Factor de Bayes (FB; Drummond & Rambaut 2007, Gelman et al. 2014) usando el método implementado en el programa Tracerv1.5 (Rambaut et al. 2014). El FB está definido por las Verosimilitudes Marginales de los modelos ($\ln(D/M)$) contrastados. En donde B_{10} define el logaritmo base 10 de FB que nos permite evaluar qué modelo (M) da cuenta de una mayor proporción de la probabilidad total de los datos. Para interpretar los valores de B_{10} se usó la clasificación de Raftery (1996), según la cual valores entre 3 y 20 muestran evidencia positiva para el modelo 1, y mayores de 20 una fuerte evidencia. Posteriormente, se volvió a ejecutar el análisis usando el modelo seleccionado y el número de K con el valor de convergencia de este modelo. El modelo identificado que presentó mayor evidencia de ajuste a los datos fue el modelo de frecuencias alélicas correlacionado para las tres bases de datos (Tabla 2). La corrida final del programa se realizó por 10 millones de generaciones muestreando cada 200 generaciones, para estimar con posterioridad la probabilidad de asignación de individuos a grupos geográficos basados en su geo-referenciación y el genotipo de los individuos. Este análisis fue llevado a cabo sobre la base de datos de genotipos combinada (genotipos 2008 + 2015), base de datos adultos 2008, y base de datos juveniles 2015.

De manera complementaria a Geneland se estimó la estructura genética poblacional mediante inferencia bayesiana utilizando Structure (Pritchard et al. 2000). Este programa es utilizado para inferir estructura poblacional usando datos genotípicos sin información previa respecto al origen de las muestras, el algoritmo utilizado identifica agrupaciones genéticas asignando individuos al grupo de poblaciones más probable. El programa asume un modelo en el cual hay K poblaciones (K es desconocido) caracterizadas por un set de

datos de frecuencias alélicas en cada locus. Los individuos son asignados (probabilísticamente) a poblaciones (K) o conjuntamente a dos o más poblaciones si sus genotipos indican que están mezclados. En este análisis en particular finalmente se realizaron 10 corridas para cada valor de K entre 1 y 8. Cada corrida fue configurada bajo un modelo de mezcla y se utilizó un periodo de burning de 50.000 iteraciones, seguido de 250.000 iteraciones de MCMC. Se infirió el número de poblaciones más probables utilizando los métodos ΔK (Evanno et al. 2005) y método Pritchard (Pritchard et al. 2000) implementado en StructureHarvester (Earl & vonHoldt 2012).



Tabla 1. Muestras de *Engraulis ringens* utilizadas en este estudio.

Año	Localidades	Código	Tamaño de muestra	Latitud	Longitud
2008	Callao - Perú	Zona A	30	-12°46'	-77°27'
	Región de Tarapacá	Zona E	31	-18° 31'	-70° 29'
	Región de Valparaíso	Zona F	33	-33° 32'	-71° 40'
	Región del Biobío	Zona B	34	-36° 25'	-72° 53'
	Región de los Ríos	Zona D	31	-39°29'	-73°22'
	Región de los Lagos	Zona C	30	-42° 18'	-73° 19'
2015	UP: XIV-II	Zona I	93	-18° 49'	-70° 37'
				-18° 64'	-70° 38'
				-18° 86'	-70° 36'
				-19° 08'	-70° 32'
				-19° 09'	-70° 32'
				-20° 44'	-70° 17'
				-21° 71'	-70° 17'
				-21° 83'	-70° 17'
				-21° 92'	-70° 23'
				-22° 97'	-70° 34'
				-23° 62'	-70° 42'
				-23° 72'	-70° 48'
	UP V-X	Zona III	48	-34° 07'	-71° 96'
				-34° 89'	-72° 20'
				-35° 46'	-72° 57'
				-36° 92'	-73° 38'
				-37° 21'	-73° 68'
				-38° 00'	-73° 73'

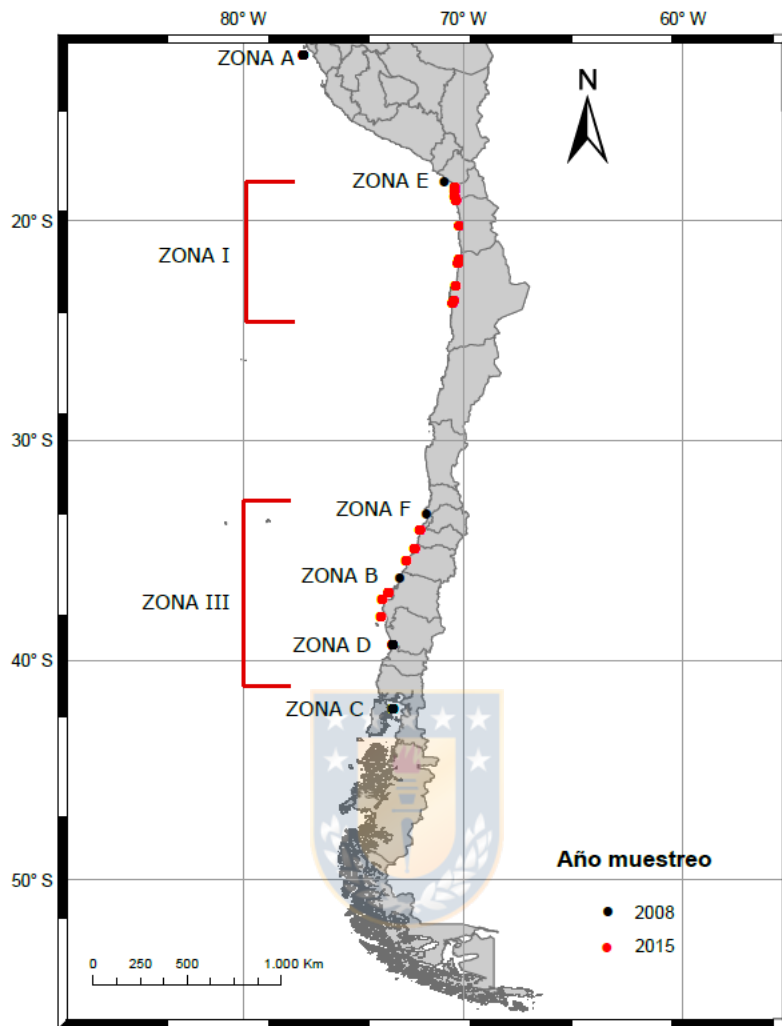


Figura 2. Mapa que indica las zonas que fueron muestreadas y utilizadas en el presente estudio.
Fuente: elaboración propia.

Tabla 2. Comparación de modelos de frecuencias alélicas correlacionadas y no correlacionadas obtenido en Geneland mediante el Factor de Bayes para *Engraulis ringens*. Valores en negrita corresponden a los modelos que muestran mayor evidencia de ajuste a los datos en la base de datos: base de datos adultos 2008, base de datos juveniles 2015, y la base de datos combinada 2008- 2015

Datos	Modelo	ln P(model data)	S.E.	Correlacionado	No Correlacionado
2008	Correlacionado	-9731,289	0,471	-	31,697
	No Correlacionado	-9804,273	0,331	-31,697	-
2015	Correlacionado	-7491,963	0,535	-	32,829
	No Correlacionado	-7567,554	0,435	-32,829	-
2008-2015	Correlacionado	-7542,883	0,062	-	45,458
	No Correlacionado	-7588,341	0,047	-45,458	-



RESULTADOS

Extracción de ADN, visualización y cuantificación

Se logró obtener un total de 510 extracciones de ADN genómico satisfactorias (204 muestras para el año 2008, 206 muestras para Zona I y 100 muestras para Zona III correspondientes al año 2015), tanto en cantidad como calidad, siendo útiles para el ensayo de cualquier marcador molecular.

Desarrollo de marcadores microsatélites mediante NGS

Se marcaron con fluoróforos un total de 32 parejas de partidores, los cuales fueron ensayados para testear tanto las condiciones de PCR como su polimorfismo, los resultados obtenidos fueron adecuados para análisis poblacionales. Eligiendo un total de 15 parejas de partidores para el análisis a nivel poblacional que finalmente se realizó para 330 muestras en total. En el anexo 1 se detallan los loci microsatélites aplicados a nivel poblacional para *Engraulis ringens* en donde el número de alelos por locus varió de 2 (E50) a 33 (E53), la heterocigosidad observada varió de 0,425 (E38) a 0,976 (E50), la heterocigosidad esperada varió de 0,457 (E35) a 0,943 (E53), y la probabilidad de valores de identidad varió de 0,006 (E53) a 0,375 (E38). No se encontró desequilibrio de ligamiento entre ningún par de loci, lo que indica que los marcadores son independientes.

Análisis preliminares: identificación de errores de genotipación y presencia de alelos nulos

En este contexto, seis de los 15 loci microsatélites analizados muestran desviaciones significativas al equilibrio de Hardy-Weinberg. Al evaluar la hipótesis de alelos nulos en la base de datos de *E. ringens*, sólo dos de 15 microsatélites analizados muestran la presencia de alelos nulos (loci E50 y E69).

Parámetros de diversidad genética para loci microsatélites

La variabilidad genética para las agrupaciones según las zonas de 2008 indican valores de número de alelos entre dos (E50) a 28 alelos (E28), con heterocigosidades observadas que varían entre 0,250 (E35) a 1 (E50). Las heterocigosidades esperadas varían entre 0,226 (E35) a 1 (E50) (Tabla 3). Para la variabilidad genética según las zonas de 2015 (Zona I y Zona III), se observó un N_a promedio entre 12 a 15 alelos por localidad, un H_o entre 0,653-0,698 y una H_e entre 0,653 y 0,734 (Tabla 4). Los parámetros de variabilidad genética para la comparación entre 2008 y 2015 indican valores de N_a promedio entre 16-17 alelos por localidad, un H_o entre 0,660-0,684 y una H_e entre 0,750-0,752 (Tabla 5).

Análisis de poder estadístico para loci microsatélites

Previo al análisis poblacional, se realizó estimaciones de los niveles de poder estadístico para el set de 15 loci microsatélites (Tabla 6), las simulaciones indican que el conjunto de microsatélites, en combinación con el tamaño de la muestra utilizada, confiere suficiente poder estadístico, capaz de detectar divergencias genéticas a un nivel de F_{st} tan bajo como 0,0022, con una probabilidad de 0,99. En ausencia de deriva génica (*setting* de $t=0$), el error tipo I o α de 0,05 y los valores para cada variable fueron, correspondiente a la probabilidad de rechazar la hipótesis nula (H_0 ; homogeneidad genética; $F_{st}=0$) cuando esta es verdadera, varía desde 0,045 con el test χ^2 , a 0,066 con el test de Fisher, bordeando el 5% de la significancia estadística.

Estructuración poblacional para loci microsatélites

Para las estimaciones de los índices de estructuración genética poblacional para las comparaciones pareadas entre las seis zonas muestreadas en el 2008, el índice F_{st} (Tabla 7) mostró valores significativos al comparar las zonas de muestreo ubicadas al sur de la Zona III (regiones del Biobío, los Ríos y los Lagos) con la región de Valparaíso y la región de Tarapacá. Las mayores diferencias se dan entre las regiones de los Lagos y Valparaíso con un F_{st} de 0,019, y entre las regiones de los Ríos y Tarapacá, con un F_{st} de 0,013. Los

valores del índice de estructuración poblacional R_{st} no fueron significativos, dado α de 0,05 y los valores para cada variable fueron = 0,05 (Tabla 8). Al estimar los índices de divergencia genética entre las zonas de muestreo del año 2015 (Tabla 9), ninguna de las comparaciones arroja valores significativos para estructuración genética poblacional.

Al comparar las muestras de 2008 con las del período 2015 para *E. ringens* los valores son estadísticamente no significativos. Estos estimados, $F_{st}=0,00048$ y $R_{st}=0,00002$, no dieron soporte a hipótesis relacionadas con variaciones genéticas temporales significativas (Tabla 10).

Detección de estructura genética poblacional sin información previa

Los resultados de Geneland para el set de datos de individuos adultos del año 2008, mostró dos conglomerados ($K=2$) que no mostraron un patrón espacial latitudinal (Figura 3), sino parchoso. Los valores de isóneas de probabilidad estimados para cada conglomerado mostraron valores menores a 0,6 de probabilidad (Figura 3). Para el set de datos de individuos juveniles del 2015, los dos conglomerados identificados mostraron un claro patrón espacial latitudinal (Figura 4), diferenciando en un conglomerado al norte de los $\sim 25^{\circ}S$ (zona norte de Chile), y al sur de los $\sim 34^{\circ}S$ (zona centro-sur de Chile). Los valores de isóneas de probabilidad estimados para cada conglomerado fueron superiores a 0,9 de probabilidad (Figura 4).

Cuando se analiza la base de datos de adultos del 2008 y juveniles del 2015 en conjunto el análisis no mostró estructuración espacial ni temporal, identificando solo un conglomerado genético ($K=1$) en la distribución geográfica analizada (Figura 5).

El análisis de inferencia de estructura genética poblacional realizado en Structure generaron como resultado patrones de ancestrías típico de ausencia de estructura genética para las tres bases de datos analizadas con el método de Pritchard (Pritchard et al. 2000) (Figura 6 y 7). Por otro lado, el método (ΔK) de Evanno (Evanno et al. 2005) encuentra un valor de $K=2$ para las bases de datos del año 2008 y la base conjunta de los años 2008-2015 y $K=4$ para las muestras correspondientes al año 2008.

Tabla 3. Parámetros de variabilidad genética de *Engraulis ringens* para muestras del año 2008.

Localidad	Parámetro	Locus														
		E27	E39	E6	E28	E49	E48	E45	E22	E73	E69	E50	E72	E53	E35	E61
ZONA A	N	29	29	28	29	28	27	28	28	28	25	27	29	29	30	28
	Na	3	9	9	14	7	11	5	6	14	14	3	7	22	6	12
	Ho	0,379	0,552	0,679	0,759	0,679	0,741	0,500	0,393	0,893	0,720	0,815	0,552	0,793	0,600	0,536
	He	0,530	0,769	0,822	0,863	0,755	0,813	0,743	0,652	0,881	0,900	0,504	0,687	0,937	0,561	0,837
	H&W	0,153	0,004	0,001	0,078	0,321	0,420	0,012	0,000	0,518	0,006	0,000	0,054	0,001	0,680	0,000
ZONA B	N	33	32	32	34	31	30	30	29	28	32	31	32	32	32	31
	Na	5	11	11	14	8	14	8	4	15	16	2	5	28	3	10
	Ho	0,394	0,563	0,781	0,882	0,774	0,933	0,633	0,310	0,893	0,656	1	0,688	0,781	0,250	0,645
	He	0,447	0,817	0,756	0,866	0,763	0,839	0,762	0,466	0,891	0,910	0,500	0,670	0,943	0,322	0,833
	H&W	0,395	0,000	0,511	0,129	0,138	0,082	0,046	0,008	0,719	0,000	0,000	0,599	0,005	0,132	0,003
ZONA C	N	29	28	29	29	29	28	26	26	27	24	24	28	26	30	29
	Na	4	7	10	11	6	9	6	4	17	14	3	7	20	3	12
	Ho	0,621	0,714	0,690	0,828	0,586	0,714	0,577	0,615	0,963	0,750	0,917	0,500	0,769	0,300	0,759
	He	0,495	0,810	0,671	0,834	0,750	0,794	0,708	0,638	0,905	0,893	0,515	0,679	0,929	0,384	0,878
	H&W	0,361	0,452	0,103	0,902	0,102	0,003	0,140	0,435	0,208	0,007	0,000	0,061	0,005	0,150	0,177
ZONA D	N	31	31	31	31	30	30	30	24	31	28	31	28	30	28	28
	Na	5	7	8	13	12	13	6	4	14	14	2	6	24	4	10
	Ho	0,516	0,484	0,774	0,677	0,500	0,833	0,667	0,375	0,968	0,821	0,935	0,464	0,800	0,250	0,750
	He	0,509	0,820	0,750	0,853	0,784	0,866	0,733	0,519	0,893	0,895	0,498	0,668	0,937	0,524	0,872
	H&W	0,223	0,000	0,182	0,004	0,000	0,404	0,357	0,109	0,693	0,084	0,000	0,010	0,021	0,000	0,202
ZONA E	N	31	31	30	31	31	30	29	24	31	31	30	28	31	31	30
	Na	3	8	9	11	8	10	6	5	13	14	3	8	22	5	10
	Ho	0,769	1,773	1,771	1,972	1,856	1,938	1,669	0,965	2,263	2,418	0,766	1,353	2,819	0,742	2,048
	He	0,548	0,806	0,633	0,581	0,581	0,767	0,690	0,333	0,935	0,806	1	0,607	0,774	0,226	0,700
	H&W	0,605	0,452	0,028	0,003	0,003	0,017	0,311	0,006	0,316	0,007	0,000	0,118	0,018	0,011	0,059
ZONA F	N	31	29	31	30	25	33	31	30	33	30	30	33	31	30	29
	Na	3	8	10	10	8,000	13	7	6	13	16	2	6	25	4	10
	Ho	0,387	0,621	0,645	0,633	0,640	0,697	0,581	0,533	0,970	0,733	0,967	0,394	0,774	0,333	0,552
	He	0,556	0,750	0,770	0,829	0,781	0,831	0,772	0,601	0,891	0,891	0,499	0,681	0,939	0,427	0,821
	H&W	0,090	0,094	0,023	0,002	0,114	0,010	0,053	0,266	0,540	0,030	0,000	0,000	0,001	0,057	0,000

N: Número de individuos amplificadas; Na: Numero de alelos por población; Ho: Heterocigosidad observada He: Heterocigosidad esperada; H&W: valor de probabilidad para el test de equilibrio de Hardy & Weinberg. Valores en negrita significativos al $p < 0,05$ de significancia.

Tabla 4. Parámetros de variabilidad genética utilizando muestras de 2015: Zona I vs Zona III. Estimadores para los 15 loci microsatélites para las Zonas I y Zona III de las muestras correspondientes al año 2015.

Locus	Parámetro									
	ZONA I					ZONA III				
	N	Na	Ho	He	H&W	N	Na	Ho	He	H&W
E27	89	4	0,494	0,513	0,123	48	5	0,542	0,566	0,202
E39	86	14	0,651	0,819	0,000	46	10	0,848	0,754	0,140
E6	81	13	0,716	0,741	0,098	47	9	0,574	0,790	0,003
E28	87	14	0,759	0,860	0,053	37	15	0,649	0,863	0,000
E49	91	11	0,714	0,803	0,144	39	10	0,667	0,788	0,052
E48	91	17	0,813	0,839	0,167	45	11	0,711	0,823	0,009
E45	91	19	0,758	0,794	0,022	45	9	0,644	0,816	0,035
E22	91	12	0,549	0,656	0,000	40	7	0,250	0,494	0,000
E73	87	22	0,920	0,908	0,986	45	15	0,933	0,898	0,082
E69	90	18	0,689	0,912	0,000	39	13	0,615	0,864	0,001
E50	87	4	0,977	0,517	0,000	41	4	0,976	0,546	0,000
E72	90	15	0,500	0,669	0,000	38	9	0,605	0,681	0,887
E53	92	42	0,870	0,952	0,006	48	36	0,854	0,947	0,041
E35	87	5	0,368	0,406	0,029	48	5	0,292	0,297	0,132
E61	92	17	0,696	0,886	0,000	47	17	0,638	0,888	0,000

N: Número de individuos amplificados; Na: Numero de alelos por población; Ho: Heterocigosidad observada He: Heterocigosidad esperada; H&W: valor de probabilidad para el test de equilibrio de Hardy & Weinberg. Valores en negrita significativos al $p < 0,05$ de significancia.

Tabla 5. Parámetros de variabilidad genética utilizando muestras del año 2008 vs año 2015.

Locus	Parámetro									
	2008					2015				
	N	Na	Ho	He	H&W	N	Na	Ho	He	H&W
E27	184	5	0,473	0,512	0,666	137	5	0,511	0,534	0,020
E39	180	15	0,622	0,811	0,000	132	16	0,720	0,814	0,003
E6	181	15	0,702	0,806	0,000	128	13	0,664	0,776	0,007
E28	184	27	0,728	0,863	0,000	124	18	0,726	0,864	0,000
E49	174	13	0,626	0,793	0,000	130	13	0,700	0,805	0,003
E48	178	20	0,781	0,843	0,001	136	17	0,779	0,837	0,045
E45	174	9	0,609	0,776	0,000	136	20	0,721	0,805	0,002
E22	161	8	0,429	0,581	0,000	131	13	0,458	0,615	0,000
E73	178	21	0,938	0,902	0,008	132	22	0,924	0,909	0,699
E69	170	22	0,747	0,913	0,000	129	18	0,667	0,903	0,000
E50	173	5	0,942	0,507	0,000	128	4	0,977	0,526	0,000
E72	178	10	0,534	0,683	0,000	128	16	0,531	0,676	0,000
E53	179	48	0,782	0,951	0,001	140	47	0,864	0,956	0,007
E35	181	7	0,326	0,434	0,000	135	6	0,341	0,370	0,003
E61	175	16	0,657	0,875	0,000	139	22	0,676	0,892	0,000

N: Número de individuos amplificados; Na: Numero de alelos por población; Ho: Heterocigosidad observada He: Heterocigosidad esperada; H&W: valor de probabilidad para el test de equilibrio de Hardy & Weinberg. Valores en negrita significativos al $p < 0,05$ de significancia.

Tabla 6. Estimados del poder estadístico de 15 loci microsatélites.

Valores de probabilidad χ^2 y Test de Fisher para detectar niveles de diferenciación poblacional (F_{st}) por promedio de test exacto de Fisher's y χ^2 , algoritmo implementado en Powsim (Ryman & Palm 2006).

Fst esperado	χ^2 Test	Fisher's Test	Ne	Generaciones t	Runs
0	0,045	0,066	70.000	0	10.000
0,0011	0,742	0,635	70.000	10	10.000
0,0017	0,952	0,886	70.000	15	10.000
0,0022	0,996	0,982	70.000	20	10.000
0,045	1	1	70.000	40	10.000

Tabla 7. Índice de estructuración poblacional Fst por pares de zonas para muestras del año 2008.

Localidad	ZONA A	ZONA B	ZONA C	ZONA D	ZONA E	ZONA F
ZONA A	-	0,074	0,085	0,283	0,130	0,118
ZONA B	0,006	-	0,280	0,324	0,025	0,007
ZONA C	0,006	0,001	-	0,362	0,019	0,000
ZONA D	0,003	0,001	0,001	-	0,000	0,080
ZONA E	0,005	0,007	0,008	0,013	-	0,623
ZONA F	0,005	0,010	0,019	0,006	-0,000	-

Tabla 8. Índice de estructuración poblacional Rst por pares de zonas para muestras del año 2008.

Localidad	ZONA A	ZONA B	ZONA C	ZONA D	ZONA E	ZONA F
ZONA A	-	0,374	0,813	0,735	0,207	0,497
ZONA B	0,003	-	0,885	0,656	0,766	0,868
ZONA C	-0,008	-0,012	-	0,763	0,652	0,584
ZONA D	-0,003	-0,001	-0,004	-	0,441	0,971
ZONA E	0,008	-0,005	-0,001	0,005	-	0,921
ZONA F	0,000	-0,000	0,000	-0,021	-0,010	-

Tabla 9. Índice de estructuración poblacional Fst/ Rst por pares de zonas para muestras del año 2015.

Localidad	Fst		Rst	
	ZONA I	ZONA III	ZONA I	ZONA III
ZONA I	-	0,056	-	0,352
ZONA III	0,002	-	0,003	-

Tabla 10. Índice de estructuración poblacional Fst/ Rst por pares muestras del año 2008 vs año 2015.

Localidad	Fst		Rst	
	2008	2015	2008	2015
2008	-	0,2970	-	0,5729
2015	0,00048	-	0,00002	-

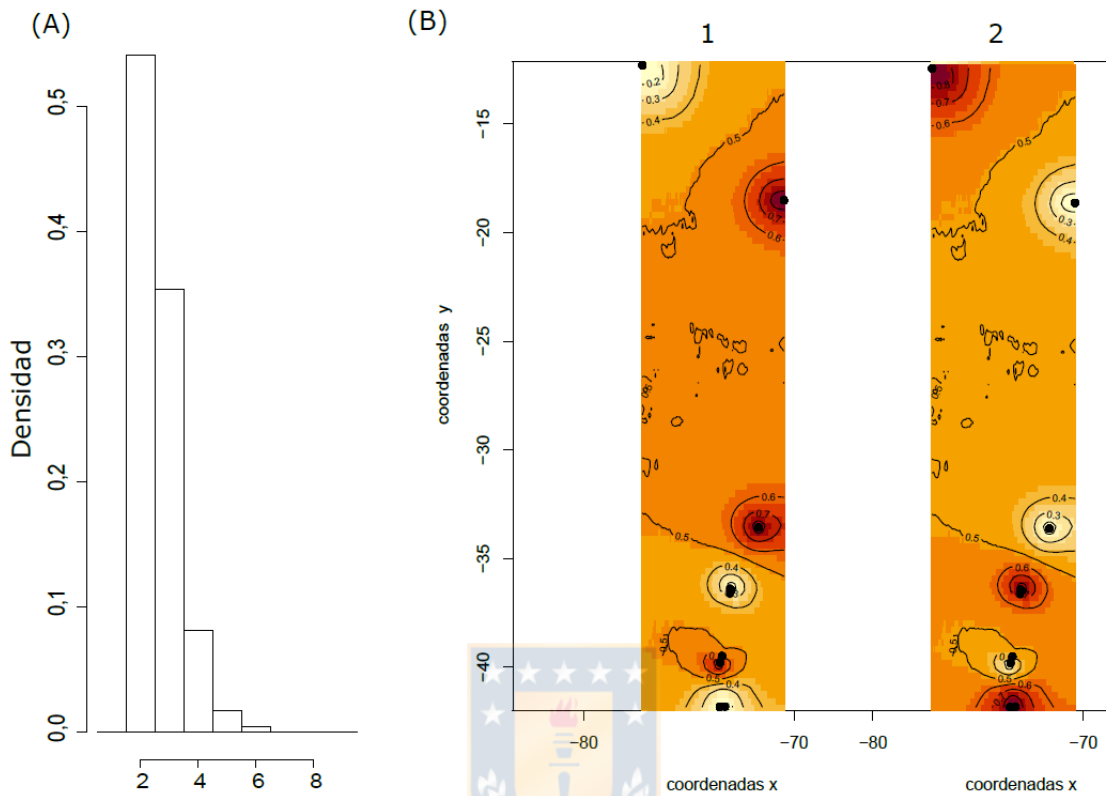


Figura 3. (A) Densidad de frecuencias para cada número de *cluster* genéticos testeados. (B) Mapa de isolíneas de probabilidades para los dos conglomerado genéticos (1-2) obtenidos mediante el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas en la base de datos de individuos adultos (año 2008). Fuente: elaboración propia.

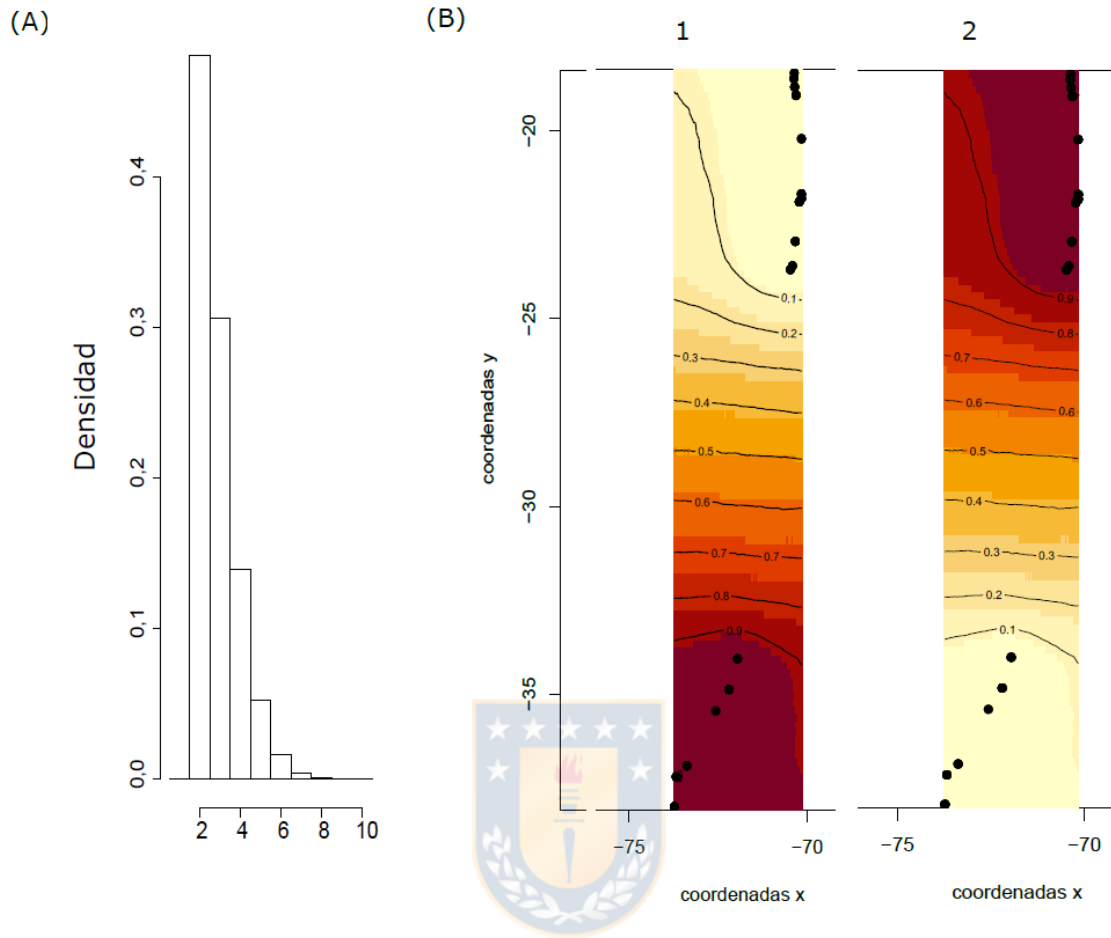


Figura 4. (A) Densidad de frecuencias para cada número de *cluster* genéticos testeados. (B) Mapa de isolíneas de probabilidades para los dos conglomerado genéticos (1-2) obtenidos mediante el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas en la base de datos de individuos juveniles (año 2015). Fuente: elaboración propia.

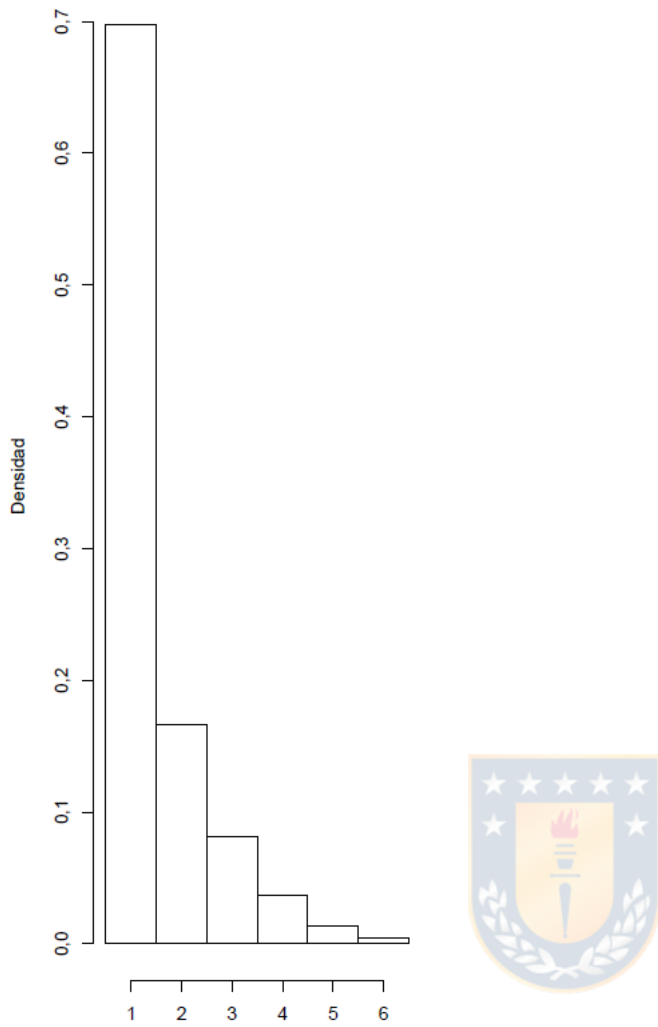


Figura 5. Densidad de frecuencias para cada número de *cluster* genéticos testeado, obtenidos mediante el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas para la base de datos de genotipos combinada 2008-2015. Fuente: elaboración propia.

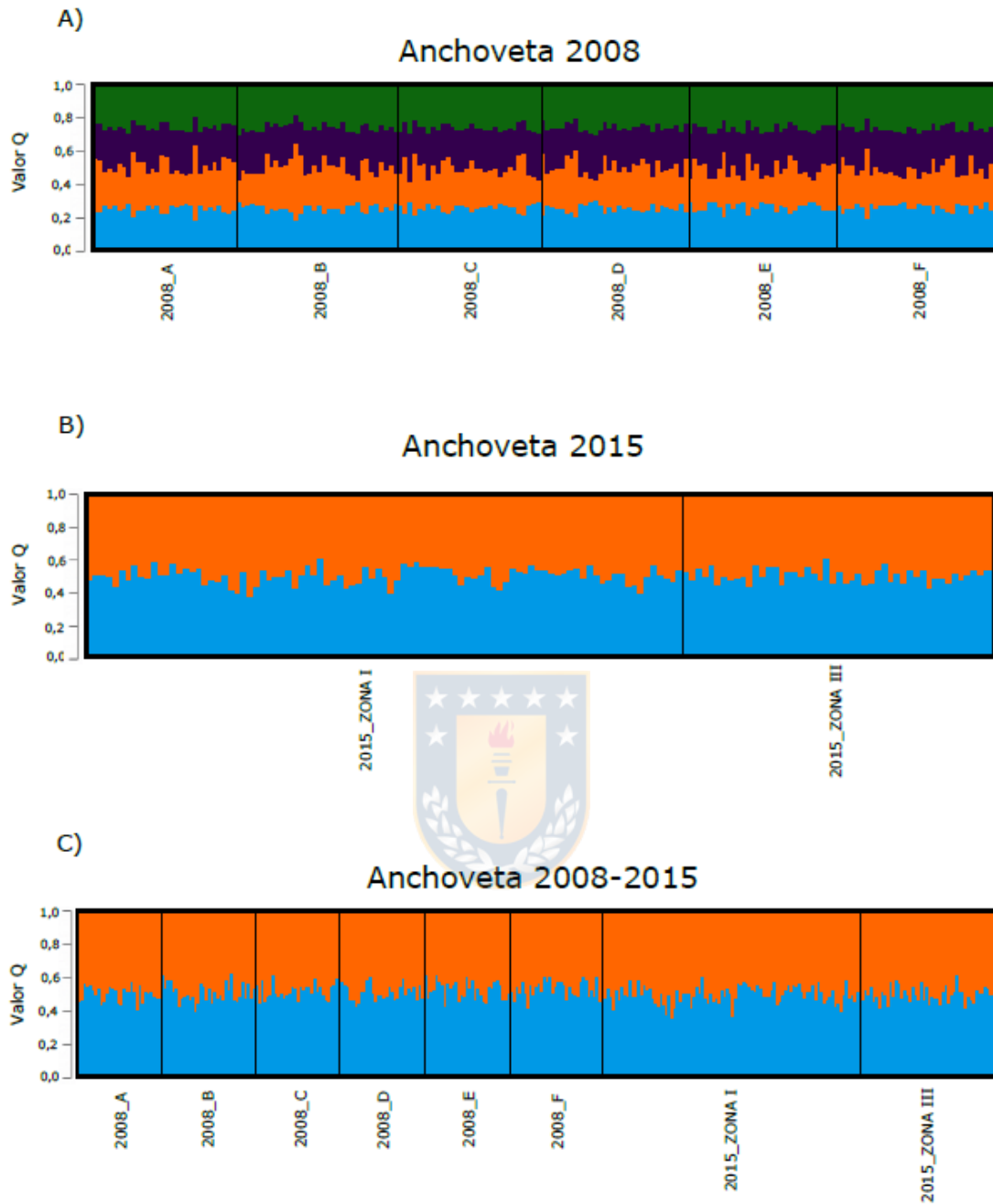


Figura 6. Gráficos de coeficientes de ancestría individual obtenidos en el software Structure para: (A) Bases de datos genotipos 2008 para K=6. (B) Base de datos genotipos 2015 para K= 2. (C) Base de datos genotipos combinadas para años 2008-2015 para K= 8. Valor Q: Probabilidad de asignación de cada individuo. Fuente: elaboración propia.

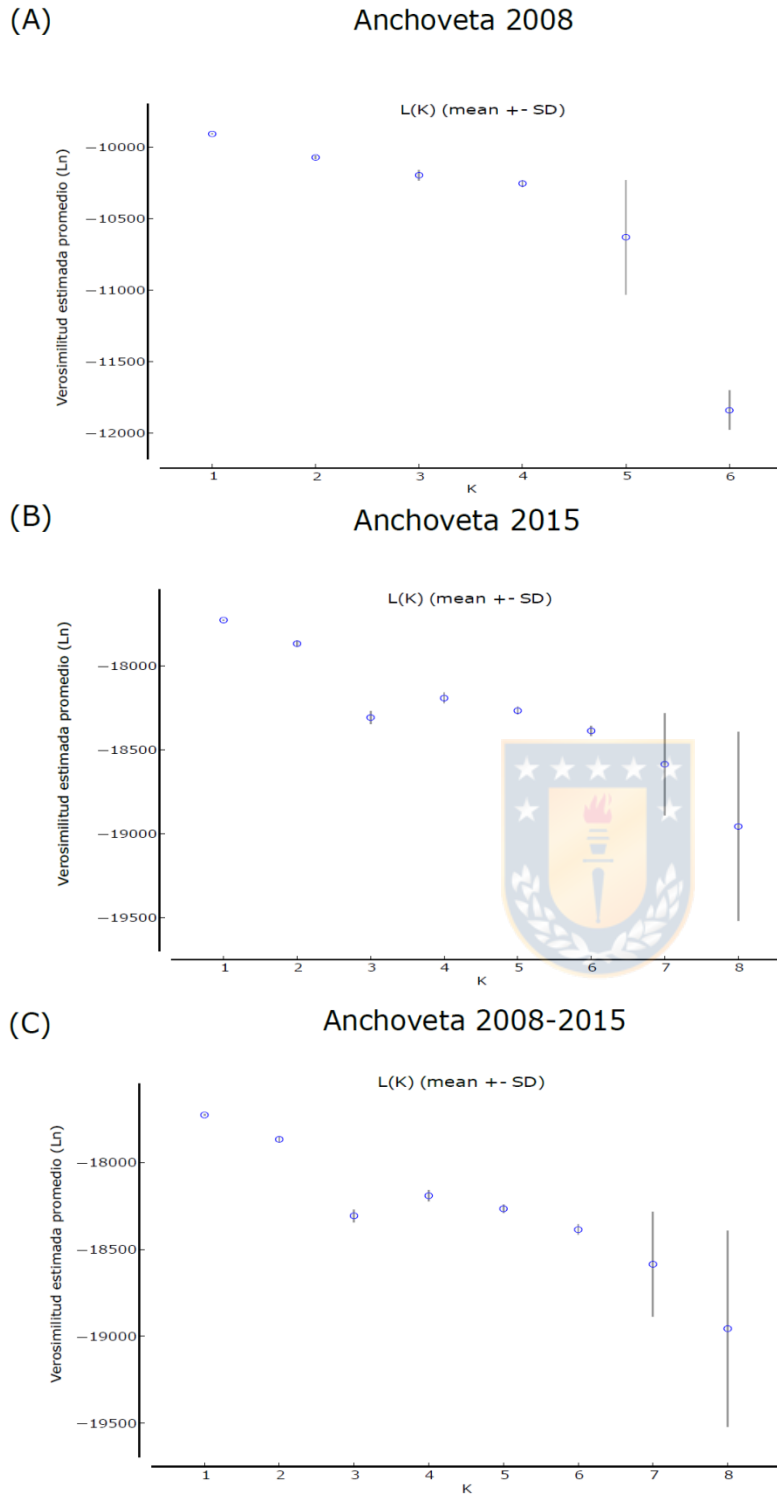


Figura 7. Método de Pritchard (Pritchard et al. 2000). Gráfico del comportamiento del logaritmo de probabilidad $\ln p(D)$ para: (A) Bases de datos genotipos 2008. (B) Base de datos genotipos 2015. (C) Base de datos genotipos combinadas para años 2008-2015. Fuente: elaboración propia.

DISCUSIÓN

Los loci microsatélites analizados que mostraron desviaciones significativas al equilibrio de Hardy-Weinberg, también tenían un marcado déficit de heterocigotos, existiendo múltiples causas para su origen. Rico et al. (1997) revisa posibles causas del exceso de homocigotos, evaluando varias hipótesis relacionadas con error de genotipado, presencia de alelos nulos, efecto Wahlund (Wahlund 1928), endogamia, apareamiento selectivo, y /o selección. Al evaluar la hipótesis de alelos nulos en la base de datos de *Engraulis ringens*, sólo dos de 15 microsatélites analizados muestran la presencia de alelos nulos (loci E50 y E69). Dakin & Avise (2004), establecen que los alelos nulos están presentes en la mayoría de la taxa, particularmente en aquellas poblaciones con altos tamaños efectivos poblacionales (Chapuis & Estoup 2007), como es el caso de peces pelágicos como *E. ringens*. La presencia de alelos nulos podría contribuir al significativo desequilibrio de Hardy-Weinberg, teniendo presente las potenciales consecuencias de este desequilibrio en el análisis de diferenciación poblacional. Los alelos nulos crean falsos homocigotos, lo cual es problemático para las estimaciones de diferenciación poblacional, y análisis de parentesco. Sin embargo, si las frecuencias alélicas son corregidas para esta situación, las bases de datos si pueden ser utilizadas para evaluar diferenciación poblacional (ver Van Oosterhout et al. 2004). Considerando además que Carlsson (2008) realiza un análisis basado en simulaciones, sin corregir la base de datos, demostrando que loci microsatélites afectados por alelos nulos, no alterarían el resultado de análisis de parentesco, y por lo tanto pueden ser incluidos en este tipo de análisis. Esta información nos permite establecer que los 15 microsatélites desarrollados generan información útil para la identificación y delimitación de unidades genéticas poblacionales.

Los valores de diversidad genética son similares a los reportados anteriormente por otros pelágicos pequeños con heterocigosidades altas (Chiu et al. 2002; Borrell et al. 2012; Zarraonaindia et al. 2012). El número de alelos reportado para *E. ringens* está dentro de los valores promedio informados para peces marinos, con valores promedio de 20 alelos por locus y heterocigosidades de 0.79 (DeWoody & Avise, 2000). Los altos valores de N_a y H_o son comunes en especies que tienen un grandes tamaños efectivos poblacionales de la

especie y / o una alta tasa de mutación para microsatélites (más de 10^{-4} mutaciones / gen / generación) (Jarne & Lagoda, 1996).

Los resultados obtenidos por Geneland dan cuenta de resultados diferentes cuando se trabaja de manera independiente con juveniles y adultos ($K = 2$), y cuando se analiza la base de datos en conjunto para analizarlo en una escala temporal ($K=1$).

Este patrón de aislamiento genético podría estar relacionado con la segregación de la especie en el área de estudio durante fases tempranas de crecimiento, con individuos juveniles cercanos a las áreas de desove (Canales-aguirre et al. 2017), que se van disgregando a medida que van creciendo. *Engraulis ringens* es un pez pelágico pequeño, con una gran abundancia en donde los individuos mueren en promedio entre un 50%-70% por mortalidad natural antes de llegar a la madurez sexual con 11,5 cm LT (Aliaga et al. 2001; Canales & Leal 2009; Subpesca 2019). Los individuos juveniles del presente estudio tienen en promedio de 90 a 120 días por lo tanto hay un gran porcentaje que no alcanzara la edad adulta. Tomando en cuenta que el análisis temporal no encuentra diferencias genéticas significativas, significa que está encontrando los mismos genotipos en ambas bases de datos, por lo tanto esta segregación en estadios juveniles se disiparía llegando a la adultez, producto de mezcla. Plaza et al. (2018) presenta evidencia de esta mezcla utilizando análisis de la microestructura de otolitos en donde se evidencia un porcentaje de mezcla entre adultos de anchoveta del 3% entre la Zona I y Zona III, y de 35% de mezcla en la zona de Atacama-Coquimbo (Zona II), de ejemplares provenientes mayoritariamente de la Zona I y una pequeña fracción de ejemplares adultos proveniente de la Zona III. Estos porcentajes de mezcla serían suficiente para evitar la diferenciación genética significativa de generación en generación, llevando a patrones de homogeneidad genética entre muestras temporales de adultos y juveniles.

Otra posible explicación para $K=2$ es atribuible a que el programa se ejecutó con información previa de coordenadas geográficas, tendiendo el programa a favorecer las particiones que están organizadas espacialmente, agrupando así las poblaciones que estaban más cercanas tanto genética como geográficamente (e.g. Cegelski et al. 2003; Pometti et al. 2014). Esto es posible dado que Geneland se basa en un modelo espacial que divide aleatoriamente un conjunto de datos en un número de polígonos, por medio del diagrama de

Voronoi homogenizado por un proceso de Poisson. En donde cada una de estas células de Voronoi no están asociadas con un individuo, sino con territorios, por lo tanto cada territorio puede que agrupe varios individuos dentro de una sola célula (Guillot et al. 2005a, b).

Los resultados obtenidos en el programa Structure se analizan típicamente para inferir un K óptimo mediante uno o una combinación de métodos. (e.g. Método de Pritchard et al. 2000 y el método descrito por Evanno et al. 2005). Al utilizar ambos métodos encontramos discrepancia ya que para el método de Evanno encuentra un valor de K=2 (2008; 2008-2015) y K=4 (2008). En cambio el método de Pritchard et al. (2000) asigna para las 3 bases de datos analizadas los mayores valores verosimilitud a K=1. Cuando se observa el gráfico de barras con los coeficientes de ascendencia este muestra homogeneidad para todas localidades en estudio a nivel espacial y temporal.

Evanno et al. (2005) concluye que es probable que ΔK detecte el nivel más alto de los patrones de estructura genética y que además su uso no permite la evaluación de K=1 como potencial solución. Es por esto que los autores recomiendan que este método no debe ser utilizado de forma exclusiva para estimar el número más probable de K.

Posteriormente otros autores han vuelto a hacer referencia a que se debe prestar especial atención a la comparación de K=1 versus valores mayores, ya que el método de Evanno no es capaz de realizar esta comparación (Gilbert et al. 2012; Janes et al. 2017).

Como se destaca en el manual de Structure (Pritchard et al. 2007), la selección de K óptimo puede ser un procedimiento bastante subjetivo y es mejor incluir en la inferencia aspectos de la biología e historia de vida del organismo estudiado.

Además hay que agregar que los valores de índice de estructuración para las comparaciones realizadas fueron bajas y no significativas. Estos valores estimados de F_{st} bajos y no significativos concuerdan con lo propuesto por Ward et al. (1994), que plantea que peces marinos presentan baja diferenciación genética con valores de $F_{st} < 0,01$, comparados con peces de agua dulce y anádromos. Similares resultados han sido obtenidos para la anchoveta del norte, *E. mordax* y la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax*, dos pequeños pelágicos que habitan aguas templadas de la Corriente de California en el Pacífico Noreste

(Lecomte et al. 2004). Para *E. japonicus*, también encontramos bajos valores de F_{st} (0,002-0,009) y R_{st} (0,002-0,007) entre regiones cercanas a Taiwán por el análisis de seis loci microsatélites (Yu et al. 2002), donde el análisis de ADNmt tampoco detecta diferenciación genética con F_{st} que varían entre 0,0001-0,014 (Yu et al. 2005; Liu et al. 2006).

En contraste estudios realizados en *E. encrasicolus* encuentran estructuración genética con microsatélites y secuencias de ADN mitocondrial con valores de F_{st} bajos pero significativos ($F_{st}= 0,043$, $P =0,0000$; $\theta_{st} =0,078$, $p=0,0009$) (Borrell et al. 2012) y utilizando marcadores moleculares SNPs ($F_{st}: 0,013-0,247$) (Zarraonaindia et al. 2012). Este patrón puede ser atribuido a que los huevos, las larvas, los juveniles y los adultos se retienen de alguna manera, dando características atípicas a las poblaciones del área costera en que habita la anchoveta europea en comparación con las de las regiones oceánicas más abiertas.

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de análisis realizados se indica que no hay evidencia de quiebres o discontinuidades genéticas significativas a través del rango de estudio de la especie a una escala temporal. Estos resultados son consistentes con investigaciones previas donde a través del análisis de aloenzimas (Galleguillos et al., 1994), y los genes nucleares ITS y Calmodulina (Ferrada et al., 2002), como también de otros peces pelágicos como *Strangomera bentincki* (Galleguillos et al. 1996) y *Trachurus murphyi* (Galleguillos et al. 2012) no detectan diferencias genéticas significativas entre muestras provenientes de la costa de Chile.

Estos resultados contrastan con lo encontrado por otros autores a partir de caracteres morfológicos, merísticos e historia de vida, lo cual puede ser explicado ya que la variabilidad ambiental tiende a impactar la fisiología y morfología de los peces. En particular, el tamaño, la condición o el peso y el índice gonadosomático (Arismendi et al. 2011; Cifuentes et al. 2012; Vicenzi et al. 2014; Bal et al. 2017; Boltaña et al. 2017). La familia Engraulidae se caracteriza por procesos biológicos altamente plásticos, lo que hace probable que la especie haya adaptado su fenotipo a las condiciones ambientales y al esfuerzo de pesca (Hunter et al. 2015; Canales et al. 2018).

La homogeneidad genética evidenciada concuerda con la información de que peces marinos pelágicos, generalmente muestran bajos niveles de diferenciación genética entre regiones, debido a sus importantes tamaños poblacionales, el alto potencial de dispersión durante sus primeros estados planctónicos como huevos y larvas, alta fecundidad, y conductas migratorias, que acompañado con la ausencia de barreras físicas evidentes entre áreas costeras y mar abierto, reducen la divergencia entre poblaciones (Palumbi 1994; Grant & Bowen 1998; Hewitt 2000).



CONCLUSIONES

Ante los resultados descritos se concluye que:

- En escala espacial se observan diferencias genéticas entre los extremos de la distribución de la especie en Chile, para ejemplares juveniles del año 2015, lo que podría estar relacionado con la segregación de la especie en el área de estudio durante fases tempranas de crecimiento.
- A escala temporal se evidencia la presencia de una sola gran población en la especie *E. ringens* en su distribución en Chile, no observándose diferencias genéticas temporales, y destacando que las diferencias genéticas espaciales evidenciadas en los juveniles del 2015 deben ser corroboradas con: análisis de muestras de juveniles en la zona central, para identificar la zona de quiebre genético y poder completar el patrón descrito, así como analizar la genética de los adultos del 2015, y comparar con la información ya generada.



REFERENCIAS

- Aguayo, H.M., 1976. Edad y crecimiento de la anchoveta (*Engraulis ringens*, Jenyns) del norte de Chile (Arica-Iquique). Invest. Pesq. Santiago 23, 25.
- Alheit J., Alarcon V. H. & Macewicz B. J. 1984. Spawning frequency and sex ratio in the Peruvian anchovy, *Engraulis ringens*. CalCOFI Report 25: 43–52.
- Aliaga, B., D. Gómez & S. Neira. 2001. Análisis bio-económico de la pesquería de sardina (*Sardinops sagax*) y anchoveta (*Engraulis ringens*) de la zona norte de Chile. Invest. Mar., Valparaíso, 29(2): 15-23.
- Arismendi, I., Penaluna, B., and Soto, D. 2011. Body condition indices as a rapid assessment of the abundance of introduced salmonids in oligotrophic lakes of southern Chile. Lake and Reservoir Management, 27: 61–69.
- Armour, J. A., R. Neumann, S. Gobert y A. J. Jeffreys. 1994. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. Human Molecular Genetics. 3: 599-605.
- Ashford, J.R., Arkhipkin, A. I., Jones, C. M., 2006. Can the chemistry of otolith nuclei determine population structure of Patagonian toothfish *Dissostichus eleginoides*? Journal of Fish Biology. 69, 708-721.
- Avaria, S., J. Carrasco, J. Rutllant & E. Yáñez. 2004. El Niño-La Niña 1997-2000, Sus Efectos en Chile.
- Bal, G., Montorio, L., Rivot, E., Pré vost, E., Baglinie`re, J.-L., and Nevoux, M. 2017. Evidence for long-term change in length, mass and migration phenology of anadromous spawners in French Atlantic salmon *Salmo salar*. Journal of Fish Biology, 90: 2375–2393.
- Barrueto, C., 1993. Edad y crecimiento de la anchoveta (*Engraulis ringens* Jenyns, 1842) de Iquique y Talcahuano mediante análisis de otolitos. Semin. para optar al Tit. Biólogo Mar. Univ. Concepción.
- Begg GA, Waldman JR. 1999. An holistic approach to fish stock identification. Fisheries Research, 43: 35–44.
- Begg, G.A., 2005. Life history parameters. In: Stock identification methods, applications in Fishery Science, Cadrin, S.X., Friedland, K.D., Waldman, J.R., (Ed.), Academic Press, San Diego. 119-159.
- Boltaña, S., Sanhueza, N., Aguilar, A., Gallardo-Escarate, C., Arriagada, G., Valdes, J. A., Soto, D. et al. 2017. Influences of thermal environment on fish growth. Ecology and Evolution, 7: 6814–6825.

- Borrell Y., Alvarez J., Blanco G., Martínez de Murguía A., Lee D., Fernández C., Martínez C., Cotano U., Álvarez P. & Sanchez P. 2011. A parentage study using microsatellite loci in a pilot project for aquaculture of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* L. *Aquaculture* 310: 305–311.
- Brookfield JFY. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol Ecol* 5:453–455.
- Bustos C. A., Landaeta M. F. & Balbontín F. 2008. Spawning and early nursery areas of anchoveta *Engraulis ringens* Jenyns, 1842 in fjords of southern Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43: 381–389.
- Canales CM, Adasme NA, Cubillos LA, Cuevas MJ, Sanchez N. 2018. Long-time spatio-temporal variations in anchovy (*Engraulis ringens*) biological traits off northern Chile: an adaptive response to long-term environmental change? *ICES Journal of Marine Science*, 75(6), 1908–1923. doi:10.1093/icesjms/fsy082.
- Canales T. M. & Leal E. 2009. Parámetros de historia de vida de la anchoveta *Engraulis ringens* Jenyns, 1842, en la zona centro norte de Chile. *Revista de biología marina y oceanografía* 44: 173–179.
- Canales-Aguirre C.B., Ferrada S., Hernández C.E. & R. Galleguillos. 2010. Population structure and demographic history of *Gerytherus blacodes* using microsatellite loci. *Fishery Research*. 106: 102-106.
- Canales-Aguirre CB, Ferrada-Fuentes S, Galleguillos R, Sepúlveda HH, Artal OE, Parada C, Medel MC, Niklitschek EJ, Garcés C, Aedo G, Hernández CE, Rivera R, Santis O, Gormáz A. 2017. Identificación de áreas de conservación o resguardo para los recursos sardina común y anchoveta en la zona centro sur de Chile. Informe final FIPA 2016-34. 326 pp.
- Carlsson J. 2008. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* 99:616–623.
- Castro L. R., Salinas G. R. & Hernández E. H. 2000. Environmental influences on winter spawning of the anchoveta *Engraulis ringens* off central Chile. *Marine Ecology Progress Series* 197: 247–258.
- Cegelski C, Waits L, Anderson J. 2003. Assessing population structure and gene flow in Montana wolverines (*Gulo gulo*) using assignment-based approaches. *Mol Ecol.*;12: 2907–2918.
- Chapuis M-P, Estoup A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution* 24:621–631.
- Chavez F. P., Ryan J., Lluch-Cota S. E. & Ñiquen M. 2003. From anchovies to sardines and back: multidecadal change in the Pacific Ocean. *Science* 299: 217–221.

- Chiu TS, Lee YJ, Huang SW, Yu HT. 2002. Polymorphic microsatellite markers for stock identification in Japanese anchovy (*Engraulis japonica*). *Molecular Ecology*. 2:49-50.
- Cifuentes, R., González, J., Montoya, G., Jara, A., Ortíz, N., Piedra, P., and Habit, E. 2012. Weight-length relationships and condition factor of native fish from San Pedro River (Valdivia River basin, Chile. *Gayana*, 75: 101–110.
- Cubillos L. A., Ruiz P., Claramunt G., Gacitúa S., Núñez S., Castro L. R., Riquelme K., Alarcón C., Oyarzún C. & Sepúlveda A. 2007. Spawning, daily egg production, and spawning stock biomass estimation for common sardine (*Strangomera bentincki*) and anchovy (*Engraulis ringens*) off central southern Chile in 2002. *Fisheries Research* 86: 228–240.
- Cubillos L., Canales M., Bucarey D., Rojas A. & Alarcón R. 1999. Época reproductiva y talla media de primera madurez sexual de *Strangomera bentincki* y *Engraulis ringens* en el período 1993-1997, en la zona centrosur de Chile. *Investigaciones Marinas* 27: 73–85.
- Cubillos, L., Arancibia, H., 1993. On the seasonal growth of common sardine (*Strangomera bentincki*) and anchovy (*Engraulis ringens*) off Talcahuano, Chile. *Rev. Biol. Mar* 28, 43–49.
- Cubillos, L.A., Arcos, D.F., 2002. Recruitment of common sardine (*Strangomera bentincki*) and anchovy (*Engraulis ringens*) off central-south Chile in the 1990s and the impact of the 1997–1998 El Niño. *Aquat. Living Resour.* 15, 87–94.
- Cubillos, L.A., Arcos, D.F., 2002. Recruitment of common sardine (*Strangomera bentincki*) and anchovy (*Engraulis ringens*) off central-south Chile in the 1990s and the impact of the 1997–1998 El Niño. *Aquat. Living Resour.* 15, 87–94.
- Cubillos, L.A., Arcos, D.F., Bucarey, D.A., Canales, M.T., 2001. Seasonal growth of small pelagic fish off Talcahuano, Chile (37° S, 73° W): a consequence of their reproductive strategy to seasonal upwelling? *Aquat. Living Resour.* 14, 115–124.
- Cubillos, S., Canales, M., Hernández, R., Bucarey, S., Vilugrón, L., Miranda, A., 1998. Poder de pesca, esfuerzo de pesca y cambios estacionales e interanuales en la abundancia relativa de *Strangomera bentincki* y *Engraulis ringens* en el área frente a Talcahuano, Chile (1990-97). *Investig. Mar.* 26, 3–14.
- Cury, P., Shannon, L., 2004. Regime shifts in upwelling ecosystems: observed changes and possible mechanisms in the northern and southern Benguela. *Prog. Oceanogr.* 60, 223–243.
- Dakin EE, Avise JC. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93:504–509.
- De Woody J. & Avise J. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56: 461–473.

- Drummond, A.J. & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214.
- Earl DA, vonHoldt B. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources* 4:359–361.
- Espino, M. 1999. El Niño 1997-98: Su efecto sobre el ambiente y los recursos pesqueros en el Perú. *Rev. Per. Biol.*, 3: 97-109.
- Espinoza P, Bertrand A. 2008. Revisiting Peruvian anchovy (*Engraulis ringens*) trophodynamics provides a new vision of the Humboldt current system. *Progress in Oceanography* 79:215-227 DOI 10.1016/j.pocean.2008.10.022.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology* 14:2611–2620.
- Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Fazeres MAI. 2007. Estudio de la biología del sargo blanco, *Diplodus sargus cadenati* de la paz, Bauchot y Dget 1974, en aguas de Canarias: influencias de las características geográficas y climáticas del archipiélago. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 258 pp.
- Ferrada S., Hernández K., Montoya R. & Galleguillos R. 2002. Estudio poblacional del recurso anchoveta (*Engraulis ringens* Jenyns 1842) (Clupeiformes, Engraulidae), mediante análisis de ADN. *Gayana* 66: 243–248.
- Ferrada, S., Canales-Aguirre, C.B., Barrera, A., Galleguillos, R., Dib, M., Hernández, C.E., Oyarzún, C., 2009. ADN nuclear y mitocondrial evidencian una unidad de stock genético para *Engraulis ringens* en la costa chileno-peruana., in: I Reunión Conjunta de Genética Y Evolución XLII Reunión Anual de La Sociedad de Genética de Chile III Reunión Anual de La Sociedad Chilena de Evolución.
- Galleguillos R., Chong J., Oyarzún C., Oliva M. & Roa R. 1996. Unidades de stock en los recursos sardina común y anchoveta de la zona centro-sur. Informe Final Proyecto FIP 94-20. In: p. 64. Universidad Católica de la Santísima Concepción, Talcahuano.
- Galleguillos R, Canales-Aguirre CB, Ferrada S. 2012. Genetic variability in jack mackerel *Trachurus murphyi* Nichols: New SSRs loci and application/ Variabilidad genética en jurel (*Trachurus murphyi* Nichols): Nuevos loci SSRs y aplicación. *Gayana* 76:67.

- Gelman A, Carlin JB, Stern HS, Rubin DB. 2014. Bayesian data analysis. Chapman & Hall/CRC Boca Raton, FL, USA.
- Gilbert KJ, Andrew RL, Bock DG, Franklin MT, Kane NC, Moore JS, Moyers BT, Renaut S, Rennison DJ, Veen T, Vines T. 2012. Recommendations for utilizing and reporting population genetic analyses: the reproducibility of genetic clustering using the program STRUCTURE. *Molecular Ecology*. 1-6.
- Grant WS, Bowen BW. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes. Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89: 415-426.
- Guillot, G. 2008. Inference of structure in subdivided populations at low levels of genetic differentiation—the correlated allele frequencies model revisited. *Bioinformatics*, 24(19), 2222-2228.
- Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F., Cosson, J.F., 2005a. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170, 1261–1280.
- Guillot, G., Mortier, F. & Estoup, A. 2005b. Geneland: A program for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5: 712-715.
- Hancock, JM. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En *Microsatellites: Evolution and Applications* (Goldstein, D. B. & Schlötterer, eds) Oxford University Press, Oxford, 1-9.
- Hernández, A., 1994. Variabilidad de caracteres morfométricos y merísticos de anchoveta *Engraulis ringens* Jenyns (1842) y sardina común *Strangomera bentincki* (Norman, 1936), y su aplicación a la identificación de stocks. Seminario para optar al título de Biología Marina. Univ. Universidad de Concepción.
- Hernández E. H., Castro L. R. & others. 2000. Larval growth of the anchoveta *Engraulis ringens* during the winter spawning season off central Chile. *Fishery Bulletin* 98.
- Hewitt G.M. 2000. The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature*, 405, pp. 907-913.
- Hunter, A., Speirs, D., and Heath, M. 2015. Fishery-induced changes to age and length dependent maturation schedules of three demersal fish species in the Firth of Clyde. *Fisheries Research*, 170:14–23.
- Janes JK, Miller JM, Dupuis JR, Malenfant RM, Gorrell JC, Cullingham CI, Andrew RL. 2017. The $K = 2$ conundrum. *Molecular Ecology*. 26: 3594-3602.
- Jarne P. & Lagoda. J. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11:424–429.

- Jordan, R., 1980. Biology of the anchoveta. I: Summary of the present knowledge, in: Proceedings of the Workshop on the Phenomenon Known as “El Niño.” UNESCO, Paris. pp. 249–278.
- Karanja, J., Amugune, N. O., Ininda, J., Kimatu, J. N., Danson, J. W., 2009. Microsatellite analysis of the correlation between molecular and morphological traits in assorted maize inbred lines. *African Crop Science Journal*. 3, 133-144.
- Laikre L, Palm S, Ryman N. 2005. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 34:111–119.
- Larsson LC, Laikre L, Palm S, André C, Carvalho GR, Ryman N. 2007. Concordance of allozyme and microsatellite differentiation in a marine fish, but evidence of selection at a microsatellite locus. *Molecular Ecology* 16:1135–1147.
- Lecomte F., Grant W., Dodson J., Rodríguez-Sánchez R. & Bowen B. 2004. Living with uncertainty: genetic imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Molecular Ecology* 13: 2169–2182.
- Lin L., Zhu L., Liu S., Su Y. & Zhuang Z. 2010. Polymorphic microsatellite loci for the Japanese anchovy *Engraulis japonicus* (Engraulidae). *Genetics and Molecular Research* 10(2): 764-768.
- Liu, J., Tian-Xiang, G., Zhi-Meng, Z., Xian-Shi, J., Koji, Y & Z. Ya-Ping. 2006. Late pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40:712-723.
- Lombarte, A. 1990. Efectos ambientales y fitogenéticos en la morfología del laberinto auditivo de los peces teleósteos. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, 335 pp.
- Machado G. 2009. Estructura genética de poblaciones de merluzas americanas y trazabilidad de productos pesqueros. Memoria Universitaria. Universidad de Oviedo.
- Mank, J. E., & Avise, J. C. 2004. Individual organisms as units of analysis: Bayesian-clustering alternatives in population genetics. *Genetical research*, 84(03), 135-143.
- Medina M, Herrera L, Castillo J, Jaque J, Pizarro N. 2015. Alimentación de la anchoveta (*Engraulis ringens*) en el norte de Chile (18°25′-25°40′S) en diciembre de 2010. *Latin American Journal of Aquatic Research* 43:46-58 DOI 10.3856/vol43-issue1-fulltext-5.
- Meneses D., de Oliveira L. A., Fernandes T. M. & Garcia M. 2010. Comparative study on the use of specific and heterologous microsatellite primers in the stingless bees *Melipona rufiventris* and *M. mondury* (Hymenoptera, Apidae). *Genetics and Molecular Biology* 33: 390–393.

- Niklitschek E. J., Toledo P., Hernández E., Nelson J., Soule M., Herranz C., Murillo C. & Valenzuela X. 2009. Identificación y evaluación hidroacústica de pequeños pelágicos en aguas interiores de la X y XI regiones, año 2007. Informe Final Proyecto FIP 2007-05. In: p. 136. Universidad Austral de Chile, Centro Trapananda, Coyhaique, Chile.
- Oliva, M., 1999. Metazoan Parasites of the jack mackerel *Trachurus murphyi* Nichols, 1920 (Teleostei, Carangidae) in a latitudinal gradient from South America (Chile and Perú). *Parasites*. 6 (3), 223-230.
- Palumbi S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 25, pp. 547-572.
- Pauly D. 1987. The Peruvian anchoveta and its upwelling ecosystem: three decades of change. *WorldFish*.
- Pauly, D., Graham, W., Libralato, S., Morissette, L., Palomares, M.L.D., 2009. Jellyfish in ecosystems, online databases, and ecosystem models. *Hydrobiologia* 616, 67–85.
- Peakall, R. and Smouse P.E. 2012. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Pikitch, E., Boersma, P.D., Boyd, I.L., Conover, D.O., Cury, P., Essington, T., Heppell, S.S., Houde, E.D., Mangel, M., Pauly, D., 2012. Little fish, big impact: managing a crucial link in ocean food webs. *Lenfest Ocean Program*, Washington, DC 108.
- Pizarro J, Docman F, Harrod C. 2019. Clarifying a trophic black box: stable isotope analysis reveals unexpected dietary variation in the Peruvian anchovy *Engraulis ringens*. *PeerJ*.7:e6968 <http://doi.org/10.7717/peerj.6968>.
- Plaza G, Hernandez A, Contreras J, Rodriguez C. 2018. Análisis de la microestructura de otolitos (AMO). In *Determinación de unidades poblacionales de anchoveta (Engraulis ringens) en Chile*. Informe Final Proyecto FIPA 2015-22. 224 pp.
- Pometti CL, Bessega CF, Saidman BO, Vilardi JC. 2014. Analysis of genetic population structure in *Acacia caven* (Leguminosae, Mimosoideae), comparing one exploratory and two Bayesian-model-based methods.
- Pritchard J. K., Stephens M. and Donnelly P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945–959.
- Pritchard JK, Wen W, Falush D. 2007. Documentation for STRUCTURE software: Version 2.2, Available from <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>.
- Raftery, A.E. 1996. Hypothesis testing and model selection. In *Markov Chain Monte Carlo in Practice* (W.R. Gilks, D.J. Spiegelhalter and S. Richardson, eds.), London: Chapman and Hall, pp. 163--188.

- Rambaut A, Suchard MA, Xie D & Drummond AJ. 2014. Tracer v1.6, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Rico C, Ibrahim KM, Rico I, Hewitt GM .1997. Stock composition in North Atlantic populations of whiting using microsatellite markers. *Journal of Fish Biology* 51:462–475.
- Rojas D. 2010. Evaluación de marcadores moleculares ILPs y STRs heterólogos en *Engraulis ringens*. Universidad Mayor de San Marcos, Lima. 104 pp.
- Ruggeri P., Splendiani A., Occhipinti G., Fioravanti T., Santojanni A., Leonori I., De Felice A., Arneri E., Procaccini E., Catanese G., Tičina V., Bonanno A., Nisi P., Giovannotti M., Stewart W. & Caputo V. 2016. Biocomplexity in Populations of European Anchovy in the Adriatic Sea. *PLoS ONE* 11(4): 1-21.
- Ryman N, Jorde PE . 2001. Statistical power when testing for genetic heterogeneity. *Molecular Ecology*, 10, 2361-2373.
- Ryman N, Palm S .2006. POWSIM: a computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. *Molecular Ecology Notes*, 6, 600-602.
- Ryman N, Palm S, André C et al. 2006. Power for detecting genetic divergence: differences between statistical methods and marker loci. *Molecular Ecology*, 15, 2031-2045.
- Ryther JH. 1969. Photosynthesis and fish production in the sea. *Science* 166:72-76 DOI 10.1126/science.166.3901.72.
- Selkoe K. A. & Toonen R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters* 9: 615–629.
- Serra, J.R., Gil, E., 1975. Marcación de anchoveta en la zona norte de Chile. Metodología y resultados preliminares. *Rev. Com. Perm. Pacífico Sur* 3–19.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139, 457-462.
- Spanakis E., Tsimenides N. & Zoures E. 1989. Genetic difference between populations of sardine *Sardina pilchardus*, and anchovy *Engraulis encrasicolus*, in the Aegean and Ionian seas. *Journal of Fish Biology* 35: 365–378.
- Subpesca 2019. Estado de situación de las principales pesquerías chilenas, año 2018. In: p. 100. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Chile.
- Tautz, D. y C. Schlotterer. 1994. Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development*. 4: 832-837.
- Turan, C., 2004. Stock identification of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) using morphometric and meristic characters. *Journal of Marine Science*. 61, 774-781.

- Utne-Palm, A.C., Salvanes, A.G. V, Currie, B., Kaartvedt, S., Nilsson, G.E., Braithwaite, V.A., Stecyk, J.A.W., Hundt, M., Van der Bank, M., Flynn, B., 2010. Trophic structure and community stability in an overfished ecosystem. *Science* (80-.). 329, 333–336.
- Valdivia, I.M., Chávez, R.A., Oliva, M.E., 2007. Metazoan parasites of *Engraulis ringens* as tools for stock discrimination along the Chilean coast. *J. Fish Biol.* 70, 1504–1511.
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W., Wills, D & Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535– 538.
- Vanhala, T., M. Tuiskula-Haavisto, K. Elo, J. Vilkki y A. MakiTanila. 1998. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poultry Science*. 77: 783-790.
- Vicenzi, S., Mangel, M., Crivelli, A. J., Munch, S., and Skaug, H. J. 2014. Determining individual variation in growth and its implication for life-history and population processes using the Empirical Bayes method. *PLoS Computational Biology*, 10: e1003828.
- Wahlund S. 1928. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* 11:65–106.
- Wang I. J. 2010. Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography. *Molecular Ecology* 19: 2605–2608.
- Ward R. D, Woodwark M., Skibinski D. O. F. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*. 44(2): 213-232.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370.
- Whitehead P. J. P., Nelson G. J. & Wongratana F. 1988. FAO species catalogue: Vol. 7: clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei): an annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings: Part 2: *Engraulidae*. FAO Fish. Synop. (125) 7: 305–579.
- Yáñez, E., Barbieri, M.A., Santillán, L., 1992. Long-term environmental variability and pelagic fisheries in Talcahuano, Chile. *South African J. Mar. Sci.* 12, 175–188.
- Yu HT, Lee YJ, Huang SW, Chiu TS. 2002. Genetic Analysis of the populations of Japanese Anchovy (*Engraulidae*: *Engraulis japonicus*) Using microsatellite DNA. *Marine Biotechnology*. 4: 471-479.
- Yu ZN, Kong XY, Guo TH, Jiang YY, Zhuang ZM, Jin XS. 2005. Mitochondrial DNA sequence variation of Japanese anchovy *Engraulis japonicus* from the Yellow Sea and East China Sea. *Fisheries Science*. 71: 299-307.

Zane L., Bargelloni L. & Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation. A review
Molecular Ecology 11: 1–16.

Zarraonaindia I., Pardo M.A., Iriondo M., Manzano C. & Estonba A. 2009. Microsatellite
variability in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) calls for further investigation of
its genetic structure and biogeography. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*
66 (10):2176-2182.



ANEXO 1

Detalles de 15 loci microsatélites polimórficos desarrollados para *E. ringens*

Ni: número de individuos analizados; NA: número de alelos observado; He y Ho: heterocigosidades esperada y observada respectivamente; PI: probabilidad de identidad para cada locus; PHW: probabilidad del test exacto para equilibrio de Hardy & Weinberg. † indican los loci que muestran desviaciones al equilibrio de H&W y En negrita se destacan los loci con posible presencia de alelos nulos.

Locus	Primer (5'-3')	Motivo	Rango (bp)	N _i	N _A	H _o	H _e	P _i	p-value (PHW)
E27	F: GCTTCTGGATGTTTTAGAT R: AACACTATCTGACAACACTGACA	(TGTC)6	149-257	44	4	0.455	0.513	0.347	0.833
E39	F: GTTGTGAGAAGCTTTAGTCA R: GATAAGAAATACACAGGAAAG	(TTTCC)5	143-193	44	10	0.636	0.829	0.048	0.032
E6	F: TGGGTTGATAAATAGACTAGA R: AGTATTAACACTTGTAGGTGC	(ATGA)5	175-218	35	6	0.771	0.677	0.150	0.913
E28	F: CATGGTTTTAAATCTGTGAC R: TACAAATGAGAGCAAATACA	(TTTA)6	239-297	41	12	0.854	0.857	0.036	0.972
E22	F: GTGTGTATGTTTCTTTTCAA R: TCTCTATGGGACTTTAAACATA	(CAGA)6	273-296	43	6	0.674	0.659	0.166	0.003
E45	F: ATAAAAAGTTGAGGCTGTTT R: GACTTTGAAGACAGCTGTAC	(ATTC)7	162-203	44	9	0.795	0.765	0.088	0.460
E48	F: CCAATAGTTCAGTAGTACCAG R: ACAGTAAGCTAGAGTATCCAG	(GCT)10	136-175	43	12	0.860	0.832	0.048	0.995
E49	F: ATCATTATGCTAATGTCTGC R: GGACTTTTTAGCATCAGTAT	(ACAGC)6	126-171	44	10	0.773	0.830	0.050	0.427
E50	F: GTCTAGGGGTGTAATAATAA R: TCCACTTCTATTATGTTATGG	(ATCGT)6	157-163	42	2	0.976	0.500	0.375	0.000†
E72	F: TTTTCTTTACATTAGCACAG R: AATTTGTAGTACAGCTGTGTC	(ACACAT)5	187-308	45	11	0.444	0.660	0.174	0.001
E73	F: ACTTTGAGTCTGGAATAAAGT R: CCATAGATTAGAGGACAATAA	(TGA)17	106-185	44	20	0.932	0.915	0.014	0.678
E69	F: GGCCTACATTAATAACATACT R: CTAATGTGGGAATATAGTGAG	(TAA)15	122-174	45	18	0.756	0.915	0.013	0.000†
E53	F: TGTAGAAGAAAGTGACAGAGA R: GTTTATTGGTGTGAGTCATT	(GA)17	136-235	45	33	0.822	0.943	0.006	0.033
E61	F: GAGATTTAGCAGACAGATGT R: TAGTATTCTCAACACGTAGCT	(AG)20	190-226	45	11	0.756	0.880	0.027	0.258
E35	F: CTCAGTGGAACAAGTCACT R: TAAATACATGCTTAAGAGTCC	(GCAAG)5	147-174	40	4	0.425	0.457	0.332	0.060