
Amplificación e identificación molecular del polimorfismo genético de los genes de color *Kitlg* y *Tyrp1b* en los peces de la amazonía peruana *Symphysodon aequifasciatus aequifasciatus* y *Festivus* (*Mesonauta festivus*) (Perciformes: Cichlidae)

Molecular amplification and identification of genetic polymorphism
of color genes *Tyrp1b* and *Kitlg* in the Peruvian Amazon fish
Symphysodon aequifasciatus aequifasciatus and *Festivus*
(*Mesonauta festivus*) (Perciformes: Cichlidae)

Recibido: enero 26 de 2015 | Revisado: febrero 26 de 2015 | Aceptado: marzo 30 de 2015

CARLOS SCOTTO¹
MARÍA CRISTINA MIGLIO²
ELSA VEGA²
BEATRIZ ANGELES²

ABSTRACT

The goal of this research was the removal of non invasive nuclear DNA from gill tissue in Amazonian species *Disco* (*Symphysodon aequifasciatus aequifasciatus*) and *Festivus* (*Mesonauta festivus*). The PCR amplification and molecular analysis of genetic polymorphism of the color genes *Tyrp1* and *Kitlg* using restriction enzymes was achieved. It was possible to amplify the gene sequence *Kitlg* (band approximately 1400 bp), but it was not possible to amplify the sequence of *Tyrp1* gene for any studied species. It was identified a cleavage site in the sequence of *Kitlg* gene in *Disco* fish with the restriction enzyme *Mse I* from 200 to 300 bp and a band of about 500 to 1000 bp with the restriction enzyme *Xho I*. It was not possible to identify any cut site in the *Kitlg* gene sequence with any of the restriction enzymes tested in fish *Festivus* identified.

Keywords: *Symphysodon*, *Mesonauta*, Polymorphism, *Kitlg*, *Tyrp1b*, Amazon fish.

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo principal la extracción de ADN nuclear no invasivo de tejido branquial en los peces amazónicos *Disco* (*Symphysodon aequifasciatus aequifasciatus*) y *Festivus* (*Mesonauta Reaccfestivus*), evitando producir daño al pez o su muerte. Se logró la amplificación molecular por Reacción en cadena de la polimersa (PCR) y el análisis del polimorfismo genético de los genes de color *Kitlg* y *Tyrp1b* mediante el uso de enzimas de restricción. La amplificación de la secuencia del gen *Kitlg* permitió obtener una banda de 1400 pb aproximadamente. No fue posible amplificar la secuencia del gen *Tyrp1* para ninguna de las dos especies. Se identificó un sitio de corte en la secuencia del gen *Kitlg* en la enzima de restricción *Mse I* en peces *Disco* de 200 a 300 pb, y una banda de aproximadamente 500 a 1000 pb con la enzima de restricción *Xho I*. No se logró identificar ningún sitio de corte en la secuencia del gen *Kitlg* con ninguna de las enzimas de restricción analizadas en peces *Festivus*.

Palabras clave: *Symphysodon*, *Mesonauta*, Polimorfismo, *Kitlg*, *Tyrp1b*, peces amazónicos.

1 Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad Nacional Federico Villarreal, Calle Río Chepén s/n. El Agustino. Lima -Perú. Email: carlosscottoespinoza@gmail.com

2 Facultad de Pesquería. Universidad Nacional Agraria La Molina. Avenida La Molina s/n. La Molina. Lima – Perú. Email: bangeles@lamolina.edu.pe

Introducción

Entre los grupos de peces ornamentales más cotizados se encuentran los cíclidos. Estos peces se encuentran distribuidos por todo el mundo, y destacan por su belleza y colorido entre los cíclidos sudamericanos. Esto último, debido a la influencia de los factores medioambientales adquirió formas diferentes, algunos de ellos, como los discos y festivos, una forma circular o alargada pero lateralmente comprimida. De este tipo de peces son los Discos los que gozan de mayor preferencia en el aspecto ornamental, por presentar una mayor intensidad en tonos y colores (Carvalho, 1993; Kullander, 1986). Actualmente, la reproducción en cautiverio del pez Disco se viene realizando principalmente en países en los cuales este pez no es originario. Así por ejemplo, en Tailandia y Singapur existen grandes centros de cultivo de estos peces. También podemos encontrar centros reproductores en Alemania, España, Estados Unidos, México y Argentina que en menor escala también ofrecen variedades de este pez ornamental (Valdivieso, 2000).

En el Perú, país originario de este cíclido solo se han tenido reportes aislados de criadores en cuanto a su reproducción, no figurando en ningún caso como productor y proveedor de una determinada variedad desarrollada en el Perú. Además, los discos que son exportados, no son comercializados, sino son empleados para realizar cruces con variedades ya mejoradas, con la finalidad de aumentar la variabilidad genética en los híbridos y evitar la degeneración de las líneas obtenidas (Bailly, 1999). De esta manera la riqueza genética existente en nuestro país viene siendo aprovechada y explotada en otros países, los cuales iniciaron diversos estudios de mejoramiento genético, selección y estudios de biodiversidad en los cíclidos ornamentales, siendo necesario la promoción de centros de producción artificial de semilla de esta y otras especies de importancia comercial (Goldin, 2000).

Al poder obtener individuos con mejores rasgos fenotípicos utilizando técnicas moleculares que identifiquen genes de interés como es el caso de los genes de color de peces, se podría incrementar el valor agregado de varias de nuestras especies nativas ornamentales con alto potencial para las exportaciones. Así mismo, se evitaría la erosión genética por su sobreexplotación al reproducirse en cautiverio e iniciar programas de mejoramiento genético para la obtención de líneas comerciales. Este trabajo tiene como objetivo la amplificación e identificación molecular del polimorfismo genético de los genes de color *Kitlg* y *Tyrb1b* en el pez Disco (*Symphysodon aequifasciatus aequifasciatus*) y el pez Festivo (*Mesonauta festivus*), que permitan dar las bases genético-moleculares sobre las cuales se puedan iniciar diversos estudios referidos a la potenciación de la acuicultura ornamental, su mejoramiento genético por selección y estudios de biodiversidad ictícola en el Perú.

Materiales y Métodos

Los peces fueron seleccionados de un stock de 30 peces Disco (*Symphysodon aequifasciatus*) y 40 Festivos (*Mesonauta festivus*) obtenidos de Iquitos, aclimatados en el Centro de Investigación Piscícola (CINPIS) de la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria La Molina. La extracción de ADN, procesamiento de muestras y amplificación molecular se desarrolló en el Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal (Lima, Perú).

Material biológico

Para el análisis inicial para la estandarización de la técnica de extracción de ADN se utilizó una población inicial de nueve ejemplares de Discos (*Symphysodon aequifasciatus*) (Figura 1) y nueve ejemplares de Festivos (*Mesonauta festivus*) (Figura 2), los cuales fueron adquiridos en la ciudad de Iquitos y

trasladados y aclimatados por un periodo de seis a ocho semanas en condiciones de cautiverio.

Procesamiento de las muestras

Extracción de ADN

Se utilizó el Protocolo de extracción de ADN de peces modificado de Lopera-Barreto (2008) para lo cual se extrajo sangre periférica por raspado branquial (Figura 3). Se detalla a continuación el procedimiento seguido.

- Se colocó cada espécimen con mucho cuidado sobre una superficie mojada con agua de pecera en una Placa Petri grande.
- Se levantó la branquia con una aguja fina y se raspó ligeramente la branquia rojiza para poder absorber la sangre periférica.
- La muestra de sangre se agregó en tubos eppendorf de 1.5 ml. conteniendo 550ul de solución de lisis.
- Se calentó las muestras a 80°C por cinco minutos sin dejar hervir las muestras.
- Se agregó 500 ml de Acetato de Sodio 3 M.
- Se mezcló las muestras por inversión, no Vortex.
- Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos.
- Se agregó 400 ul de la mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1).
- Se separó en un nuevo tubo eppendorf el sobrenadante.
- Se agregó 500 ul de etanol absoluto helado.
- Se centrifugó por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.

- Se dejó secar el ADN a temperatura ambiente por 18 horas.
- Luego se resuspendió en buffer TE para su análisis final y añadir NaCl a una concentración final de 100mM.
- Se añadió RNAasa a una concentración de 100 ug/mL, se incubó por 3 horas a 37°C y por último se almacenó las muestras a -20°C.

Preparación del gel de agarosa y sembrado de muestras

- Se disolvió la agarosa al 0.8% en un beaker mediante calor en una coccinilla eléctrica.
- Se preparó la cámara electroforética con sus peines respectivos.
- Se vació la agarosa disuelta en la cámara electroforética.
- Se esperó hasta que se endurezca el gel de agarosa (gelificación) y se sacaron los peines.
- Se llenó con el Buffer de Corrida hasta que cubra el gel de agarosa.
- Se sembró cada muestra en los pocillos del gel de agarosa.
- Se conectó la cámara electroforética a la fuente de poder a 220V.
- Se dio el final de la corrida electroforética.
- Se realizó la tinción del gel de agarosa con Bromuro de Etidio.
- Se visualizó el gel de agarosa en el transiluminador UV

Determinación de la integridad del ADN purificado

Se realizó la cuantificación del ADN purificado mediante la comparación en una corrida electroforética con un marcador de peso

molecular para ADN, donde la concentración de este era conocida. Se corrieron las muestras de ADN en un gel de agarosa al 0.8% junto con el Marcador de Peso Molecular de 100pb o DNA ladder de 15 fragmentos: 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 para poder determinar la integridad (solo una banda) y la concentración del ADN purificado de cada espécimen (Figura 4).

Diseño de primers de los genes Kitlg y Tyrp1

La secuencia de los primers fue para el Gen Kitlg (Sense Primer: CACCTGCTGCCCATCACCTA, Antisense Primer: AAATCCTGGGCCTTCATGAG). Y para el Gen Tyrp1 (Sense Primer: GAGTGAGTGAAAGAGTGGGT, Antisense Primer: CTCTTTTCTCATCGGCAGAC).

Las secuencias analizadas para construir los primers para los dos genes se obtuvieron del GenBank.

Respecto a la amplificación de las secuencias de los genes Kitlg y Tyrp1 por PCR se realizó el siguiente procedimiento:

- Para la amplificación de cada secuencia de los genes Kitlg y Tyrp1 se colocó en un tubo eppendorf esterilizado los siguientes volúmenes de reactivos en frío: 6ul de ADN (10 ng/ul), 4ul de Buffer (5X), 0.5ul de dNTPs (10ng/ml), 0.5ul de Primer 1 y 2, 0.03ul de Taq, 8.5ul de agua destilada. Volumen final 20ul.
- Se colocó las muestras en el termociclador y se procedió con el amplificado.
- Los parámetros utilizados para cada reacción de amplificación por PCR fueron: Desnaturalización (94°C x 95 segundos), Alineación (65°C x 55 segundos) y Extensión (72°C x 1 minutos y 10 segundos). Número total de ciclos = 35.

- Los primers fueron diseñados utilizándose la información obtenida en el GenBank de Internet de acceso libre así como de publicaciones relacionadas a los genes Kitlg y Tyrp1. Además, se utilizó el siguiente programa de computación Oligo 7 primers Analyser (Emrich *et al.*, 2003; Rychlik, 2007).

Digestión con enzimas de restricción de las secuencias amplificadas

La amplificación se realizó a un volumen de reacción de 50 uL. Volumen y cantidad de ADN necesario para poder realizar posteriormente la digestión de este ADN amplificado con enzimas de restricción. Previamente el ADN amplificado se corrió en una pequeña muestra de 5 ul en un gel de agarosa al 1%, para poder determinar la concentración aproximada del ADN a utilizar. Los pasos fueron los siguientes:

- En un tubo eppendorf se colocó el siguiente mix de reacción de digestión para todas las enzimas de restricción utilizadas: Producto de amplificación (10ul), Buffer 10X (2ul), Enzima de restricción (3ul), Agua libre de nucleasas (17ul). Volumen final de 30 ul.
- Se digirió el ADN amplificado con las siguientes enzimas de restricción: Xho I, Nhe I, Sph I y Mse I.
- Se incubó en incubadora a 37°C por 2 horas.
- Se realizó una electroforesis de agarosa al 1% para poder observar y determinar los tamaños de los fragmentos amplificados digeridos.

Resultados

En la Figura 5 se observan los resultados de las corridas electroforéticas para los amplificados por PCR para el gen Kitlg. Se obtuvo una banda amplificada de 1400 pb que era el tamaño esperado de acuerdo a la única

secuencia de pez disponible para éste gen en el GenBank, todas las muestras amplificaron tanto para Discos como para Festivus.

En la Figura 6 se aprecian los resultados de las corridas electroforéticas para los amplificados por PCR para el gen *Tyrp1*. Ninguna muestra amplificó para este gen ni para peces Discos ni para Festivus. Se esperaba una banda de aproximadamente entre 300 a 500 pb basados en la única secuencia disponible para pez Cebra en el GenBank.

Se realizó la digestión con enzimas de restricción solo para la secuencia de *Kitlg* debido a que fue la única que amplificó.

En la Figura 7 se puede observar una banda de aproximadamente entre 200 a 300 pb al ser digerida con la enzima de restricción *Mse I*, y una banda menos definida entre 500 a 1000 pb de longitud al ser digerida con *Xho I*. Para el resto de enzimas de restricción no se encontró ningún sitio de restricción. Además, solamente una de las muestra de Discos presentó este sitio de corte. Ningún Festivus presentó sitio de corte con las enzimas de restricción utilizadas.

Discusión

Los peces Discos y Festivus son importantes para la pesca de subsistencia y comercial en el Perú. Sin embargo, son pocos los trabajos que han sido elaborados hasta el momento con el fin de conocer sus preferencias ambientales, su explotación pesquera y el flujo genético de sus poblaciones. El conocimiento de la dinámica de las poblaciones es importante al momento de elaborar planes de manejo pesquero, acuicultura y conservación (Recuperación y protección).

La familia Cichlidae es uno de los mayores grupos de peces teleósteos (casi todos ellos de aguas continentales), que involucra alrededor de 2400 especies repartidas en Centro y Sud América, África, Madagascar y sud de Asia. Los cíclidos americanos comprenden

cerca de 550 especies (30% de la familia) y son generalmente de ambientes ribereños (Kullander, 1986). A diferencia a los cíclidos africanos habitan mayormente ambientes lacustres y solo 90-100 especies viven en los ríos. La mayor diversidad morfológica corporal de los cíclidos sud americanos contrasta con aquella de los famosos cíclidos del África, lo cual sugiere que la radiación neotropical requirió de mayor tiempo para tomar lugar que la africana. Por lo tanto, no es sorprendente ver la gran variedad de formas existentes en la región del Neotrópico (Kullander, 1998).

La variación genética del grupo africano es baja comparada al grupo neotropical, extremadamente variable a nivel genético molecular pero considerablemente inferior en número de especies (Farias *et al.*, 2000).

Existe poco conocimiento sobre la estructura genética de los cíclidos y sus variedades. Se han reportado cuatro formas salvajes de Discos: *Symphysodon* (Heckel), *S. Aequifasciata* (Verde salvaje), *S.A. Axelrodi* (Marrón salvaje) y *S.A. Haraldi* (Azul salvaje) y cinco variedades cultivadas de disco (Turquesa, Paloma, Ghost, Red azul Cobalto y Sólido). Las tres subespecies de *S. aequifasciatus* difieren uno del otro en el color y el patrón de color; *S. a. haraldi* (el Disco de color verde) posee nueve barras verticales distintas sobre un fondo verdoso o marrón claro, los individuos dominantes poseen puntos rojos en la porción ventral de su cuerpo; *S. a. aequifasciatus* (el Disco azul) posee estriaciones Azul plateadas iridiscentes en la cabeza y en la región dorsal del cuerpo. *S. a. axelrodi* (el Disco de color marrón) es un pez marrón rojizo que carece de barras verticales excepto una barra que atraviesa el ojo (Koh, *et al.*, 1999).

Un grupo de investigadores procedentes de varias universidades dirigidos por David Kingsley del Instituto Médico Howard Hughes publicaron en la revista *Cell*, piezas de la maquinaria genética de la coloración

en peces. Para el estudio utilizaron al pez *Gasterosteus aculeatus*, para comenzar a entender la base genética de los cambios de los diferentes patrones de pigmentación. Y encontraron que un gen llamado Kitlg que estaba asociado con la herencia de la pigmentación. Este gen permite la producción de una proteína que ayuda a mantener a los melanocitos -células que controlan la pigmentación. Sin embargo, existen múltiples regiones cromosómicas o genes duplicados que contribuyen a la pigmentación en peces. El Kitlg codifica receptores de factores de crecimiento epidermal que es necesario para la migración y sobrevivencia de los precursores de melanocitos. Sus mutaciones o variantes (alelos) pueden afectar la migración de los melanocitos alterando el patrón de coloración del animal. Así mismo, este gen en peces se presenta por duplicado a diferencia de los tetrápodos, lo cual puede hacer variar la expresión fenotípica del patrón cromático (Pielberg *et al.*, 2002; Hultman *et al.*, 2007).

Existen casi una docena de genes que estarían contribuyendo al patrón cromático de los peces como son: SLC24A5, Mir, Tyrp1, Sox10, Mitf, Kitlg y Ednrb. Hoy se sabe que algunas variantes del gen SLC24A4 están asociadas con el color de ojos y cabello, una variante del Kitlg está asociada con el color de cabello, dos variantes del Tyrp1 están asociadas con el color de ojos y las pecas, en humanos (Rajaraman *et al.*, 2007). Solamente el gen de Kitlg amplificó en las muestras evaluadas pudiéndose observar una banda de aproximadamente entre 200 a 300 pb al ser digerida con la enzima de restricción Mse I, y una banda entre 500 a 1000 pb de longitud al ser digerida con Xho I, logrando el objetivo de identificar algún tipo de variabilidad genética en la secuencia del gen de color Kitlg.

La gran diversidad y mercado de estas especies de cíclidos ha quedado demostrada en un estudio realizado en Singapur (Hassan *et al.*, 2002), en la cual, nuevas variedades fenotípicas de peces Discos (*Symphysodon spp.*) pueden ser obtenidas mediante los

cruces de especies naturales con las especies cultivadas por periodos largo tiempo en muchos países. Sin embargo por la diversidad genética que posee esta especie se deben desarrollar programas de mejoramiento genético específico a mediano y largo plazo para empezar a exportar nuevas variedades y preservar las variedades peruanas ya existentes. Las técnicas moleculares disponibles como la desarrollada en el presente trabajo permitirán implementar rápidamente técnicas de extracción de ADN y su caracterización molecular debido a su bajo costo y poco equipamiento de laboratorio, promoviendo el desarrollo de Programas de Mejoramiento o de Pre Mejoramiento Genético en cíclidos comerciales (Lessa, 1992).

Por otro lado, el tejido a utilizarse para estudios moleculares no debe causar la muerte del animal sobretodo si se usará como futuro reproductor. Los investigadores han utilizado muestras de escamas, tejido branquial y sangre como método no invasivo. Sin embargo, los resultados de extracción de ADN no son muy favorables del todo, porque están supeditados al tamaño del animal por edad y sexo, disponibilidad de volumen de muestra y acceso al tejido sin causar daño irreversible, estrés o muerte del animal. El presente estudio hizo una combinación de “raspado de branquias” con succión de sangre periférica obteniendo buenos resultados de cantidad ADN para ensayos moleculares sin producirle ningún tipo de daño al animal siendo un objetivo logrado en esta investigación.

Conclusiones

- Se logró estandarizar un método no invasivo para la obtención de sangre periférica branquial para la extracción de ADN de glóbulos rojos. La cantidad ADN obtenido permitió realizar ensayos moleculares de amplificación por PCR y digestión con enzimas de restricción sin producir ningún tipo de daño al animal y/o muerte.

- Se amplificó por PCR la secuencia del gen Kitlg cuya banda fue de 1000 pb aproximadamente.
- No se consiguió amplificar por PCR la secuencia del gen Tyrp1. Probablemente debido a que esta secuencia tanto para Discos como para *Festivus*, posee un región muy variable en su secuencia nucleotídica que impidieron la amplificación.
- Se encontró un sitio de corte en la secuencia del gen Kitlg con la enzima de restricción Mse I en peces Disco y cuya banda midió entre 200 a 300 pb aproximadamente. Y se identificó una banda de aproximadamente entre 500 a 1000 pb con la enzima de restricción Xho I.
- No se logró identificar ningún sitio de corte en la secuencia del gen Kitlg con ninguna de las enzimas de restricción analizadas en peces *Festivus*.
- Las poblaciones correspondientes a *Festivus*, poseen una estructuración poblacional probablemente más homogénea que la población de Discos al no encontrarse variabilidad alguna en su secuencia nucleotídica.

Agradecimiento

Agradecemos a CONCYTEC el financiamiento del proyecto N°320-2007-CONCYTEC.

Referencias

- Bailly, David. (1999). ¿Por qué reproducir el disco? Aqua Pasión. No. 2:18-19.
- Carvalho, G. R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology*. 43:53-73.
- Emrich, S., Lowe, M. & Delcher, A. (2003). PROBEmer: a web-based software tool for selecting optimal DNA oligos. *Nucleic Acids Research*. 31(13): 3746-3750.
- Farias, I. P., G., Ortí & A., Meyer. (2000). Total evidence: Molecules, morphology, and the phylogenetics of cichlid fishes. *Journal of Experimental Zoology*. 288:76-92.
- Genbank^a. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NM_001002749.1&dopt=fasta
- Genbank^b. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=159149105>
- Goldin, Carlos. (2000). *Revista Peruana de Acuicultura*. Vol.(1):8.
- Hassan, M., C., Lemaire, C., Fauvelot & F., Bonhomme. 2002. Seventeen new exon-primed intron-crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish. *Molecular Ecology*. 2:334-340.
- Hultman, K.; Bahary, N.; Zon, L & Johnson, S. 2007. Gene Duplication of the Zebrafish kit ligand and Partitioning of Melanocyte Development Functions to kit ligand a. *PLoS Genetics*. 3(1): 89-102.
- Koh, T.L., Khoo, G., Fan, L.Q. & Phang, V.P. (1999). Genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of Discus (*Symphysodon* spp.) as revealed by RAPD fingerprinting. *Aquaculture*. 173:485-497.
- Kullander, S. O. (1986). Cichlid fishes of the Amazon river drainage of Peru. Swedish Museum of Natural History. Stockholm, Sweden. p. 56.
- Kullander, S. O. (1998). A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). p. 462. In: Malabarba, L. R., R. E., Reis, R. P.,

- Vari, Z. M. S., Lucena & C. A. S., Lucena (ed.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS. Porto Alegre, Brasil.
- Lessa, E. P. 1992. Rapid surveying of DNA sequence variation in Natural populations. *Molecular Biology and Evolution*. 9(2):323-330.
- Lopera-Barrero, N.; Povh, J.; Ribeiro, R.; Gomes, P.; Jacometo, C. & Da Silva Lopes, T. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Cien. Inv. Agr.* 35(1):77-86.
- Pielberg, G.; Olsson, C.; Syvanen, A. & Andersson, L. (2002). Unexpectedly High Allelic Diversity at the *KIT* Locus Causing Dominant White Color in the Domestic Pig. *Genetics*, 160: 305–311.
- Rajaraman, S.; Davis, W.; Mahakali-Zama, A.; Evans, H.; Russell, L & Bedell, M. 2000. An Allelic Series of Mutations in the *Kit ligand* Gene of Mice. I. Identification of Point Mutations in Seven Ethylnitrosourea-Induced *KitlSteel* Alleles. *Genetics*. 162: 331–340.
- Rychlik, W. OLIGO 7 Primer Analysis Software. *Methods in Molecular Biology*, vol. 402: PCR Primer Design. Ed. Humana Press. Totowa. 2007.
- Valdivieso, V. . (2000). *Revista Peruana de Acuicultura*. Vol. (1):3-5.

Anexos



Figura 1. Ejemplar de Disco (*Symphysodon aequifasciatus*) utilizado en la extracción de ADN.



Figura 2. Ejemplar de Festivus (*Mesonauta festivus*) utilizado en la extracción de ADN.

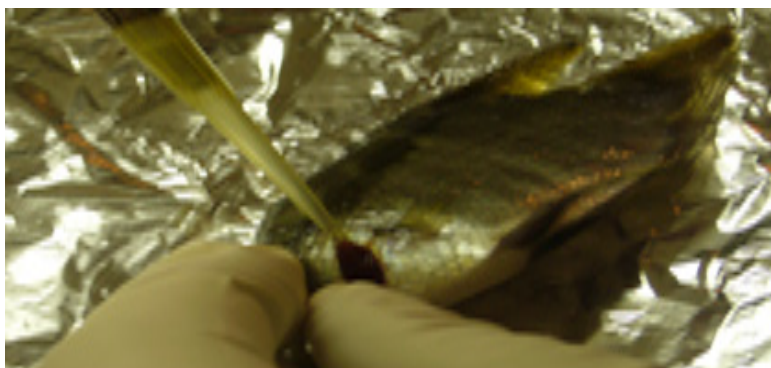


Figura 3. Ejemplar de Festivus con la branquia abierta y succión de la sangre del tejido de la agalla.

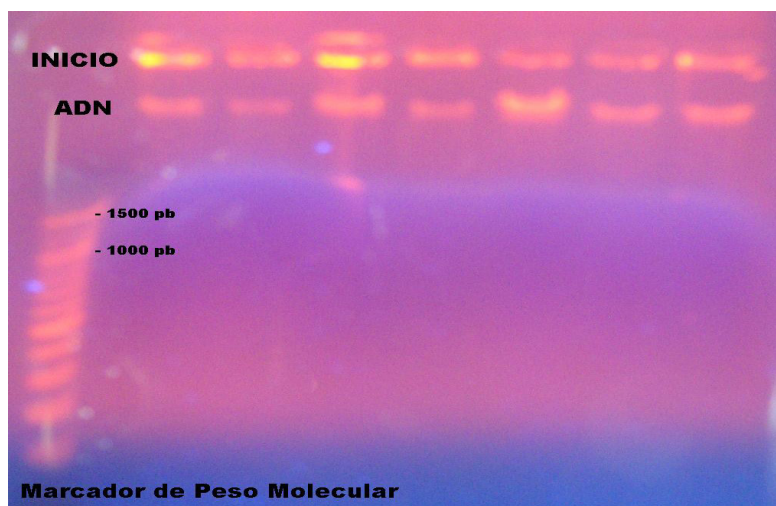


Figura 4. Determinación de la integridad del ADN purificado con una sola banda y su comparación con el marcador de peso molecular

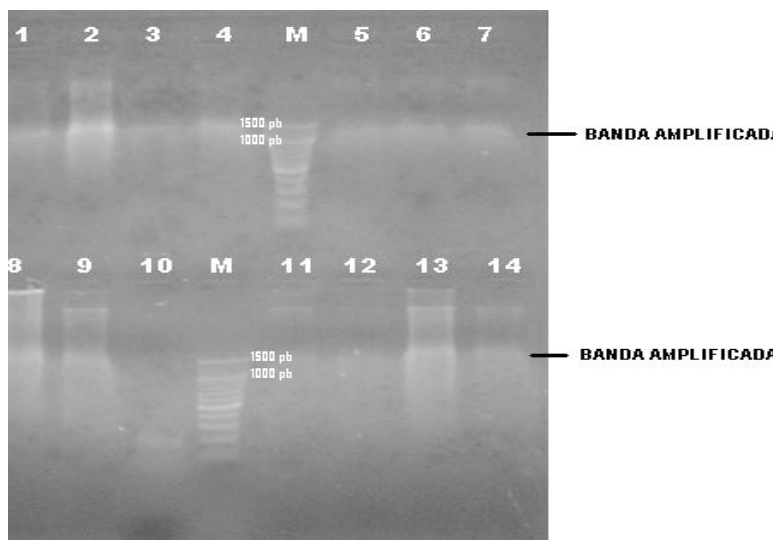


Figura 5. Amplificación por PCR de la secuencia del gen Kitlg (banda amplificada de 1000 a 1500 pb aproximadamente). Especímenes de peces Discos (1 al 7) y de Festivus (8 al 14). (M = Marcador de peso molecular).

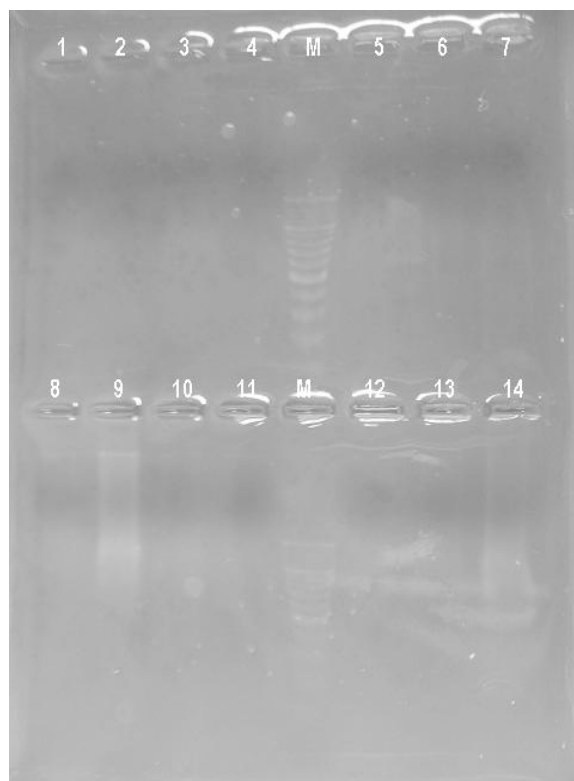


Figura 6. Amplificación por PCR de la secuencia del gen *Tyrp1* (no hubo banda amplificada). Especímenes de Discos (1 al 7) y de *Festivus* (8 al 14). (M = Marcador de peso molecular).

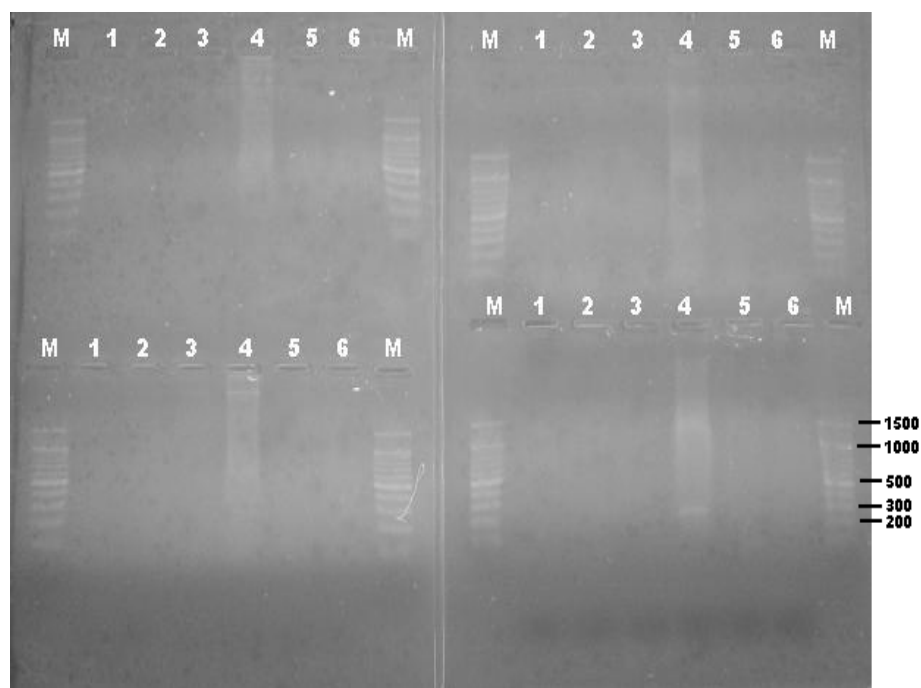


Figura 7. Digestión con enzimas de restricción de la secuencia del gen *Kitlg* con cuatro enzimas de restricción: *Nhe* I (Superior izquierdo), *Xho* I (Inferior izquierdo), *Sph* I (Superior derecho) y *Mse* I (Inferior derecho). Especímenes de *Festivus* (1, 2 y 3) y de Discos (4, 5 y 6). (M = Marcador de peso molecular).