

**EMPLEO DE MICROSATÉLITES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA  
VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA SEMILLA DE *Penaeus vannamei*  
PRODUCIDA EN COLOMBIA**

XENIA MARGARITA CARABALLO ORTIZ

UNIVERSIDAD DEL NORTE  
FACULTAD DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
2010

**EMPLEO DE MICROSATÉLITES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA  
VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA SEMILLA DE *Penaeus vannamei*  
PRODUCIDA EN COLOMBIA**

XENIA MARGARITA CARABALLO ORTIZ

Director(es)

Dra. Marcela Salazar  
Directora Científica CENIACUA

Dr. Carlos Silvera  
Profesor Maestría Ciencias Básicas Biomédicas

UNIVERSIDAD DEL NORTE  
DIVISIÓN SALUD  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BARRANQUILLA - COLOMBIA

2010



Nota de aceptación

---

Presidente del Jurado

---

Jurado \_\_\_\_\_

Jurado \_\_\_\_\_

Barranquilla (día, mes año)

*A DIOS que me ha dado la vida y fortaleza para terminar este trabajo, a mi familia, en especial a Marlon, y a mi mamá Josefina por apoyarme y por estar ahí cuando más los necesité. A mi papá Antonio (q.e.p.d) quien siempre se sintió orgulloso de que cumpliera mis metas personales y profesionales.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por brindarme la oportunidad de realizar estos estudios. A mis hermanos, a mi mamá y en especial a mi esposo Marlon por su comprensión, paciencia, y apoyo.

A la Dra. Marcela Salazar le agradezco sus comentarios y opiniones gracias por su incondicional apoyo, correcciones y los consejos que me brindo durante estos años de estudio.

Al Dr. Carlos Silvera por su guía y cooperación durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Sara Patricia Bonilla sin la cual este objetivo no hubiese sido realizable  
A todos mis compañeros de trabajo, agradezco a todos ustedes por los favores recibidos.

A CENIACUA y al sector camaronero en especial a Jorge Hernán Restrepo y Ricardo Riaño por facilitarnos las muestras para realizar este trabajo.

Al Ministerio de Agricultura de Colombia por la cofinanciación de este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
GLOSARIO	
1. INTRODUCCIÓN .....	18
1.1. ACUICULTURA Y CAMARICULTURA .....	18
1.2. CAMARICULTURA EN COLOMBIA .....	19
1.3. MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL <i>P. VANNAMEI</i> .....	23
1.4. VARIABILIDAD GENÉTICA .....	25
2. MARCO TEÓRICO .....	28
2.1. MORFOLOGÍA DEL CAMARÓN.....	28
2.2. GENÉTICA Y PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO.....	29
2.3. MARCADORES MOLECULARES .....	35
2.3.1 RAPD (Randomly amplified Polymorphic DNA).....	35
2.3.2 RFLP (Restriction fragment length Polymorphisms) .....	36
2.3.3 Microsatélites .....	37
2.3.3.1 Características de los microsatélites .....	43
2.3.3.2 Clasificación de los microsatélites .....	44
2.3.3.3 Aplicaciones de los microsatélites .....	45
2.3.3.4 Limitaciones de los microsatélites .....	47
2.4. ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA.....	48
2.4.1 Calculo de frecuencias genotípicas .....	49
2.4.2 Cálculo de frecuencias alélicas .....	50
2.4.3 Ley de Hardy -Weinberg: .....	52
2.4.3.1 Desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg .....	53
2.4.3.2 Tests de significancia de la desviación.....	55
2.4.3.3 Flujo de Genes o Migración .....	56
2.4.3.4 Deriva genética.....	56
2.5 DIVERGENCIA GENÉTICA ENTRE POBLACIONES .....	58
2.5.1 F-estadísticos ( $F_{IT}$ , $F_{ST}$ , y $F_{IS}$ ).....	58
2.5.1.1 $F_{IS}$ .....	58
2.5.1.2 $F_{IT}$ .....	59
2.5.1.3 $F_{ST}$ .....	59
3. OBJETIVOS.....	60

3.1 OBJETIVO GENERAL.....	60
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	61
4.1 TIPO DE ESTUDIO .....	61
4.2 POBLACIÓN DE REFERENCIA .....	61
4.3 MUESTRA .....	62
4.3.1 Animales de los programas de selección masal. ....	62
4.3.2 Animales del programa de selección familiar e individual. ....	62
4.3.3. Diseño del Muestreo.....	63
4.4. Estandarización de la extracción y purificación de ADN. ....	63
4.4.1. Extracción de ADN usando el sistema de Clontech (Nucleospin).....	64
4.4.2 Extracción de ADN usando isotiocianato de guanidio .....	65
4.5 Genotipificación.....	66
4.5.1 Selección de los microsatélites.....	66
4.5.2 Amplificación de los microsatélites .....	68
4.5.3 Detección de los productos amplificados.....	70
4.5.4 Procedimiento para la detección de los productos amplificados .....	70
4.4.4.1 Montaje y polimerización del gel de poliacrilamida .....	70
4.5.4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida. ....	71
4.5.4.3 Análisis y asignación de alelos .....	72
4.6 Procesamiento de datos .....	72
5. RESULTADOS .....	74
5.1 EXTRACCIÓN DE ADN, CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN Y	
DETECCIÓN .....	74
5.1.1 Extracción de ADN (sistema de clontech) .....	74
5.1.2 Condiciones de amplificación.....	75
5.1.3 Condiciones de detección .....	77
5.2 ANÁLISIS GLOBAL DE LOS MICROSATÉLITES.....	79
5.2.1 Microsatélites polimórficos .....	79
5.2.2 Heterocigosidad observada y esperada .....	81
5.2.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg .....	81
5.3. ANÁLISIS POR POBLACIÓN.....	82
5.3.1 Selección masal Caicsa: .....	82
5.3.1.1 Locus polimórficos.....	82
5.3.1.2 Heterocigosidad observada y Esperada .....	83
5.3.1.3 Equilibrio de Hardy Weinberg .....	84
5.3.2 Selección masal Tigua.....	85
5.3.2.1 Locus polimórficos .....	85
5.3.2.2 Heterocigosidad observada y esperada .....	85
5.3.2.3 Equilibrio de Hardy Weinberg .....	86
5.3.3 Selección Familiar Lote 17 .....	87

5.3.3.1 Locus polimórficos .....	87
5.3.3.2 Heterocigosidad observada y esperada .....	87
5.3.3.3 Equilibrio de Hardy Weinberg .....	88
5.3.4 Selección Familiar Lote 18 .....	89
5.3.4.1 Locus polimórficos .....	89
5.3.4.2 Heterocigosidad Observada y Esperada .....	89
5.3.4.3 Equilibrio de Hardy Weinberg .....	90
5.3.5 Selección Familiar Lote 19 .....	91
5.3.5.1 Locus polimórficos .....	91
5.3.5.2 Heterocigosidad observada y Esperada .....	91
5.3.5.3 Equilibrio de Hardy Weinberg .....	92
5.4 Análisis del F-estadístico .....	93
5.4.1 $F_{IS}$ . Coeficiente de consanguinidad.....	93
5.4.1.1 $F_{IS}$ . Coeficiente de consanguinidad en la población de selección masal Caicsa.....	93
5.4.1.2. $F_{IS}$ . Coeficiente de consanguinidad en la población de selección masal Tigua.....	94
5.4.1.3. $F_{IS}$ . Coeficiente de consanguinidad en la población de selección familiar Lote 17 .....	95
5.4.1.4 $F_{IS}$ . Coeficiente de consanguinidad en la población de familiar Lote 18.....	96
5.4.1.5 $F_{IS}$ . Coeficiente de consanguinidad en la población de selección familiar Lote 19 .....	97
5.4.1.6 $F_{IS}$ en los locus microsatélites para todas las poblaciones .....	98
5.4.1.7 $F_{IS}$ en cada una de las poblaciones .....	99
5.4.2 $F_{ST}$ . Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones .....	100
6. DISCUSIÓN.....	102
7. CONCLUSIONES .....	108
8. RECOMENDACIONES .....	110
9. BIBLIOGRAFÍA.....	112
ANEXOS.....	129



## LISTA DE TABLAS

		<b>Pág.</b>
Tabla 1.	Tipos de microsatélites.....	45
Tabla 2.	Fechas de muestreos y pesos de los individuos en cada población.....	63
Tabla 3.	Características de los microsatélites seleccionados para la caracterización de la variabilidad genética del camarón <i>Penaeus vannamei</i> .....	67
Tabla 4.	Reactivos y concentraciones utilizados para la amplificación por PCR del microsatélite 1758 .....	68
Tabla 5.	Reactivos y concentraciones utilizados para la amplificación por PCR del microsatélite 535, 538, 832, 1815.....	69
Tabla 6.	Condiciones de la mezcla para la electroforesis en gel de poliacrilamida .....	72
Tabla 7.	Heterocigosidad observada y esperada en cada locus y para cada una de las poblaciones.....	82
Tabla 8.	Resumen de los datos de la Heterocigosidad observada y esperada en todos los locus en la población de selección masal Caicsa.....	84
Tabla 9.	Resumen de los datos de la heterocigosidad observada y esperada en todos los locus en la población de selección masal Tigua.....	86
Tabla 10.	Resumen de los datos de la heterocigosidad observada y esperada en todos los locus en la población de selección familiar lote 17.....	88
Tabla 11.	Resumen de los datos de la heterocigosidad observada y esperada en todos los locus en la población de selección familiar lote 18.....	90

Tabla 12.	Resumen de los datos de la heterocigosidad observada y esperada en todos los locus en la población de selección familiar lote 19.....	92
Tabla 13.	Valores de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) por locus microsatélite.....	100
Tabla 14.	Valores promedio de heterocigosidad observada y esperada en las poblaciones.....	101
Tabla 15.	Resultados de AMOVA para los locus polimórficos evaluados.....	101

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Pág.</b>
Figura 1.	Morfología del camarón <i>Penaeus vannamei</i> .....	29
Figura 2.	Polimorfismo de los microsatélites.....	39
Figura 3.	Electroforesis en gel de agarosa del producto amplificado del microsatélite 1815. Extracción de ADN con isotiocianato y nucleospin.....	74
Figura 4.	Electroforesis en gel de agarosa del producto amplificado del microsatélite 1815.....	75
Figura 5.	Electroforesis en gel de agarosa del producto amplificado del microsatélite 1758.....	75
Figura 6.	Electroforesis en gel de agarosa del producto amplificado del microsatélite 535.....	76
Figura 7.	Electroforesis en gel de agarosa del producto amplificado del microsatélite 538.....	76
Figura 8.	Electroforesis en gel de agarosa del producto amplificado del microsatélite 832.....	77
Figura 9.	Electroforesis del microsatélite 535 en el secuenciador (heterocigoto).....	78
Figura 10.	Electroforesis del microsatélite 535 en el secuenciador (homocigoto).....	78
Figura 11.	Marcador de peso molecular de 50-500 Pb.....	79
Figura 12.	Número de alelos en cada uno de los locus evaluados.....	80
Figura 13.	Valores promedio del número de alelos y número efectivo de alelos en las poblaciones .....	80
Figura 14.	Heterocigosidad observada y esperada en los locus analizados .....	81

Figura 15.	Número de alelos y número efectivo de alelos para la población de selección masal Caicsa .....	83
Figura 16.	Heterocigosidad observada y esperada en los locus microsatélites para la población de selección masal Caicsa .	84
Figura 17.	Número de alelos y número efectivo de alelos para la población de selección masal Tigua .....	85
Figura 18.	Heterocigosidad observada y esperada en los locus microsatélites para la población de selección masal Tigua ...	86
Figura 19.	Numero de alelos y numero efectivo de alelos para la población de selección familiar lote 17 .....	87
Figura 20.	Heterocigosidad observada y esperada en los locus microsatélites para la población de selección familiar lote 17	88
Figura 21.	Número de alelos y número efectivo de alelos para la población de selección familiar lote 18 .....	89
Figura 22.	Heterocigosidad observada y esperada en los locus microsatélites para la población de selección familiar lote 18	90
Figura 23.	Número de alelos y número efectivo de alelos para la población de selección familiar lote 19 .....	91
Figura 24.	Heterocigosidad observada y esperada en los locus microsatélites para la población de selección familiar lote 19	92
Figura 25.	$F_{IS}$ Coeficiente de consanguinidad en cada uno de los locus en la población de selección masal Caicsa .....	93
Figura 26.	$F_{IS}$ Coeficiente de consanguinidad en cada uno de los locus en la población de selección masal tigua .....	94
Figura 27.	$F_{IS}$ Coeficiente de consanguinidad en cada uno de los locus en la población de selección familiar Lote 17 .....	95
Figura 28.	$F_{IS}$ Coeficiente de consanguinidad en cada uno de los locus en la población de selección familiar Lote 18 .....	96
Figura 29.	$F_{IS}$ Coeficiente de consanguinidad en cada uno de los locus en la población de selección familiar Lote 19 .....	97

Figura 30.	Valores promedio de Fis en los locus microsatélites para todas las poblaciones .....	98
Figura 31.	Valores promedio de Fis en cada una de las poblaciones ....	99
Figura 32.	Diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) por locus microsatélite .....	100
Figura 33.	Dendrograma.....	101

## RESUMEN

El desarrollo de poblaciones del camarón *Penaeus vannamei* mejoradas genéticamente constituye un avance en los sistemas productivos debido a la generación de organismos con altas tasas de crecimiento, resistentes a patógenos, y a condiciones medioambientales. Sin embargo es conocido que en los programas de mejoramiento genético se puede producir pérdida de variabilidad genética con los consecuentes efectos negativos como la homocigosis (expresión de genes recesivos) asociados generalmente a enfermedades y a la expresión de características no deseables en los individuos. Varios estudios han demostrado la importancia de determinar la variabilidad genética de poblaciones de *Penaeus vannamei* para preservarla ya que esta es indispensable para mejorar las productividades en los cultivos. El objetivo de este proyecto fue caracterizar la variabilidad genética de la semilla de *Penaeus vannamei* producida en Colombia. Para lograr este objetivo a partir de muestras de pleópodos obtenidas de animales del programa de mejoramiento genético de Ceniagua y de animales de selección de masal de la industria camaronera Colombiana. A partir de estas muestras se extrajo ADN utilizando columnas de sílica (Sistema de Clontech) y se realizó amplificación por PCR y genotipificación de cinco locus microsatélites. Los análisis y la genotipificación de las muestras revelaron que el número de alelos por locus se encontró entre 6 para el locus 535 y 16 para el locus 1758. El número de alelos efectivos por locus entre 3,7 (locus 535) y 8,8 (locus 538) con un promedio de 6,1. Todas las poblaciones en todos los locus tuvieron un número superior a 3 alelos. En todas las poblaciones el número efectivo de alelos fue menor que el número de alelos. El rango de heterocigosidad observado se encontró entre 0,22-0,75, mientras que el rango de heterocigosidad esperada se encontró entre 0,62 y 0,88. Todas las poblaciones analizadas para todos los locus se encuentran en desequilibrio de Hardy Weinberg por un déficit de heterocigotos. Los valores de consanguinidad ( $F_{IS}$ ) se encontraron altos para una de las poblaciones de selección masal (0,48), mientras que en las poblaciones de selección familiar se observó una disminución de estos valores desde el lote 17 al lote 19 pasando de 0,39 a 0,19 indicando esto el manejo adecuado en términos de consanguinidad en los animales que integran el programa de mejoramiento genético basado en la selección familiar e individual. El análisis a nivel de poblaciones no mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las mismas, el grado de diferenciación de las poblaciones fue bajo  $F_{ST}$  0.0676, lo que demuestra un grado de mezcla entre las poblaciones y nos indica que si posteriormente se quiere aumentar la variabilidad genética de las poblaciones de *P. vannamei* en Colombia lo ideal sería utilizar animales de otros orígenes en lo posible de programas de mejoramiento genético de otros países.

Palabras claves: *Penaeus vannamei*, mejoramiento genético, variabilidad genética microsatélites,

## ABSTRACT

The development of populations of the *Penaeus vannamei* shrimp improved genetic constitutes an advance in the productive system due to the generation of organisms with high rates of growth, resistant to pathogens, and to conditioning environmental. However it is known that in the genetic improvement programs can be produce lost of genetic variability with the negative effects consequents to that this shares in bearing, in any way whatever the homozygotes (expression of recessive genes) associated generally to illnesses and to the expression of characteristics not desirable in the individuals. Several studies have demonstrated the importance of identifying the genetic variability of populations of *Penaeus vannamei* to preserve the since this is indispensable to improve the productivities. The objective of this project was characterize the genetic variability of *Penaeus vannamei* produced in Colombia. To achieve this goal from pleopods samples obtained from animals of breeding program of Ceniagua and animals selection masal the Colombian shrimp industry. From these samples DNA was extracted using silica columns (Clontech System) and was performed by PCR amplification and genotyping of five microsatellite loci. The analysis and the genotyping of the samples revealed that the number of alleles for locus found to him between 6 for the locus 535 and 16 for the locus 1.758. The number of effective alleles for locus between 3,7 ( locus 535 ) and 8,8 ( locus 538 ) with an average of 6,1. All the populations in all the locus had a superior number to 3 alleles. In all the populations the effective number of alleles went minor that the number of alleles. The range of heterozygosity observed found to him between 0,22-0,75, while that the range of heterozygosity hoped it found between 0,62 and 0,88. All the populations analyzed for all the locus finds in disequilibrium of Hardy Weinberg for a deficit of heterozygotes. The values of consanguinity (  $F_{IS}$  ) found to him high for one of the populations of masal selection ( 0,48 ), while that in the populations of familiar selection it observes to him a diminution of these value from the batch 17 to the batch 19 being more than of 0,39 to 0,19 indicating this the appropriate handling in terms of consanguinity in the animals that integrate the genetic improvement program based on the familiar and individual selection. The analysis perfectly level of populations did not show significant differences between the same, the degree of differentiation of the populations went below  $F_{ST}$  0.0676, demonstrating a degree of mixing between stocks and shows that if you later want to increase the genetic variability of populations in Colombia *P.vannamei* the ideal would be to use animals from other sources where possible genetic improvement programs of other countries.

Key words: *Penaeus vannamei*, improved genetics, genetic variability, microsatellite.

## GLOSARIO

**Alelo nulo:** se refiere a la presencia de falsos homocigotos que se generan porque uno o ambos sitios de unión de los iniciadores de la PCR presentan modificaciones puntuales, inserciones o deleciones de fragmentos de ADN, lo que impide la amplificación y produce un déficit de heterocigotos en un locus específico. La forma más común de identificarlos es por medio del test de herencia mendeliana.

**AMOVA (Analysis of Molecular Variance):** es un estimativo que revela la cantidad de diferencia existente entre las secuencias moleculares en lugar de usar las diferencias en las frecuencias de los genes. Es un método de estimación de diferenciación poblacional que utiliza directamente los métodos moleculares.

**Consanguinidad:** cruzamiento entre organismos estrechamente emparentados.

**Desequilibrio de unión:** ocurre cuando dos genes están muy cercanos uno del otro en el mismo cromosoma. De este modo, tienden a ir juntos durante las divisiones celulares, no pudiendo entonces ser considerados independientes.

**Distancia genética:** es una medida de la diferencia en la constitución genética entre distintas especies o grupos de individuos de la misma especie.

**Equilibrio génico:** condición que existe cuando las frecuencias génicas de una población permanecen constantes generación tras generación.

**Equilibrio de Hardy Weinberg:** condición que existe cuando las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes en una población que no tiene deriva, selección, migración o mutación, y en la que los apareamientos son



aleatorios.

**Frecuencia alélica:** proporción de un alelo particular; número de veces que aparece un alelo específico en una población, dividido por el número total de alelos que están localizados en ese locus específico y en esa población.

**Homocigosidad observada:** proporción de individuos homocigotos en la población estudiada.

**Homocigosidad esperada:** Proporción de individuos que se espera que sean homocigotos en un locus cuando se satisfacen los supuestos de Hardy-Weinberg.

**Heterocigosidad observada:** Proporción de individuos heterocigotos en la población estudiada.

**Heterocigosidad esperada:** Proporción de individuos que se espera que sean heterocigotos en un locus cuando se satisfacen los supuestos de Hardy-Weinberg.

**Locus polimorfo:** Es el locus para el que existen al menos dos alelos en la población, cada uno de ellos con una frecuencia igual o mayor que el 1%.

**Número de alelos:** Es el conteo del número de alelos presentes en la población con frecuencia diferente a cero.

**Número efectivo de alelos:** Es el número de alelos que pueden estar presentes en la población, permite comparar diversas distribuciones en la frecuencia de los alelos y puede verse afectado por el tamaño de la muestra. Se calcula utilizando la fórmula  $1/\sum q_i^2$  donde  $q_i$  es la frecuencia del alelo  $i$ ). Esta medida está afectada por la proporción de loci polimórficos, el número de alelos por locus polimórfico, y las frecuencias alélicas.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ACUICULTURA Y CAMARICULTURA

La acuicultura es un término que explica el cultivo de animales y plantas en el agua; en el caso de los animales se incluyen peces, reptiles, anfibios, crustáceos y moluscos destinados como alimento, estudio, conservación, protección y/o producción. La acuicultura ha tenido una expansión sin precedentes en el mundo en las últimas décadas, nuevas especies y nuevas tecnologías de cultivo han sido introducidas en aquellos sectores que han mostrado gran potencial. Uno de estos sectores ha sido el cultivo del camarón, el cual desde 1984 ha venido creciendo a una tasa promedio anual del 16%, siendo uno de los sectores más productivos. (Gjedrem, 1997; New, 1999; Subasinghe et al., 1998).

La acuicultura ha pasado de 20 millones de toneladas de producción a principios de los noventa hasta una producción que alcanzo 52 millones de toneladas en el año 2006. (FAO, 2008)

En relación a la camaronicultura, las estadísticas de FAO para 2007, indican que hoy en día la especie más cultivada es *P. vannamei*, cuya producción se incrementó constantemente de 8.000 TM en 1980 a 202.073 TM en 1998. Tras un declive significativo en el año 2000 debido a la irrupción del virus del síndrome de la mancha blanca en América Latina, donde se produjeron 152.363 TM, las estadísticas de esta organización muestran un rápido crecimiento de la producción pasando a 1.417.310 TM en 2004, gracias a la rápida dispersión de esta especie en Asia. Los principales países productores en dicho año fueron: China (691.828 TM), Tailandia (391.827 TM), Indonesia (291.827 TM) y Vietnam (41.828 TM). Para el período 2005 – 2007, la producción de esta especie oscila entre 1.726.375 y 1.972.248 TM. Este acelerado crecimiento del cultivo de esta especie en los

países asiáticos, se confirma al observar que para el año de 1994 el cultivo de dicho camarón era de solo el 15%, contra un 63% del estimado para 2007. Finalmente de acuerdo con las estimaciones las producciones para las vigencias de 2008 y 2009 estarían fluctuando entre 2.218.481 TM y 2.366.046 TM respectivamente.

En América del Sur el sector acuícola ha crecido vertiginosamente durante los últimos 10 años, pasando de una producción de 209.000 toneladas en el año 1995 a 1.1 millones de toneladas en el 2004. En el 2004 los productos acuícolas más importantes en cuanto al volumen y valor estuvieron representados por salmón del Atlántico (*Salmo salar* 349.999 toneladas), camarones blancos (*Penaeus occidentalis* 172.000 toneladas), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss* 139.000 toneladas), salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*) y tilapia (*Oreochromis sp*) (cada uno 90.000 toneladas), choritos (*Mytilus chilensis* 72,000 toneladas) y carpa común (*Cyprinus carpio* 46,000 toneladas). En 2004, el sector de la acuicultura en América del Sur generó una producción cuyo valor estimado fue de casi 4.6 miles de millones de dólares. Esta cifra constituye un aumento considerable respecto a la de 1.6 miles de millones de dólares en 1995 y a la estimada de 2.6 miles de millones de dólares. En 2004 los productos acuícolas más importantes en América del Sur, en cuanto a su valor fueron: salmón del Atlántico (1.536 millones de dólares.), camarones blancos (803 millones de dólares.), trucha arco iris (608 millones de dólares.), ostiones abanico (*Agropecten purpuratus*) (324 millones de dólares.), salmón plateado (298 millones de dólares.) y tilapia (281 millones de dólares).

## **1.2. CAMARICULTURA EN COLOMBIA**

Desde 1983 la industria camaronera colombiana empezó a instalarse en el estuario de la bahía de Cispatá, en el municipio de San Antero al norte del departamento de Córdoba, es un ecosistema que alberga uno de los manglares

más exuberantes del Caribe colombiano; esto ocurrió luego de los inicios en la costa pacífica colombiana la cual fue influenciada por Ecuador uno de los países pioneros en la acuicultura. Hasta mediados de la década de los años 90 el sector dependía de semilla importada para su funcionamiento. Los principales inconvenientes del uso de esa semilla eran el abastecimiento inestable, el alto costo y el riesgo de introducción de enfermedades. Los resultados en los inicios fueron muy alentadores en términos de producción, sin embargo esta industria tuvo pérdidas económicas muy significativas como consecuencia del ataque del virus del Taura en los años 1994-1995, que ocasionaron el cierre de varias empresas. (CENIACUA base de datos)

Debido a esta situación el sector camaronicultor Colombiano creó el Centro de investigación de la acuicultura Colombiana (CENIACUA) cuya función es realizar investigación aplicada al sector acuicultor para mejorar las producciones del mismo, este programa buscaba proteger la industria contra la aparición de nuevas enfermedades y seleccionar los animales sobrevivientes a la epidemia como reproductores para un programa de selección masal. Este programa presentó resultados excelentes al incrementar la sobrevivencia en finca de un 40% en 1995 a un 70% en el año 2000. (CENIACUA base de datos)

Considerando los beneficios obtenidos con este programa masal y teniendo en cuenta que ya se contaba con la tecnología necesaria para establecer programas de mejoramiento genético, CENIACUA dio inicio a un nuevo programa de genética en 1997, contando con la asesoría del grupo Noruego AKVAFORSK. El objetivo principal del programa de mejoramiento genético de CENIACUA es el de incrementar la expresión de aquellas características del *P. vannamei* que tienen una importancia económica directa en la industria colombiana. Este programa se basa en la reproducción selectiva de los animales, para seleccionar e incrementar los rasgos fenotípicos de mayor interés. En este momento, los criterios de selección incluyen crecimiento, sobrevivencia en finca y resistencia al virus del

Taura. Durante el desarrollo del programa, CENIACUA y el sector camaronicultor colombiano han adaptado y transferido los protocolos y las metodologías de selección familiar para aplicarlas en el *P. vannamei*. Se constituyó una población base con reproductores de diferentes orígenes, buscando una amplia variabilidad genética y se inició el programa de selección con una estrategia combinada de selección familiar e individual.

A través de los resultados obtenidos en estos años, CENIACUA y las empresas del sector camaronicultor colombiano han demostrado capacidad para desarrollar este tipo de programas. Se ha comprobado que los rasgos fenotípicos de crecimiento, y resistencia a patógenos presentan una adecuada heredabilidad e inclusive correlaciones positivas como resistencia al Taura versus crecimiento o sobrevivencia en finca versus crecimiento ( $r=0,40-0,42$ ), también se ha reportado una correlación negativa significativa entre crecimiento y resistencia al virus de la Mancha blanca WSSV (White Spot Syndrome Virus) ( $r=0,55-0,64$ ). (Gitterle et al., 2005).

En la actualidad el cultivo se está llevando a cabo tanto en la zona atlántica como en la pacífica, siendo las producciones menores en esta última debido a la presencia del virus del White spot (WSSV), el total en Colombia ha pasado de 9432 toneladas en el año 1992 a 18,135 en el año 2008 (Fuente ACUANAL 2009).

En este momento es primordial conocer la variabilidad genética de las familias del programa con el fin de fortalecer la ganancia genética obtenida en las nuevas generaciones y poder contar con semilla fenotípicamente mejorada que le permita al sector aumentar el grado de competitividad en los mercados internacionales.

Además, la sostenibilidad y el éxito a largo plazo de este tipo de programas dependen en gran parte de la capacidad de conservar la variabilidad genética en las líneas seleccionadas. La variabilidad genética de los individuos de este

programa aún no se ha estudiado, aunque durante el desarrollo del programa de mejoramiento genético se han tomado todas las medidas necesarias para garantizar la conservación de la variabilidad genética de los animales de selección familiar, se han utilizado suficientes individuos y de diferentes lotes para que la población no pierda su variabilidad genética, los camarones son marcados con elastómeros fluorescentes para identificarlos y evitar los apareamientos entre individuos con parentesco; además las poblaciones bases, de las cuales se realizó la primera selección (lote 1, 2 y 3) se establecieron después de la introducción exitosa de material genético de nueve países americanos (Costa Rica, Hawái, Panamá, Perú, Venezuela, Ecuador, Panamá, Salvador, Colombia) para garantizar un gran pool genético. Todo esto realizado para evitar la pérdida de variabilidad y los efectos perjudiciales de la consanguinidad que han sido reportados en los camarones. (AKVAFORSK-CENIACUA 2001)

En Colombia la industria camaronera es un generador de importantes divisas para el país a través de las exportaciones de camarones cultivados (Rosenberry, 1998).

El desarrollo del cultivo de camarón ha tenido notables diferencias en las dos costas Colombianas. Inicialmente el cultivo se desarrolló en la región Pacífica, sin embargo las mejores condiciones de infraestructura que se presentan en la región Atlántica ocasionaron la creación y desarrollo de más empresas en esta región del país. De acuerdo con ACUANAL (2008), en el año 2007 el sector camaronicultor mantuvo su tendencia creciente en el volumen de producción. Sin embargo, este crecimiento se vio afectado por los ajustes en la tecnología de producción (intensificación de los cultivos) que retrasaron las siembras. Adicionalmente, confluyeron problemas ambientales ocasionados por la época de lluvias del segundo semestre que afectaron los parámetros físico-químicos de las aguas, lo cual a su vez generó disminuciones importantes en la supervivencia. A pesar del aumento productivo presentado en los últimos años, lamentablemente se ha dado el cierre de por lo menos 9 fincas pequeñas y medianas. La producción total de la

costa Atlántica aumentó de 20.806 TM en el 2006 a 22.182 en el 2007. No obstante, de acuerdo con ACUANAL 2009, por primera vez en los últimos 5 años, en el año 2008 la tendencia creciente de producción en el sector camaronicultor se invirtió. El efecto negativo del clima (baja salinidad, bajo oxígeno, alta incidencia del mejillón, entre otros) y los problemas de disponibilidad de larva a principios de ese año ocasionaron una disminución en la producción de cerca del 18%. En el 2008 el volumen de producción volvió a niveles similares a los del año 2005. La producción en la costa Pacífica está concentrada en cuatro fincas con sistemas de producción extensivos y con productividades que oscilan entre 200 y 750 kg/ha. El volumen total producido en esta costa disminuyó de 1.619TM a 225 en el 2008.

### **1.3. MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL *P. vannamei*.**

El uso de animales silvestres ha sido, sin lugar a dudas, el problema que ha tenido el mayor impacto negativo en la industria camaronícola, razón por la cual muchos laboratorios de producción cerraron sus ciclos reproductivos generando sus propios reproductores, lo que ha permitido ir seleccionando los animales teniendo en cuenta sus características fenotípicas como la talla, rápido crecimiento, resistencia a enfermedades y desempeño en el cultivo (selección masal). Sin embargo, utilizar el fenotipo como único criterio de selección no es suficiente para garantizar el éxito de un programa de mejoramiento genético, ya que las características deseadas no siempre se manifiestan o no son heredadas a la progenie y, al cabo de unas cuantas generaciones, éstas se pueden perder o peor aún, se pueden manifestar características no deseadas que permanecían en forma recesiva dentro de la población.

La pérdida en la producción de varias especies acuícolas alrededor del mundo, debido a las enfermedades, ha incidido en la necesidad de desarrollar herramientas para un rápido reconocimiento y control de patógenos. Además si se tiene en cuenta que es un problema que se está incrementando, se debe

reconocer que una de las principales soluciones a largo término, en el mantenimiento de una producción, es el desarrollo de poblaciones domesticadas libres de enfermedades o resistentes a ellas (Benzie 1998, Black 1993, Wyban et al., 1993).

Para evitar y controlar estos problemas se han establecido programas de selección de organismos más resistentes y de esta forma optimizar el desempeño de los individuos en condiciones de cultivo, además hay que tener en cuenta que el manejo y la conservación de recursos explotables debe incluir aspectos de domesticación y ciclo cerrado con acciones que conserven la diversidad genética de la especie. (Valles Jiménez *et al.*, 2005).

El Centro de Investigación de la Acuicultura en Colombia (CENIACUA) ha venido desarrollando desde 1997 un programa de mejoramiento genético del *P. vannamei*, mediante selección familiar e individual. El Instituto de Investigaciones para la Acuicultura de Noruega AKVAFORSK, líder a nivel mundial en programas de mejoramiento genético de especies acuícolas, colabora con CENIACUA transfiriendo y adaptando la tecnología del mejoramiento genético basado en la selección familiar y apoyando los análisis de resistencia a enfermedades, sobrevivencia y crecimiento del camarón blanco *P. vannamei*. (Gitterle et al., 2005).

En un programa de mejoramiento genético mediante selección familiar e individual se trabaja con grupos de familias de hermanos enteros y medios hermanos, los cuales son llamados lotes. A las familias de estos lotes se les evalúa su desempeño de crecimiento, sobrevivencia en finca y su resistencia a la infección experimental por patógenos, como el WSSV (White Spot Syndrome Virus o mancha blanca) y TSV (Síndrome del virus del Taura). Los reproductores son seleccionados teniendo en cuenta el comportamiento de la familia (crecimiento, sobrevivencia y resistencia a patógenos) y su propio desempeño en las pruebas



de crecimiento. CENIACUA ya ha conformado 23 lotes de familias de los cuales 3 corresponden a poblaciones base, creadas a partir de reproductores originarios de distintos lugares, como Hawái, Panamá, Ecuador, Perú y Venezuela. A partir de estas poblaciones base (F0) se han ido creando otros lotes, que han sido seleccionados para crecimiento y resistencia a patógenos. Por ejemplo, el Lote 4 (F1, primera generación) se produjo a partir de reproductores seleccionados del Lote 1, y el Lote 5 a partir de una mezcla de reproductores de los Lotes 2 y 3.

En forma paralela desde 1994 las fincas de cultivo de camarón han venido desarrollando programas de selección de reproductores basados en las características fenotípicas (selección masal). En la actualidad se cuenta con dos de estas líneas de mejoramiento genético basado en la selección masal.

Debido a la carencia de conocimiento en aspectos fundamentales de su fisiología el progreso en la genética de camarones peneidos y la investigación biotecnológica ha sido escasa. Con los avances en el área de biología molecular ha surgido el interés de aplicar estas nuevas metodologías como sistema de apoyo para la evaluación de los programas de mejoramiento genético.

#### **1.4. VARIABILIDAD GENÉTICA**

En todas las poblaciones, los organismos presentan pequeñas variaciones en su genoma o ADN que pueden estar ocultas o manifestarse ligeramente en sus características observables o fenotipo. Esta variabilidad genética o polimorfismo afecta la respuesta de los individuos en forma diferente; por ejemplo una población con una amplia variabilidad genética puede tener un pool genético capaz de responder a condiciones adversas de cultivo. (Pierce 2006)

Uno de los principales problemas que afectan a las poblaciones minoritarias y la diversidad genética de las poblaciones son los inevitables apareamientos entre

individuos emparentados, que se traducen genéticamente en un incremento de la consanguinidad (homocigosis) con la consiguiente depresión por consanguinidad; una reducción de los valores medios fenotípicos de los caracteres productivos y reproductivos. La variabilidad genética es fundamental para asegurar el potencial evolutivo de las poblaciones (Frankel and Soulè 1981; Koljonen et al., 2002) el manejo inadecuado de las poblaciones puede producir cuellos de botella genéticos que pueden dar lugar incluso a la extinción de especies (Luikart et al., 1998).

Estos cambios (mutaciones) en los componentes básicos del ADN se dan por la sustitución de un nucleótido por otro, inserciones o eliminaciones, además de otros procesos más complejos que incluyen inversión y rearrreglo de segmentos. El número y grado de mutaciones en la secuencia del ADN definen la variabilidad genética dentro de las especies y permiten identificar a los organismos de una población específica, una cepa de laboratorio, poblaciones de distintas localidades o especies parecidas. Debido a que las modificaciones son en el genoma, éstas solamente pueden ser detectadas por análisis de secuencias del ADN y luego de ser identificadas en una población determinada podrían ser utilizadas como marcadores genéticos. Los marcadores moleculares son regiones del ADN que presentan variación en su secuencia. Por ello, se consideran herramientas útiles en los programas de mejoramiento genético ya que nos permite evaluar el nivel de variabilidad genética. (Pierce 2006)

Desde una perspectiva genética los procesos de selección frecuentemente se asocian con importantes pérdidas de variabilidad genética en las especies. La variación genética es un importante indicador de la diversidad biológica (Mc Nelly et al., 1990) y proporciona poblaciones con capacidad para adaptarse y resistir a cambios y condiciones ambientales adversas (Frankel and Soulè 1981). El estudio de la diversidad genética es complicado debido a los múltiples factores que la afectan como son la selección natural y/o artificial, la deriva genética y otros

(Simões et al., 2007).

Los marcadores moleculares son útiles para estudiar y apoyar los programas de mejoramiento genético con el fin de medir la conservación de la diversidad genética (Utter 1991). Actualmente es posible utilizar marcadores moleculares tipo microsatélites basados en las secuencias del genoma y cuyo poder resolutivo es mucho mayor que el de otras técnicas (RFLP, RAPD, aloenzimas etc.). La metodología incluye la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction), la cual permite hacer múltiples copias de fragmentos de ADN, utilizando pequeñas cadenas, llamadas primers, cebadores o iniciadores, que reconocen una secuencia específica en el ADN a analizar. Después de esta amplificación se determina el tamaño del producto amplificado mediante electroforesis y detección por tinción en geles de poliacrilamida o con un secuenciador permitiendo diferenciar variaciones entre especies, poblaciones e, incluso, individuos de la misma familia.

El objetivo de este proyecto es poder determinar en una forma cuantificable el grado de variabilidad genética de las líneas de *P vannamei* provenientes del programa selección familiar y compararlas con las poblaciones de selección masal. Esta variabilidad se analizará determinando el número y la frecuencia alélica de 5 microsatélites, los porcentajes de heterocigosidad, el grado de diferenciación de las poblaciones ( $F_{st}$ ), el nivel de consanguinidad ( $F_{is}$ ) y la comparación de estos valores entre las poblaciones.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. MORFOLOGÍA DEL CAMARÓN

El camarón blanco *Penaeus vannamei* es un invertebrado marino que se encuentra agrupado dentro del phylum Artropoda, subphylum Crustácea y pertenece a la familia *Penaeidae*. Se caracteriza por poseer un tronco compuesto por 14 segmentos más el telson de los cuales los ocho primeros forman el tórax y los últimos seis el abdomen; todos los segmentos portan apéndices, los que se encuentran en el abdomen anterior son llamados periópodos y son usados para caminar en el fondo y los posteriores son llamados pleópodos y son usados para nadar. El cuerpo tiende a ser cilíndrico o comprimido lateralmente, tiene un cefalotórax definido y porta un rostro aserrado con forma de quilla (figura1). Posee un exoesqueleto conformado por quitina que suele ser delgado y flexible. Los camarones son de costumbres pelágicas y se alimentan por filtración en el fondo. (Fenucci 1988)

Presenta una boca en posición ventral y el aparato digestivo se ensancha a lo largo del dorso, para formar una glándula digestiva grande llamada hepatopáncreas que excreta enzimas digestivas. El cordón nervioso se extiende a lo largo del vientre. Su órgano excretor es la glándula antenal que excreta al medio, sustancias de desecho. El sistema circulatorio es abierto, y compuesto por vasos sanguíneos que transportan la hemolinfa la cual posee cobre y acarrea el oxígeno, por lo que desarrolla un color azulado, el oxígeno y el dióxido de carbono son transportados desde y hasta las branquias en donde se realiza el intercambio gaseoso. (Ruppert. et al., 1996).

## TERMINOS TECNICOS Y PRINCIPALES MEDIDAS UTILIZADAS

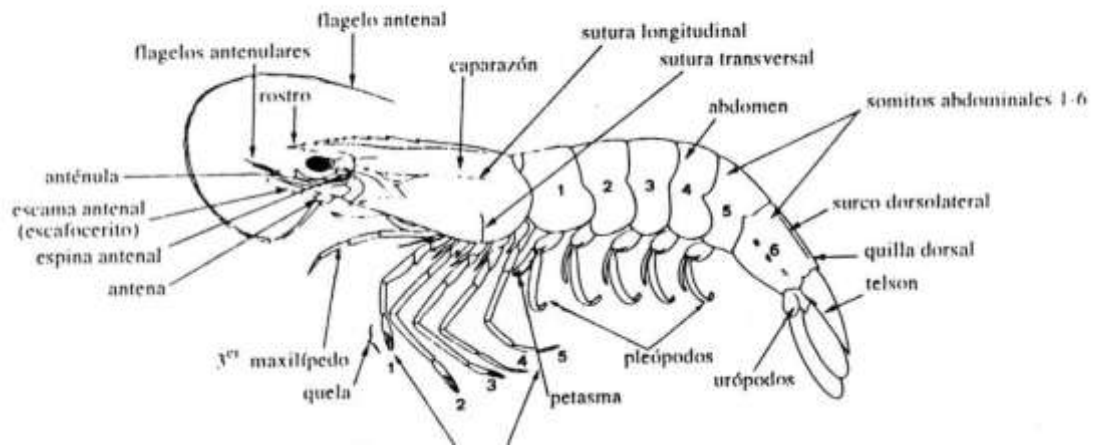


Figura 1. Morfología del camarón *Penaeus vannamei*. (CIPA, 2004).

## 2.2. GENÉTICA Y PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO

La información disponible acerca del genoma del camarón es fragmentada, los genes que hasta el momento se han caracterizado en camarones peneidos son muy pocos (Bagshaw y Quiel, 1998); sin embargo la investigación en mejoramiento genético de estas especies está encaminada hacia la búsqueda de genes y marcadores moleculares para ser usados en selección asistida.

Actualmente existen avances en esta área en *Penaeus monodon* con el uso de RAPDs (García y Benzie, 1995), AFLPs (Wilson et al., 2002) y ETSs (Tong et al., 2002) y en *Penaeus japonicus* con el uso de microsatélites y AFLPs (Moore et al., 1999). Con estas técnicas se ha iniciado la construcción de mapas comparativos que a futuro permitirán probar la conservación de genes en familias y localizar posibles QTLs (loci de caracteres cuantitativos) en las especies cultivadas (Moore et al., 1999; Wilson et al., 2002).

Los Quantitative Trait Loci (QTLs) son regiones de ADN asociadas a caracteres fenotípicos particulares y son usados como marcadores moleculares para asistir

programas de selección molecular. Lyons et al., (2007) usando amplified fragment length polymorphism (AFLP) identificó una región marcadora mayor QTL que contribuía con el 16% de la variación fenotípica correspondiente a la tasa de crecimiento.

Los SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) son variaciones nucleotídicas o cambios en una sola base que se pueden presentar en regiones codificantes (exón) y no codificantes (intrón), en promotores o en regiones intergénicas. En camarones los SNPs han sido descritos y examinados para usar como marcadores moleculares para evaluar características heredables. Los SNPs han sido asociados con variaciones en la resistencia a TSV en poblaciones de *P. vannamei* en china (Zeng et al., 2008). Otros estudios han demostrado la importancia de los SNPs en el conocimiento del genoma de los camarones por ejemplo la no asociación entre la presencia de SNPs de alfa amilasa (AMY2) y catepsina con crecimiento en *P. monodon*, pero si se reflejó una tendencia con alto peso asociado con el alelo G de CTSL SNP C681G (Glenn et al., 2005). Con la proliferación de las técnicas de secuenciación y los nuevos protocolos para identificación de SNPs miles de estos han sido identificados y genotipificados facilitando el análisis de muchas poblaciones y favoreciendo a los SNPs como una herramienta importante para la selección genética de organismos basada en marcadores moleculares.

Los ESTs (Expressed Sequenced Tags) son una herramienta valiosa para identificar genes asociados con una característica particular. Los ESTs son secuencias cortas (8-100 pbs) que indican cuales genes comienzan a expresarse en un tejido particular y en un momento específico en tiempo y espacio. Los ESTs han sido identificados en muchas especies incluyendo a los camarones peneidos. En la DbESTs (base de datos de ESTs mantenida por el NCBI) hay 60.441.382 entradas de las cuales 8.414.647 corresponden al homo sapiens y 155.915 a *Penaeus vannamei* (junio 24 de 2009) .Otra base de datos que puede ser

consultada para ESTs en camarones es The Marine Genomics Project la cual muestra aproximadamente 176.198 ESTs para *Penaeus vannamei*, 965 para *Penaeus setiferus*, 199 para *Penaeus stylirostris* y 329 para *Penaeus monodon*. El Instituto Australiano de Ciencia Marina y el Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization de Australia, trabajan en la identificación de EST en *Penaeus monodon*, una de las especies comúnmente criadas en ese país. Los ESTs en camarones pueden ser usados como una herramienta en los programas de mejoramiento genético para el estudio del genotipo y las interacciones ambientales además para comparar la de expresión de genes y su comportamiento en diferentes enfermedades.

Utilizando hibridación *in situ* fluorescente se aislaron y mapearon repeticiones de pentanucleótidos en el telómero en poblaciones de *Penaeus vannamei*, e identificaron genes de función conocida tales como 18S y 28S rRNAs, proteína de choque térmico 70, y por medio de la meiosis fue confirmado como N=44 (genoma haploide) el número de cromosomas en el camarón *Penaeus vannamei* (Alcívar-Warren *et al.*, 2006).

La estimación del tamaño total del genoma de *Penaeus vannamei* según el método de Chakravarti *et al.*, 1991 fue 4445 cM para la hembra y 3583 cM para el macho. El mapa genético de *Penaeus vannamei* basado en la técnica de AFLPs realizado por Pérez *et al.*, 2004 generó un mapa integrado por 212 marcadores distribuidos en 51 grupos de ligamiento con una longitud total de 2771 cM, para la hembra y un mapa para el macho con 182 marcadores agrupados en 47 grupos de ligamiento con un cubrimiento de 2116 cM, en este estudio se estimó que el cubrimiento del genoma fue del 62% para la hembra y 59% para el macho siendo el mapa de la hembra 24% mayor en tamaño.

Los reportes de la secuenciación del genoma mitocondrial completo de *Penaeus vannamei* muestran un genoma de 15990 pb de DNA de doble cadena y de

topología circular y describen 13 genes que codifican para 13 proteínas; con un contenido de GC 32% y 24 RNAs estructurales. (Muhlia et al 2008).

Otros estudios de secuenciación del genoma mitocondrial han sido de mucha ayuda para el entendimiento de la evolución y de las relaciones existentes entre las distintas especies del género *Penaeus*. Shen et al., (2007) encontró que el genoma del *Penaeus vannamei* estaba formado por 15989 pb, un grupo de 13 proteínas codificadas por genes, 22 genes de RNA t, dos genes de RNAr y una región rica en A-T no codificante.

Es claro que la genómica de los camarones del género *Penaeus* es de interés para muchos investigadores, pero es necesario desarrollar proyectos para secuenciarlo en su totalidad y así eliminar las limitaciones que existen en el estudio del genoma como por ejemplo la falta de homología de las secuencias ESTs identificadas en el camarón con las secuencias almacenadas en las bases de datos como NCBI.

Aunque el mejoramiento genético en especies acuícolas parece tener su origen hace miles de años, con la carpa común, el empleo de genética cuantitativa o marcadores moleculares en este proceso son relativamente nuevos. En las últimas tres décadas, los programas de mejoramiento genético han sido aplicados con mayor frecuencia en las especies acuícolas. Sin embargo, cuando se compara con los niveles de domesticación en especies como plantas y ganado, el sector acuícola se encuentra muy lejos de alcanzar un alto grado de desarrollo. De acuerdo a datos de la FAO, el número de especies acuícolas cultivadas se ha incrementado para los 3 grandes grupos desde 1984: 34% para las especies de peces, 29% para los crustáceos y 31% para moluscos (Garibaldi, 1996). Un pequeño porcentaje de la producción de acuicultura mundial proviene de especies genéticamente mejoradas, cabe resaltar que este término hace referencia a mejoría genética directa y no solamente al proceso de domesticación (Gjedrem,



1997). Los programas de mejoramiento genético han sido altamente exitosos en el aumento de la producción y podemos citar los ejemplos del salmón atlántico en Noruega, de la tilapia en las Filipinas y de las ostras en Norte América (Dunham, 1995; Gjedrem, 1997). Los resultados en especies acuícolas superan inclusive los de mejoramiento genético en ganado y aves. Por ejemplo, la ganancia genética para crecimiento en especies como salmón, tilapia y trucha va desde el 10.1% hasta el 23% por generación. Este fenómeno puede ser ocasionado por la mayor fecundidad de las especies acuícolas que facilita la selección de animales con valores reproductivos superiores. Además, esos programas se inician con poblaciones silvestres que han sido sujetas a poca presión de selección para crecimiento. Los programas de mejoramiento genético mediante selección familiar representan una estrategia de mejoramiento a largo plazo y son las mejores herramientas para utilizar a cabalidad los recursos genéticos de las especies, en particular de las especies acuáticas.

Al iniciar un programa de mejoramiento genético es necesario tener claro que es un proceso a largo plazo, en el cual el mejoramiento en el futuro se basa en la ganancia obtenida en el pasado, y en el cual cada generación se apoya en la anterior y sirve de base para la siguiente. Es por lo tanto un proceso lento de selección cuidadosa en todas las generaciones. Además es un proceso dinámico, ya que los cambios en manejo, mercado, medioambiente y salud pueden determinar cuáles sean los rasgos de mayor potencial económico. Se necesita por lo tanto un alto grado de conocimiento y experiencia en los mecanismos de selección y el conocimiento del efecto que otros mecanismos como consanguinidad, mutaciones migración y deriva genética puedan tener en el resultado de esos programas a largo plazo (Awise, 2004).

*P. vannamei*, es una especie que presenta rasgos favorables para los programas de reproducción controlada debido a la posibilidad de trabajar en ciclo cerrado, tiempo intergeneracional relativamente corto (aproximadamente 10 meses) y una

alta tasa de fecundidad. La diversidad genética de los animales cultivados es fundamental para cubrir las necesidades de producción en diferentes medioambientes, para permitir un mejoramiento genético sostenido y para facilitar la rápida adaptación a los objetivos cambiantes de un programa de selección genética (Gitterle et al 2002).

Los efectos negativos de la consanguinidad en la fortaleza de una población se han descrito desde 1876 (Darwin 1876). Con el descubrimiento de las leyes mendelianas de la herencia se postuló que estos efectos eran ocasionados por la homocigosidad que se presentaba en los locus asociados con la resistencia. Sin embargo, las bases moleculares de la depresión ocasionada por la consanguinidad aún no han sido determinadas completamente. Existen dos teorías al respecto, la primera teoría es la de la sobre dominancia que atribuye la depresión de la consanguinidad como una consecuencia de la falta de heterocigosidad en aquellos locus donde hay una ventaja del heterocigoto. Debido a que la ventaja del heterocigoto es una forma de selección, los alelos se mantienen en alto grado de polimorfismo en las poblaciones con cruces naturales. La segunda teoría denominada hipótesis dominante postula que la depresión es debido a la presencia de alelos dañinos recesivos o parcialmente recesivos. (Charlesworth 1999). A pesar de que aún no se ha determinado cual de las dos teorías es la responsable por los efectos de la consanguinidad, y que posiblemente existe una combinación de ambos efectos (overdominance y dominante), existen pruebas de los efectos dañinos de la consanguinidad en las poblaciones (Charlesworth 1999). Esos efectos han sido reportados para varios rasgos en diferentes especies, ostras (Naciri-Graven, 2000), humanos (Dorsten 1999), *Drosophila* (Latter 1998) etc. En *Penaeus japonicus* también se ha reportado que la consanguinidad en las generaciones F4 y F5 se asocia con marcada disminución en la sobrevivencia y capacidad reproductiva (Crococ 2001). Considerando la necesidad de evitar la consanguinidad en los entrecruzamientos de los programas de mejoramiento genético, en los últimos años se han

desarrollado varios métodos para determinar el grado de consanguinidad en las poblaciones.

### **2.3. MARCADORES MOLECULARES**

Los marcadores moleculares han servido como base para caracterizar poblaciones en diferentes niveles (identificación de especies, cepas de híbridos, análisis de diversidad, recursos genéticos, determinación de paternidad, mapeo genómico con aplicaciones en genética de poblaciones, biología evolutiva, ecología molecular, genética conservacionista, etc.). A través de los años se han utilizado diferentes técnicas para establecer diferenciaciones entre individuos y poblaciones; la metodología más utilizada actualmente es la genotipificación de los microsatélites. Además se han utilizado otras técnicas como la amplificación aleatoria de DNA polimórfico o RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) tanto genómico (DNA-RAPD) como mitocondrial (mtDNA-RAPD), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) y el polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados o AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) .

#### **2.3.1 RAPD (Randomly amplified Polymorphic DNA).**

Los marcadores generados por RAPD, son productos de una reacción de PCR utilizando iniciadores cortos con una secuencia arbitraria y en condiciones de reacción de baja astringencia. La técnica es simple, relativamente barata y ha sido aplicada con éxito para el estudio de diferentes organismos, incluyendo camarón. Por ejemplo, Klinbunga y cols en el 2001 demostraron por RAPD una alta diversidad en poblaciones de *Penaeus monodon* provenientes de 5 localidades de Tailandia y corroboraron en ellas el polimorfismo del gen mitocondrial 16S ribosomal. En este estudio se observaron 37 haplotipos de mtDNA y una alta diversidad haplotípica (0.855) y nucleotídica (3.328%). En el caso de los RAPDs

se identificaron 53 fragmentos polimórficos a partir de 3 iniciadores generando entre 26 y 32 genotipos encontrando además un marcador genotípico que los distinguía de individuos de *Penaeus monodon* de otras regiones geográficas.

Utilizando RAPDs, Hizer et al. (2002) establecieron diferencias entre poblaciones de camarones de *Litopenaeus stylirostris*; pero además, identificaron un marcador genético asociado con la resistencia o susceptibilidad al virus de la necrosis hematopoyética e hipodérmica (IHHNV). La técnica de RAPD también ha sido aplicada exitosamente en estudios genealógicos y evolutivos de diversas especies. Su uso en estudios comparativos ha permitido diferenciar con facilidad y precisión especies del mismo género, e incluso, llegar a diferenciar poblaciones de la misma especie. La limitante más importante de la técnica de RAPD es que la reacción se lleva a cabo en condiciones poco exigentes (baja astringencia), lo que se traduce en una baja selectividad, con resultados poco específicos y difíciles de reproducir; para minimizar estas desventajas, es necesario probar un elevado número de primers o iniciadores, lo cual incrementa el tiempo y costo de los análisis. (Montaño-Pérez et al., 2004).

### **2.3.2 RFLP (Restriction fragment length Polymorphisms)**

Otra de las técnicas utilizada es la combinación de la PCR en combinación con la digestión por enzimas de restricción RFLP, (Thaewnon-ngiw et al., 2004) los cuales se obtienen al fragmentar el ADN (genómico o mitocondrial) con enzimas de restricción, las cuales cortan solamente en los sitios donde se encuentra una secuencia específica. Modificaciones en la secuencia de ADN por cambio de un nucleótido por otro, inserciones o eliminaciones darán por resultado la desaparición o aparición de nuevos sitios de corte, por lo que se reflejará en el número y tamaño de los fragmentos generados. La presencia y tamaño de los fragmentos se determina, después de su separación por electroforesis, por hibridación con una sonda marcada o amplificando la región de interés por PCR

utilizando primers específicos.

Utilizando RFLP, y con ADN mitocondrial (mtDNA-RFLP), en los camarones peneidos *Penaeus monodon* es posible encontrar mayor variabilidad genética en poblaciones de Indonesia (0.05) y baja variabilidad en poblaciones de Filipina y Australia (0.01) (Benzie, 1993). Sin embargo, la utilidad de ADN mitocondrial puede ser parcial debido a que la información genética del ADN mitocondrial proviene solamente del lado materno (Klinbunga y cols., 2001). Esta es una limitante que puede conducir a confusiones interpretativas y, definitivamente, tiene menor capacidad de resolución que cuando se utiliza ADN nuclear.

### **2.3.3 Microsatélites**

En la actualidad, muchos de los estudios sobre conservación y evaluación de la variabilidad genética en poblaciones se basan en los análisis genéticos, a través del uso de marcadores moleculares de ADN. Entre estos marcadores uno de los más utilizados son los microsatélites o “short-sequence repeat tandem” (SSRT).

Los microsatélites o STRs, iniciales de su nombre en Inglés (Short Tandem Repeats), son secuencias de oligonucleótidos repetidas en tándem (una secuencia detrás de la otra) que se encuentran dispersos por todo el genoma de los organismos eucariontes (Tautz, 1989) y procariontes (Zane *et al.*, 2002), algunas secuencias se encuentran en un solo sitio, un locus único del genoma, son altamente polimórficos y tienen una distribución más aleatoria en el genoma que los VNTRs (nucleótidos variables repetidos en tándem) y los RFLPs (Fries, 1993; Goodfellow, 1993). Las secuencias están conformadas por 1 a 6 nucleótidos y son conocidos como unos marcadores genéticos sensibles por su alta variabilidad (O’Connell y Wright, 1998).

Los microsatélites pertenecen al grupo del ADN no codificante, que comprende:

- Secuencias satélite: repeticiones de nucleótidos que oscilan en un rango entre

5 y 100 bases y se organizan en grupos de 100 mega bases. Se localizan en la heterocromatina, cerca de los centrómeros y los telómeros, y no varían su tamaño dentro de la población como los otros miembros de su familia.

- Secuencias minisatélite: repeticiones de nucleótidos que oscilan en un rango entre 15 y 70 bases y se organizan en grupos de 0.5 a 30 kilo bases. Se encuentran en las regiones eucromáticas del genoma y tienen alta variabilidad de tamaño dentro de la población.
- Secuencias microsatélite: repeticiones de nucleótidos que oscilan en un rango entre 2 y 6 bases y se organizan en grupos de tamaño variable (media de 100bp). Se localizan en la zona eucromática del genoma como extensiones de secuencias alternantes dT-dG de longitud variable. Siguen una transmisión de tipo Mendeliano codominante y forman una parte importante de la creciente familia de secuencias repetitivas de ADN.

El número de repeticiones puede variar, por lo que las diferencias o polimorfismo se detecta por una diferencia de tamaño, la técnica de tipificación se basa en la amplificación por PCR de la región que contiene las secuencias repetidas. Para lograrlo, se utilizan primers específicos de las regiones que flanquean la región donde se encuentra los microsatélites. Así, las diferencias en el número de repeticiones son observadas por el tamaño de los productos de PCR, después de su separación en geles de electroforesis de alta resolución.

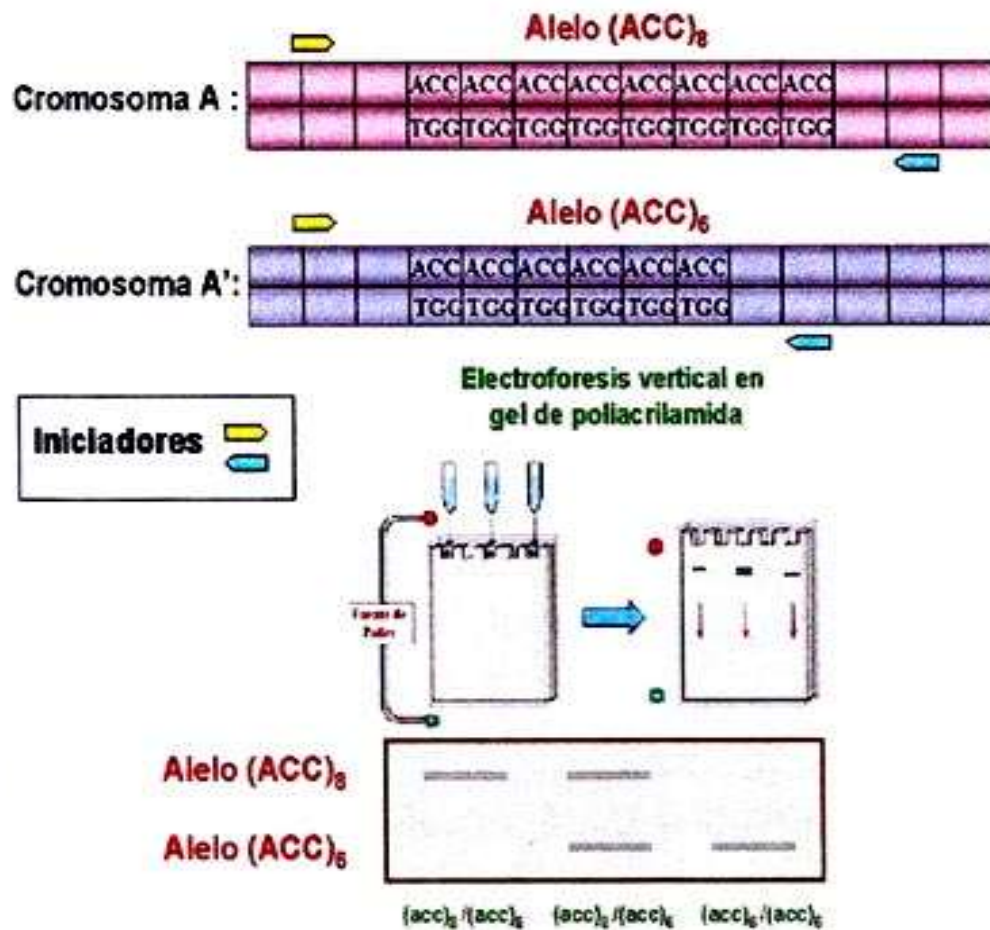


Figura. 2. Diagrama que muestra el polimorfismo de los microsatélites debido a las diferencias en su longitud. En un individuo diploide, el cromosoma A contiene el alelo (ACC)<sub>8</sub>, mientras que el cromosoma A' en el locus homólogo presenta el alelo (ACC)<sub>6</sub>. Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando iniciadores diseñados en las regiones flanqueantes, los alelos son amplificados, para luego ser separados mediante una corrida electroforética. El diagrama muestra el patrón de bandas que deben determinar tanto los homocigotos como el heterocigoto para los mencionados alelos. Tomado de (Read AP & Brown T, Eds, Bios Scientific Publishers Oxford, (1994).

A diferencia de los RADP, para implementar la técnica de los microsatélites se requiere conocer la secuencia del ADN de la región o locus que se quiere amplificar y poder diseñar los primers o iniciadores específicos requeridos para su amplificación por PCR. Esto implica que, antes de ser utilizados por primera vez, las regiones con microsatélites deben ser detectadas, secuenciadas y definidas.

Cuando estas regiones son individualmente amplificadas por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando un par de oligonucleótidos flanqueantes como iniciadores, muestran casi invariablemente polimorfismo debido a las diferencias en su longitud, como consecuencia de la presencia de los diferentes números de las unidades de repetición o motivos (Morgante y Olivieri, 1993). El origen de tal polimorfismo está aún en debate, aunque previsiblemente este se deba al evento de "resbalón" o slipagge durante la replicación del DNA (Schlotterer y Tautz., 1992, Zane et al., 2002), en el cual ya sea la cadena nueva o la cadena patrón se desliza sobre la otra en al menos un motivo, resultando en un mal apareamiento de las mismas, (Moxon y Wills, 1999). Otras posibles causas para la generación de polimorfismo se deban a otros tipos de mutaciones, como las deleciones e inserciones ya sean en el microsatélite en si o en las regiones que lo flanquean alterando el tamaño de la región microsatélite.

La frecuencia con que los cambios en el número de repeticiones aparecen en los locus de los microsatélites es mucho más elevada que las tasas normales de mutación, oscilando entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  por generación, estimaciones en humanos sugieren tasas de alrededor de  $10^{-3}$  eventos por locus por generación (Weber y Wong 1993), mientras que en ratones entre  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  (Dallas 1992), en *Drosophila* parecen ser más bajas, alrededor de  $6 \times 10^{-6}$  (Schug et al., 1997).

La selección de buenos microsatélites depende del fin perseguido, y un microsatélite bueno para una finalidad puede ser muy inadecuado para otra. Es el caso de los microsatélites cuando son usados para asignar parentesco los cuales no son convenientes cuando presentan problemas con la genotipificación (bandas stutter en microsatélites de tipo dinucleótidos) y/o segregación de alelos no mendeliana. Entre los criterios de selección destacan su tamaño, su tasa de mutación su polimorfismo, su abundancia en el genoma, su robustez, la facilidad para integrarse y la ausencia de artefactos inespecíficos. (Jones A and Ardren W,



2003).

Los microsatélites fueron inicialmente descritos en humanos, y en poco tiempo fueron hallados en otros mamíferos como el ratón y el cerdo. Su potencial como marcadores útiles para diferentes estudios fue rápidamente reconocido, resultando en su aislamiento y aplicación en muchas especies. (Rosseto *et al.*,1999).

Un limitado número de microsatélites ha sido aislado de camarones del género *Penaeus*, incluyendo un número pequeño en *P. vannamei* (García *et al.*, 1996; Bagshaw and Buckholt, 1997; Moore *et al.*, 1999; Ball *et al.*, 1998; Tassanakajon *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999; Vonau *et al.*, 1999; Broker *et al.*, 2000).

Los microsatélites han sido usados como marcadores genéticos en muchos organismos vivos tales como vacas (Beckmann y Soller 1990), oveja (Crawford *et al.*,2001), caballos (Marklund *et al.*, 1994) humanos (Weber, 1990) y especies de plantas (Gupta *et al.*, 1996). También han sido usados como marcadores genéticos de especies de bajamar (García de León *et al.*, 1995), salmón (Slettan *et al.*, 1993) ostras Europeas (Naciri *et al.*, 1995). Además han sido usados para estudiar varias especies de peneidos tales como, *Penaeus vannamei* (Wolfus *et al.*, 1997). *Penaeus japonicus* (Moore *et al.*, 1999), *Penaeus stylirostris* (Bierne *et al.*, 2000) y *Penaeus monodon* (Tassanakajon *et al.*, 1998a, b; Xu *et al.*, 1999; Brooker *et al.*, 2000; Pongsomboon *et al.*, 2000).

La caracterización genética para determinar el grado de variabilidad utilizando microsatélites ha sido reportada en diferentes especies marinas tal es el caso del estudio reportado por Rutten *et al.*, (2004), el cual estudió cuatro cepas de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) usando 14 microsatélites. En este estudio se pudo determinar un grado moderado de diferenciación entre poblaciones el valor  $F_{st}$  fue de 0.178, el número de alelos por locus se encontró entre 5.0 y 7.5 los niveles de heterocigosidad observada se encontraron entre 0.612-0.696 y los de

heterocigosidad esperada entre 0.624-0.711; en tres poblaciones el nivel de heterocigosidad se encontró significativamente desviado de lo esperado en el equilibrio de Hardy Weinberg por déficit de heterocigotos lo que fue atribuido al pequeño tamaño de la población muestreada.

También hay reportes de caracterizaciones genéticas de poblaciones de camarón como es el caso del estudio desarrollado por Goyard Emmanuel *et al.*, (2003) en donde realizó la evaluación de la variabilidad genética del camarón azul del pacífico *Penaeus stylirostris* domesticado de New Caledonia, Polinesia Francesa, Tahití y Hawái, utilizando tres microsatélites. La comparación de los grupos domesticados con respecto a los silvestres mostró baja variabilidad en especial los de New Caledonia y Tahití (2-3.7 vs. 14-27 alelos por locus; 20-60% vs. 90% heterocigosidad esperada), además se pudieron demostrar antepasados comunes entre varias poblaciones domesticadas, estos resultados demostraron la necesidad de incorporar nuevos individuos con el fin de aumentar el potencial genético de las futuras generaciones.

Otro estudio que podemos citar es el realizado por Valles-Jiménez (2004) sobre la estructura genética del camarón blanco del pacífico (*Penaeus vannamei*) en poblaciones silvestres desde México a Panamá usando cinco microsatélites en donde determinó la diversidad genética entre poblaciones estableciendo promedios del número de alelos (7.4-8.6) por locus y promedio de la heterocigosidad observada (0.241-0.388). En este estudio se observaron desviaciones del equilibrio de Hardy Weinberg por un alto déficit de heterocigotos; con excepción de un locus en la población proveniente de Guatemala, el valor  $F_{st}$  demostró que las poblaciones estaban estructuradas dentro de subpoblaciones y además se observó que la diferenciación genética no seguía un modelo de aislamiento por distancia, finalmente en este estudio se concluyó que el estudio de la diversidad y estructura genética de poblaciones de *P. vannamei* es de interés para el manejo de la acuicultura lo cual es indispensable para utilizar y preservar

la diversidad genética de estos organismos.

### **2.3.3.1 Características de los microsatélites**

El elevado polimorfismo que presentan los microsatélites y la posibilidad de identificar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales, porque es muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados para una serie de estos marcadores, compartan todos sus alelos. Para elegir el tipo de marcador a utilizar, éste debe presentar, además de las características anteriormente descritas, herencia estable (baja tasa de mutación), elevada reproducibilidad y precisión, no presentar alelos “nulos”, no estar limitado por el tipo de muestras utilizada, que no requiera grandes cantidades de ADN, y que presenten una segregación independiente con los otros marcadores al ser combinados en la prueba.

La razón principal del incremento del uso de los microsatélites como una herramienta molecular es que proveen la más alta incidencia de polimorfismo o PIC (Polymorphic Information Content) en comparación con otras técnicas como RFLPs y RAPDs (Powell *et al.*, 1996).

Poseen además, características que incluyen:

- Altamente informativos: presentan herencia codominante y muchos alelos son encontrados entre individuos estrechamente relacionados.
- Técnicamente simples: la tecnología de la PCR puede fácil y rápidamente ser utilizada para la automatización en el uso de estos marcadores.
- Técnica sensible: sólo pequeñas cantidades de DNA son requeridas.
- Analíticamente simples: los datos son producidos de forma confiable y

altamente reproducibles.

- Muy abundantes: los microsatélites están uniformemente dispersos a través del genoma, aproximadamente cada 10 Kb.
- Ampliamente aplicables: los loci son frecuentemente conservados entre especies relacionadas y algunas veces entre géneros.
- Fácil intercambio de datos entre laboratorios: la información puede ser comunicada por la simple secuencia de los iniciadores, sin la necesidad de la transferencia física de los mismos.

### **2.3.3.2 Clasificación de los microsatélites**

Chambers y MacAvoy (2000) proponen que los términos puro (o perfecto), compuesto y complejo se utilicen para especificar que uno, dos o más tipos de motivos, respectivamente, se encuentran presentes a lo largo de un locus microsatélite dado, y que el término interrumpido (o imperfecto) como un descriptor jerárquico adicional que implica una o más unidades no repetitivas en el interior de los microsatélites (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de microsatélites. Tomado de MOXON et al., (1999).

Tipo de Microsatélite	Ejemplos
STR Puro	(ACC) <sup>9</sup> un solo motivo repetido n veces en serie
STR Interrumpido puro	ACC <sup>6</sup> -TG-(ACC) <sup>7</sup> Un solo motivo repetido n veces, donde se intercalan nucleótidos entre las distintas repeticiones. Ej.: (CA) <sup>2</sup> AA(CA) <sup>12</sup>
STR Compuesto	(ACC) <sup>5</sup> -(TTG) <sup>9</sup> Dos o más motivos repetidos en serie
STR Interrumpido compuesto	(ACC) <sup>8</sup> -TG-(ACC) <sup>5</sup> -GA-(TTA) <sup>6</sup> Al menos uno de sus motivos presenta nucleótidos intercalados
STR Complejo	(ACC)-TG-(GA) <sup>12</sup> -(TTA) <sup>5</sup> -GC-(TTA) <sup>4</sup> +3 Combinaciones entre cualquiera de las clases anteriores, sin ningún patrón de orden definido

### 2.3.3.3 Aplicaciones de los microsatélites

El estudio de los microsatélites tiene implicaciones muy importantes en varios campos de la ciencia, como son: el análisis de la pérdida de heterocigosidad en determinadas regiones cromosómicas, la construcción de árboles evolutivos, identificación de parentesco, variabilidad genética, consanguinidad y de historia de poblaciones recientes. Los microsatélites también han sido utilizados para diferenciar poblaciones de varios organismos, incluyendo camarones peneidos.

En los estudios de genética poblacional, estos marcadores permiten la identificación de cada alelo por locus, y obtener datos poblacionales, calcular las frecuencias alélicas, y a partir de estas estimar las distancias genéticas entre las poblaciones o individuos (Bowcock y col. 1994; Ponsuksili y col. 1999).

Una de las principales utilidades de este tipo de marcador, es la posibilidad de estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas. Este tipo de estudio, es de gran importancia para realizar estimaciones de la diversidad genética y de la

consanguinidad existente en poblaciones de animales en peligro de extinción y en la evaluación de programas de mejoramiento genético. Durante los últimos años se han realizado muchos estudios que han utilizado los microsatélites para análisis filogenéticos, concluyendo que, con un buen número de loci investigados y con apropiadas tasas de mutación, los microsatélites pueden dar una muy buena aproximación de la filogenia (Takezaki and Nei, 1996). Probablemente este es el campo en el cual han sido más extensamente utilizados, mientras que su otro gran campo de acción ha sido para la construcción de mapas genéticos (proyecto del genoma humano y diferentes proyectos de mapas en animales), además son considerados como una poderosa herramienta para los estudios de genética de poblaciones (Cheng y Crittenden, 1994).

Actualmente se realizan una gran cantidad de trabajos utilizando los microsatélites aún antes de ser establecida la correlación entre uno o más microsatélites y los loci que controlen características de interés, la disponibilidad de un grupo de microsatélites, permite una serie de estudios importantes. Las aplicaciones incluyen, básicamente estudios de variabilidad y distancia genética, identificación y discriminación de individuos, estudios de identificación de parentesco, control de cruzamientos, y, últimamente, en la identificación y protección de variedades patentadas. Los microsatélites son fundamentales en el momento actual en los estudios de identificación humana, tanto del tipo forense como en los procesos de identificación de la paternidad. Su alto grado de polimorfismo los hace aptos para discriminar individuos, por lo tanto, los microsatélites son los más empleados puesto que permiten un análisis simultáneo de varios loci, procesamiento más rápido y automático, mínima cantidad de muestra requerida, posibilidad de mejores resultados con ADN degradado; entre los microsatélites los más utilizados en estudios de identificación son aquellos que revelan mayor polimorfismo poblacional, elevado índice de heterocigosidad y baja frecuencia de mutaciones.

Para el análisis de microsatélites existen varios formatos: uno es aquel en el que 3

o 4 microsatélites diferentes se amplifican en forma simultánea y los productos resultantes se separan mediante electroforesis vertical en geles de acrilamida. Un segundo formato utiliza la amplificación simultánea de 8 o 9 microsatélites, y los productos de amplificación se analizan con secuenciadores automáticos en donde la asignación se hace en cada caso mediante comparación con escaleras alélicas utilizadas como referencia. Más recientemente, se han desarrollado formatos que permiten la amplificación y análisis de 15 microsatélites mediante métodos fluorescentes.

#### **2.3.3.4 Limitaciones de los microsatélites**

La única limitación significativa de los microsatélites puede ser la inversión inicial de recursos económicos y la experiencia técnica requerida para la clonación, secuenciamiento e identificación de los loci. Por otro lado, entre las limitaciones técnicas podemos destacar la ocurrencia de alelos nulos ocasionados por mutaciones en el sitio de anillaje de los iniciadores y la presencia de "bandas tartamudas" (stutter). Estas últimas se encuentran frecuentemente asociadas con la amplificación de DNA repetitivo más comúnmente a los de tipo dinucleótidos. Los stutter son productos de la amplificación por PCR que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original. La ocurrencia de estos artefactos dificulta la lectura de los geles, e inclusive, pueden ser confundidos como alelos, complicando el análisis genotípico. Sin embargo estas consideraciones no son desalentadoras para seguir utilizando esta herramienta en sus diferentes aplicaciones. Una vez que las secuencias de los iniciadores son diseñadas y publicadas, el análisis de los loci microsatélites es práctico para cualquier laboratorio capaz de realizar las técnicas de PCR y electroforesis. El ahorro en tiempo y recursos puede ser mejorado desarrollando PCR múltiple, el cual permite la amplificación y la recolección de datos simultánea de múltiples loci con una sola muestra de DNA en una simple reacción de PCR y en una sola línea del gel de electroforesis. (Brown et al., 1996).

## **2.4. ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA**

La diversidad o variabilidad genética se puede definir como “la capacidad genética para cambiar”, y por ende la habilidad de un individuo de responder tanto a variaciones de índole ambiental (temperatura, oxígeno, etc.) como a cambios en los objetivos de selección (resistencia a patógenos, crecimiento etc.). Es así, que la variabilidad genética constituye la base del progreso genético (Rochambeau et al., 2000). Puede ser medida, a través de una gran cantidad de técnicas estadísticas que cuantifican la variabilidad genética y resumen la información en términos más manejables. Cada uno de estos estadísticos explica diferentes aspectos de la variabilidad genética y su utilidad práctica estará en función del objetivo del estudio.

La variabilidad genética intrapoblacional se puede detectar por medio de los microsatélites, siendo este un instrumento eficaz en el estudio y determinación de las diferencias existentes dentro de las poblaciones. Esto puede hacerse de diversas formas, se utiliza generalmente la proporción de locus polimórficos, número de alelos por locus, número efectivo de alelos, y la heterocigosidad, entre otros; para lo cual existen diferentes programas bioinformáticos que facilitan la obtención de esta información.

La divergencia evolutiva entre poblaciones se puede estimar sobre la base de sus frecuencias génicas y así estimar la diferenciación existente entre ellas, para estos análisis se utiliza el cálculo de los índices de distancia genética que permiten establecer comparaciones y determinar relaciones filogenéticas y los análisis de la estructura de la población, mediante el uso de los F-estadísticos (Wright, 1965; Nei, 1977; Weir y Cockerham, 1984); análisis este que permite determinar el déficit o exceso de heterocigotos en la población y ello a su vez permite determinar el nivel de consanguinidad dentro de las poblaciones.



Las medidas de distancias genéticas entre poblaciones proveen información muy importante acerca de las relaciones genéticas existentes entre razas y/o líneas, ayudando a seleccionar y priorizar aquellas a ser conservadas. Existen actualmente diversas distancias genéticas que pueden ser utilizadas para este fin; sin embargo, se han realizado análisis de simulación para ver cuál de ellas se ajusta mejor a los estudios con microsatélites (Takezaki y Nei, 1996; Nagamine y Higuchi, 2001). Los resultados indicaron que las mejores distancias, utilizando microsatélites, resultaron ser la distancia “DA” de Nei (Nei col. 1983) y la distancia de cuerda (DC, Cavalli-Sforza y Edwards, 1967), ambas con el algoritmo neighbor-joining (NJ) como método de reconstrucción filogenética; y cuando el principal interés fuera la correcta asignación de la topología. Mientras que, la distancia estándar de Nei ( $D_s$ , Nei, 1972) y la distancia  $(d_m)^2$  de Goldstein *et al.*, (1995), serían de elección cuando el principal interés fuera la estimación de los tiempos evolutivos. Esto es debido al patrón de mutación que presentan los microsatélites. Al explorar los procesos evolutivos que forman la variación genética hay que describir la estructura genética de una población, lo cual se logra enumerando los tipos y las frecuencias de genotipos y alelos en una población, por medio de la genética poblacional utilizando modelos matemáticos.

#### **2.4.1 Calculo de frecuencias genotípicas**

Una frecuencia es simplemente una proporción o un porcentaje, que se expresa como una fracción decimal. Por ejemplo, si el 30% de los alelos en un locus particular en una población es A, diríamos que la frecuencia del alelo A en la población es 0,30. En el caso de poblaciones grandes, en las que no es práctico determinar los genes de todos los individuos, suele tomarse una muestra de individuos provenientes de la población y se calculan las frecuencias genotípicas y alélicas para esa muestra. Luego, las frecuencias genotípicas y alélicas de la muestra se utilizan para representar el conjunto génico de la población.

Para calcular una frecuencia genotípica se suma la cantidad de individuos que poseen un determinado genotipo y dividimos por el número total de individuos en la muestra (N). Para un locus con tres genotipos, AA, Aa y aa, la frecuencia (f) de cada genotipo es:

$$f(AA) = \frac{\sum \text{número de individuos AA}}{N}$$

$$f(Aa) = \frac{\sum \text{número de individuos Aa}}{N}$$

$$f(aa) = \frac{\sum \text{número de individuos aa}}{N}$$

La suma de todas las frecuencias genotípicas siempre es igual a 1.

#### **2.4.2 Cálculo de frecuencias alélicas**

Las frecuencias alélicas se pueden determinar de las frecuencias genotípicas de esta forma los genotipos que conforman una población también pueden describirse en términos de frecuencias alélicas. Siempre hay menos alelos que genotipos; de modo que el conjunto génico de una población puede describirse en términos menores cuando se utilizan las frecuencias alélicas. El cambio de las frecuencias génicas es la base de la evolución, que puede ser definida como el cambio de la composición génica de las poblaciones a través del tiempo y la conversión de las variaciones dentro de la población en variaciones entre poblaciones en el proceso de especiación, Jenkins, (1982).

Las frecuencias alélicas pueden calcularse a partir de los números o de las frecuencias de los genotipos. Para calcular la frecuencia alélica a partir de los números de genotipos, contamos el número de copias de un alelo particular presente en una muestra y dividimos por el número total de todos los alelos en la muestra:

Frecuencia de un alelo= número de copias del alelo/ número de copias de todos los alelos en el locus.

En el caso de un locus con solo dos alelos (A y a) las frecuencias de los alelos suelen representarse por los símbolos p y q y pueden calcularse de la siguiente manera:

$$P = F(A) = (2n_{AA} + n_{Aa}) / 2N$$

$$Q = F(a) = (2n_{aa} + n_{Aa}) / 2N$$

Donde  $n_{AA}$ ,  $n_{Aa}$  y  $n_{aa}$  representan los números de individuos AA, Aa y aa y N representa el número total de individuos en la muestra. Dividimos por 2N porque cada individuo diploide tiene dos alelos en un locus. La suma de las frecuencias alélicas siempre es igual a 1 ( $p+q = 1$ ); de modo que después de obtener p, q puede determinarse por la sustracción:  $q = 1-p$

De manera alternativa las frecuencias alélicas pueden calcularse a partir de las frecuencias genotípicas. Para esto sumamos la frecuencia del homocigoto para cada alelo a la mitad de la frecuencia del heterocigoto porque la mitad de los alelos del heterocigoto es de cada tipo:

$$P = f(A) = f(AA) + \frac{1}{2} f(Aa)$$

$$Q = f(a) = f(aa) + \frac{1}{2} f(Aa)$$

Si calculamos las frecuencias alélicas a partir de los números de genotipos o de las frecuencias genotípicas obtenemos los mismos valores de p y q.

### 2.4.3 Ley de Hardy -Weinberg:

La ley de Hardy- Weinberg fue formulada en forma independiente por Godfrey H. Hardy un matemático de la Universidad de Cambridge y Wilhelm Weinberg un médico alemán en 1908, los cuales trabajando independientemente descubrieron los principios básicos de la genética de poblaciones. En realidad la ley es un modelo matemático que evalúa el efecto de la reproducción en las frecuencias genotípicas y alélicas de una población (Pierce 2005). En genética de poblaciones, el principio de Hardy-Weinberg (PHW) (también llamado equilibrio de Hardy-Weinberg o ley de Hardy-Weinberg), establece que “en una población con reproducción sexual y cruzamientos aleatorios, se establece un equilibrio en las frecuencias alélicas, y que la frecuencia de cada alelo permanece constante de generación en generación” Jenkins, (1982). Este principio se cumple mientras se den las siguientes condiciones:

- La población sea suficientemente grande como para minimizar el efecto de la deriva genética); o como para que los errores de muestreo sean despreciables.
- Sea diploide, y el carácter en consideración sea autosómico.
- Se reproduzca sexualmente, bien monoicamente (ambos sexos en un mismo individuo como por ejemplo en las plantas) o dioicamente (los gametos masculinos y femeninos son portados por individuos distintos de la misma especie.
- Que exista apareamiento aleatorio en la población, y que esta no esté afectada por:
  - Selección.

- Mutación.
- Migración (flujo genético).

Este equilibrio se puede representar en una función; con un locus con dos alelos A y a, con frecuencias alélicas de p y q respectivamente, el principio de Hardy Weinberg predice que:

La frecuencia genotípica para el homocigoto dominante AA es  $p^2$ ,

La del heterocigoto Aa es  $2pq$  y

La del homocigoto recesivo aa, es  $q^2$

Donde:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Esta ley indica que, cuando se cumplen los supuestos, la reproducción por sí sola no altera las frecuencias alélicas ni genotípicas y las frecuencias alélicas determinan las frecuencias de los genotipos. Además se aplica a un locus individual. Ninguna población real se aparea al azar para todos los rasgos; ni hay una población completamente libre de selección natural para todos los rasgos. Sin embargo la ley no requiere el apareamiento aleatorio ni la ausencia de selección, migración y mutación para todos los rasgos; requiere estas condiciones solo para el locus en consideración. Una población puede hallarse en equilibrio de Hardy-Weinberg para un locus pero no para otros.

#### **2.4.3.1 Desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg**

La ley de Hardy Weinberg nos predice los genotipos esperados en una población, sin embargo podemos encontrar desviaciones en los valores

esperados cuando no se cumplen las condiciones que esta ley establece.

- Por ejemplo; la ley establece que cuando en la población existe un apareamiento aleatorio esta tendrá las frecuencias genotípicas especificadas (llamadas proporciones de Hardy Weinberg), sin embargo cuando esto no ocurre lo cual puede estar dado por diferentes mecanismos como endogamia (aumenta homocigosidad en todos los genes), emparejamiento selectivo (aumenta homocigosidad en los genes seleccionadas implicado en el carácter de interés) y la deriva genética (cambian las frecuencias genotípicas por poblaciones muy pequeñas) estas proporciones de Hardy Weinberg se pierden.
- La selección, en general, hace que cambien las frecuencias alélicas, la selección direccional o positiva favorece un solo alelo y por esto las frecuencias alélicas se encaminan en una dirección y finalmente lleva a la pérdida de todos los alelos excepto el favorecido, otras formas de selección, como la selección balanceada (se favorecen varios alelos, y la estabilizadora, negativa o purificadora (elimina mutaciones no deseadas y previene las divergencias en forma y función de los individuos de una población ,conduce a un equilibrio sin pérdida de alelos.
- La mutación tendrá un efecto mínimo en las frecuencias alélicas. Los ritmos de mutación son del orden de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  y el cambio en las frecuencias alélicas será, como mucho, del mismo orden.
- La migración enlaza genéticamente dos o más poblaciones. En general, las frecuencias alélicas se harán más homogéneas entre las dos poblaciones. Algunos modelos de migración incluyen inherentemente el apareamiento no aleatorio (el efecto Wahlund, por ejemplo; este fenómeno se produce cuando dentro de una población existen subpoblaciones aisladas genéticamente que posiblemente tienen un origen común, pero cuyas

frecuencias alélicas difieren debido a la deriva genética al azar. (Robertson & Hill, 1984; Castric *et al.*, 2002).

#### **2.4.3.2 Tests de significancia de la desviación**

La evidencia de la desviación del Principio de Hardy Weinberg (PHW) se suele llevar a cabo utilizando la prueba Chi-cuadrado de Pearson, utilizando las frecuencias genotípicas observadas directamente en la población en estudio y las frecuencias genotípicas esperadas obtenidas mediante el PHW. En la actualidad existen programas bioinformáticos de mucha ayuda en el procesamiento de esta información, que permiten un análisis ágil y seguro.

El azar desempeña un papel crítico en los cruzamientos genéticos, de allí la importancia en el uso de la prueba de  $\chi^2$  (*chi* cuadrado) la cual es una herramienta que nos sirve para evaluar cual es la influencia que está ejerciendo el azar y si es posible que el azar sea el responsable de la desviación entre los números observados y esperados. (Pierce 2006).

Esta prueba nos brinda información acerca del ajuste correcto entre los valores observados a los valores esperados, esta prueba no puede decirnos si el cruzamiento genético se ha realizado en forma correcta, si los resultados son correctos ni si hemos elegido la explicación correcta para esos resultados. Lo que sí puede indicarnos es la probabilidad de que las diferencias entre los valores observados y los esperados se deban al azar. Es decir, indica la probabilidad de que sea únicamente el azar el que haya producido las desviaciones entre los valores esperados y los observados. Cuando la probabilidad calculada mediante esta prueba es alta, presumimos que el azar produjo la diferencia. Cuando la probabilidad es baja, presumimos que otro factor distinto del azar (algún factor significativo) produjo la desviación. El nivel de probabilidad que se utiliza generalmente en esta prueba es de 0.05 como su valor de línea de corte: si la

probabilidad de que el azar sea el responsable de la desviación observada es igual o mayor de 0.05 suponen que las diferencias observadas se deben al azar. Cuando esta probabilidad es menor de 0.05 aceptan que el azar no es responsable de la desviación y existe una diferencia significativa. La expresión diferencia significativa quiere decir que algún factor distinto al azar es responsable de que los valores observados sean diferente de los esperados. (Pierce 2006).

#### **2.4.3.3 Flujo de Genes o Migración**

El ingreso de genes provenientes de otras poblaciones aisladas geográficamente puede provocar cambio en las frecuencias alélicas. En la ley de Hardy-Weinberg se establece que la migración no tiene lugar, pero muchas poblaciones naturales experimentan la migración de otras poblaciones. El efecto de la migración puede darse por dos vías, primero previniendo la divergencia genética entre las poblaciones, produce una mayor similitud entre las dotaciones génicas de dos poblaciones; la migración tiende a mantener las poblaciones homogéneas en sus frecuencias alélicas) y segundo aumentando la variación genética dentro de las poblaciones, diferentes alelos pueden originarse en poblaciones diferentes debido a acontecimientos mutacionales ocasionales y estos alelos pueden diseminarse a poblaciones nuevas por migración y aumentar la variación genética dentro de la población receptora. Existen varios factores determinantes en el flujo de genes entre poblaciones; uno de los más importantes lo constituye la movilidad de los organismos el cual en los animales es más significativo por ser de naturaleza nómada. Una mayor movilidad tiende a darle más potencial migratorio a un individuo y de esa forma llevar sus genes a otras poblaciones. La migración con la consecuente transferencia de genes entre diferentes poblaciones constituye una fuente importante de variabilidad genética la cual en estos casos se denomina transferencia genética horizontal. (Pierce, 2005).

#### **2.4.3.4 Deriva genética**



Poblaciones con un bajo número de individuos causan cambios en las frecuencias genotípicas, especialmente si la población es demasiado pequeña. Esto es debido al efecto de muestreo. El principio de Hardy-Weinberg establece en sus reglas que las poblaciones a partir de las cuales se producen los apareamientos aleatorios son lo suficientemente grandes como para que los descendientes simbolicen completamente los genes de sus parentales: este apareamiento en poblaciones infinitamente grandes junto con la selección natural actúan para producir los cambios en los individuos de una población través del tiempo. Pero la realidad nos muestra que el tamaño de las poblaciones es limitado y esto produce que solo una parte de los genes parentales se encuentren en la descendencia, en este caso el azar puede producir una desviación del conjunto génico parental lo que se refleja en el cambio de las frecuencias alélicas, estos cambios al azar producidos en las frecuencias alélicas se transmiten de generación en generación y son bastante evidentes en poblaciones con un pequeño número de individuos, ya que en estas se tienden a perder los alelos que tienen una menor frecuencia y por ende se ve afectada la variabilidad genética de la población (Pierce, 2005).

Combinando la genética teórica de las poblaciones con los datos de la evolución molecular Kimura en 1983, desarrolló la teoría neutralista de la evolución molecular en la que la deriva genética aparece como la principal fuerza de cambio de las frecuencias de los alelos. La deriva genética ha sido reportada por varios autores como responsable de cambios significativos en las frecuencias. (Laikre et al., 1998; Østergaard et al., 2003).

## 2.5 DIVERGENCIA GENÉTICA ENTRE POBLACIONES

### 2.5.1 F-estadísticos ( $F_{IT}$ , $F_{ST}$ , y $F_{IS}$ )

Los F-estadísticos de Wright's 1965 (también conocidas como índices de la fijación) fueron diseñados originalmente para medir la cantidad de alelos fijados debidos a la presión de selección genética, estos índices son los indicados cuando se quiere estudiar la diferenciación genética existente entre subpoblaciones. Pueden usarse como una medida de correlación en poblaciones genéticamente subdivididas (subpoblaciones) la cual puede estar influenciada por varios procesos evolutivos, como mutación, migración, endogamia, selección natural, o efecto Wahlund. La estructuración en subpoblaciones más o menos aisladas genera alteraciones y/o fluctuaciones en las frecuencias alélicas y en los genotipos; lo cual podemos determinar calculando los estadísticos descritos por Wrights.

El coeficiente estadístico  $F_{IS}$ , mide las correlaciones existentes entre dos gametos sacados al azar de una subpoblación. El  $F_{IT}$  se refiere a las correlaciones existentes entre dos gametos sacados al azar del total de la población y el  $F_{ST}$  es la correlación existente entre dos gametos sacados al azar de diferentes subpoblaciones (Wright 1965). Estos parámetros se relacionan mediante la siguiente fórmula:

$$1-F_{IT} = (1-F_{IS}) (1-F_{ST})$$

#### 2.5.1.1 $F_{IS}$

Estos conceptos fueron reevaluados por Nei (1977) y Wright's (1978) abandonando el concepto de correlación y haciéndolo extensivo para el caso de alelos múltiples, Nei demostró que todos los índices de fijación pueden ser definidos usando las heterocigocidades observadas y esperadas de las

poblaciones. De esta forma podemos describir los estadísticos  $F_{IS}$  como la medida del exceso o déficit de heterocigotos en cada subpoblación, puede tener valores que van desde -1 (exceso de heterocigotos) hasta 1 (exceso de homocigotos) (Avice, 1994). El valor de  $F_{IS}$  es el coeficiente de consanguinidad de un individuo relacionado con la subpoblación usando las subpoblaciones y el promedio de ellas.

#### **2.5.1.2 $F_{IT}$**

El  $F_{IT}$  lo podemos definir como la medida del exceso o déficit de heterocigotos de un individuo comparado con el total de la población, pudiendo tomar este índice valores negativos o positivos. (Wright's 1978)

#### **2.5.1.3 $F_{ST}$**

El valor del coeficiente  $F_{ST}$  se define como la medida de la diferenciación genética existente entre las subpoblaciones; un valor  $F_{ST}$  igual a cero indicaría que no existen diferencias entre las subpoblaciones y por ende serían idénticas; el valor de este índice siempre oscila entre valores de 0 a 1 indicando los valores más grandes mayor diferenciación genética de las poblaciones, siendo a la vez útil como medida de la distancia genética entre las poblaciones (Gregorius y Roberds 1986).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la variabilidad genética de la semilla de *Penaeus vannamei* producida en Colombia.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar el número de alelos, las frecuencias alélicas, y el porcentaje de heterocigosidad de 5 (cinco) locus de microsatélites en 5 (cinco) poblaciones de *Penaeus vannamei* cultivadas en Colombia.
- b) Calcular el grado de divergencia de todas las poblaciones determinando el valor  $F_{ST}$  para cada microsatélite.
- c) Calcular el grado de consanguinidad para todos los locus en todas las poblaciones analizadas determinando el valor de  $F_{IS}$ .
- d) Comparar estos valores en las poblaciones provenientes de diferentes líneas de selección masal y de selección familiar.
- e) Determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los locus en todas las poblaciones analizadas.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 TIPO DE ESTUDIO**

Descriptivo y comparativo entre las poblaciones a estudiar. Se considera descriptivo ya que está limitado a la observación y a describir los genotipos y las frecuencias alélicas que determinan la variabilidad genética de las poblaciones evaluadas; se planteó este tipo de estudio debido a la escasa información sobre el estado de la variabilidad genética de la semilla de *Penaeus vannamei* producida en Colombia.

### **4.2 POBLACIÓN DE REFERENCIA**

Anualmente en CENIACUA se producen tres lotes de 70 familias de hermanos enteros y medios hermanos para su evaluación en campo y laboratorio. Las familias que componen el núcleo genético, son mantenidas en el laboratorio de CENIACUA en punta canoa, donde son levantadas independientemente hasta alcanzar el peso mínimo de marcación con elastómeros (1gr). Después de la marcación, una muestra aleatoria de animales de cada familia es evaluada para resistencia a enfermedades en pruebas de desafío controladas, y para crecimiento y sobrevivencia en piscinas de producción bajo condiciones comerciales de cultivo. Para este estudio de evaluación de la variabilidad genética de las poblaciones se utilizaron camarones de los lotes de selección familiar 17, 18 y 19 ya que correspondían a los lotes disponibles y vigentes en el momento que se planteo la problemática.

Animales de selección familiar: Todos los animales de los lotes 17, 18 y 19 que se encuentran en las instalaciones de Ceniagua (sede Punta Canoa) , constituido cada lote por 70 familias.

Animales de selección masal: Todos los individuos que se encuentran en las fincas de Caicsa y Tigua criados bajo el sistema de selección masal.

### **4.3 MUESTRA**

#### **4.3.1 Animales de los programas de selección masal.**

El segundo grupo de camarones fueron suministrados por dos fincas camaroneras (Caicsa y Tigua) en las cuales se seleccionan camarones *P. vannamei* basados en las características fenotípicas de los animales (selección masal); de estas poblaciones aproximadamente se han producido diez generaciones (F10) (comunicación personal CENIACUA). Se tomaron 50 individuos por población.

Población 1: Masal Caicsa

Población 2: Masal Tigua

#### **4.3.2 Animales del programa de selección familiar e individual.**

Los camarones de la especie de *P.vannamei* obtenidos por selección familiar e individual con un peso promedio de 18.2 gr. fueron suministrados por el programa de mejoramiento genético de CENIACUA. De estas poblaciones se tomaron muestras de 50 animales de tres lotes diferentes:

Población 3: Familiar Lote 17 (obtenido del cruce de individuos de los lotes 13, 14, 15).

Población 4: Familiar Lote 18 (obtenido del cruce de individuos de los lotes 14 y 15).

Población 5: Familiar Lote 19 (obtenido del cruce de individuos de los lotes 15,

16,17).

#### 4.3.3. Diseño del Muestreo

Con el fin de garantizar que el muestreo de todas las poblaciones fuera similar y que se incluyeran animales con la mayor diversidad posible se diseñó la siguiente estrategia de muestreo:

El día anterior al muestreo se tomaron 100 animales al azar de la piscina los cuales se midieron y pesaron. Se estableció el peso promedio y la desviación estándar de los pesos para las poblaciones.

Se calcularon: peso promedio, y los pesos para animales con 0.5, 1, 1.5 y 2 desviaciones estándar por encima y por debajo del peso promedio. De cada grupo de peso se tomaron 5 animales y del peso promedio se tomaron 10 animales. De esta manera se trata de incluir una muestra lo más representativa de toda la población. (Tabla 2).

Tabla 2. Fechas de muestreos y pesos de los individuos de cada población

Población	Fecha d/m/año	Peso Promedio g	Desvest	+ 0.5	+ 1	+ 1.5	+ 2	- 0.5	- 1	- 1.5	- 2
Masal Caicsa	8/10/06	15	2.3	16.3	17.5	18.7		13.8	12.5	11.3	10.11
Masal Tigua	13/12/06	7.4	3.4	9.1	10.8	12.6	14.3	5.6	3.9	2.2	0.5
Familiar L17	01/06/06	18.6	2.5	19.9	21.2	22.5	23.8	17.4	16.1	14.8	13.5
Familiar L18	9/10/06	18.1	2.4	19.3	20.4	21.6	22.8	16.9	15.7	14.5	13.3
Familiar L19	3/05/07	15	3.15	16.5	18.1	19.7	21.3	13.4	11.8	10.2	8.6

#### 4.4. Estandarización de la extracción y purificación de ADN.

De cada animal seleccionado se tomaron muestras de pleópodos, los cuales fueron conservados con etanol de grado analítico al 95% para la extracción

posterior del ADN. Inicialmente se evaluaron dos protocolos de extracción de ADN para así poder determinar con cuál de ellos se obtenía una mejor calidad de ADN.

#### **4.4.1. Extracción de ADN usando el sistema de Clontech (Nucleospin)**

Este sistema se basa en el empleo de una columna de sílica para atrapar el ADN y eliminar las proteínas e inhibidores y posteriormente diluirlo en agua destilada.

Para DNA genómico de tejidos animales se realizó de la siguiente manera:

- Preparación de muestras

Se cortaron en pequeñas piezas 25 mg los pleópodos de cada individuo y se colocaron en un tubo de microcentrífuga.

- Pre-Lisis

Se adiciono 180 µl de buffer T1 y 25 µl de la solución de proteinasa K, se llevaron al vortex y se mezclaron. Se aseguro que la muestra quedara completamente cubierta con el buffer de lisis. Se Incubo a 56°C hasta obtener una lisis completa. Ocasionalmente durante la incubación se llevo al vortex.

- Lisis

Se llevaron las muestras al vortex. Se adicionaron 200µl de buffer B3, y se colocaron en el vortex logrando una agitación vigorosa posteriormente se incubaron a 70°C por 10 minutos, y se mezclaron brevemente.

- Ajustando las condiciones de fijación del DNA

Se adicionaron 210 µl etanol al (96-100%) se mezclo y agito vigorosamente en el vortex.



## DNA

Se colocó cada muestra en una columna de NucleoSpin Tissue y en un tubo de colección de 2 ml. Se centrifugó por 1 minuto a 11.000 rpm. Se descartó el líquido filtrado del tubo de colección

- Lavado de la membrana de sílica

Primer lavado: Se adicionaron 500 µl de buffer BW. Se centrifugó por 1 minuto a 11.000 rpm, se descartó el líquido filtrado del tubo de colección.

Segundo lavado: Se adicionaron 600 µl del buffer B5 a la columna y se centrifugó por 1 minuto a 11.000 rpm.

Se descartó el líquido filtrado que quedó dentro del tubo de colección

- Secado de la membrana de sílica

Se centrifugó la columna por 1 minuto a 11.000 rpm. El etanol residual se removió durante este paso.

- Elución del DNA de alta pureza

Se colocó la columna Nucleospin Tissue en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se adicionó el buffer de elución BE previamente calentado a 70°C. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Se centrifugó por 1 minuto a 11.000 rpm. Se retiró la columna y se guardó el DNA a 4 °C

### **4.4.2 Extracción de ADN usando isotiocianato de guanidinio**

Este sistema está basado en el uso de un agente caotrópico como es el Isotiocianato de guanidinio y la posterior precipitación del ADN con Isopropanol.

- Se desechó el alcohol en el cual se conservó la muestra.

- El tejido fue lavado dos veces con 500  $\mu$ l de solución de lavado (TE 1X), centrifugándolo cada vez a 14000 r.p.m. por 5 minutos.
- Se desecho toda la solución de la última lavada y se macero el tejido con una punta normal de 1000 $\mu$ l sellada con calor, adaptada al taladro.
- Se adicionaron 400 $\mu$ l de Tiocianato de Guanidio.
- Se incubo a 60°C por 30 minutos
- Se centrifugo a 8.000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante fue llevado a un tubo nuevo
- Se adiciono un volumen de isopropanol y se centrifugo por 15 minutos a 14.000rpm
- Se adiciono un volumen de etanol al 70% y se centrifugo a 13.000rpm por 5 minutos
- El sobrenadante fue eliminado y el precipitado se dejo secar a temperatura ambiente
- El DNA obtenido se resuspendio en 100 $\mu$ l de TE 1X

Tres muestras de pleópodos fueron extraídas en paralelo utilizando los dos protocolos, la calidad del ADN fue verificada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, por último se probó la capacidad de las muestras de ADNs de ser amplificadas por PCR y este sentido se realizo un ensayo en donde fueron amplificados en dos reacciones independientes de PCR utilizando los iniciadores del microsatélites P van 1815. La verificación de la calidad de los productos amplificados se realizo en geles de agarosa al 4% (3% Nusieve 1% SeaKem).

## **4.5 Genotipificación**

### **4.5.1 Selección de los microsatélites**

Se realizó una revisión de la literatura y se identificaron 48 microsatélites con polimorfismo demostrado en poblaciones de *P.vannamei*. Posteriormente se

seleccionaron en forma preliminar 10 microsatélites los cuales se muestran en la Tabla 3.

Cada uno de los iniciadores fue evaluado con el programa Oligo 6 con el fin de determinar la presencia de estructura de ADN en horquilla o dímeros de primer y las temperaturas de anillaje. De estos diez iniciadores se descartaron 4 porque presentaron formación de estructuras secundarias indeseables y uno por formación de bandas tartamudas los cuales interferían en la genotipificación de las poblaciones; después de este tamizaje se escogieron 5 microsatélites (pvan 535, pvan 538, pvan 832, pvan 1758 y pvan 1815) para realizar la caracterización de la variabilidad genética de las poblaciones.

Tabla 3. Características de los microsatélites seleccionados para la caracterización de la variabilidad genética del camarón *Penaeus vannamei*

MIC	Iniciador Forward 5'-3'	Iniciador Reverse 5'-3'	T°C Anillaje	NN	%GC	2 (A+T)	NN2	%GC2	2(A+T)2	Pb	alelos	Hh%
535	CTGCTAATTGAATTT TCAGG	ACAGATAACCTAACT GACGC	47-52	57.8	67	54	56.5	71.1	58	143	5	46
538	CCTTTATGACTTCCC CCGAC	CCGTACAGAAACGG AACGTC	55-56	65.8	75.2	62	65.2	75.2	62	215	8	84
1758	TATGCTCGTTCCTT TGCTT	TTGAAGGAAAAGTGT TGGGG	54-53	65	71.1	58	64.8	71.1	58	191	14	49
1815	GATCATTGCCCCCT CTTTTT	ATCTACGGTTCGAG AGCAGA	55-53	65.7	71.1	58	61	73.2	60	131	12	53
832	TTACCGCCTAAGAG CGAATG	TGTCCTTTCGTACCA GTCAAG	55-54	65.7	73.2	60	62.4	73.4	62	220	8	67

#### 4.5.2 Amplificación de los microsatélites

La amplificación se realizó por medio de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en un termociclador PTC 200 de BIORAD. Se probaron diferentes protocolos de amplificación, realizando cambios en los reactivos y en las concentraciones de los mismos, dependiendo de las características de las secuencias de los primers hasta obtener las mejores condiciones, las cuales se evidenciaron por la calidad del producto final amplificado y secuenciado.

Los mejores resultados para el microsatélite Pvan 1758 se lograron modificando el tampón de amplificación. Tabla 4.

Tabla 4. Reactivos y concentraciones utilizados para la amplificación por PCR del microsatélite 1758

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen (ul)	Concentración Final
Agua desionizada estéril		9.64	
Buffer de PCR	10X de 677mM Tris-HCl pH 8.0, 166mM Sulfato de Amonio, 14.4mM Betamercaptoetanol,	1.5ul	
dNTPs	1.25 mM	3.2 ul	200 ul M
MgCl <sub>2</sub>	20 mM	2 ul	2.0 mM
Iniciadores	5 pmol / ul	0.8 ul	5 pmol / reacción
DMSO (Dimetil Sulfóxido)		1.4 ul	7.5%
Taq DNA Polimerasa	5 unidades (U) / ul	0.2 ul	1.0 U / reacción
Volumen total		19 ul	

Para los microsatélites Pvan 535, Pvan 538, Pvan 832 y Pvan 1815 los resultados óptimos se lograron con el protocolo para la amplificación por PCR que se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Reactivos y concentraciones utilizados para la amplificación por PCR para los microsatélites 535, 538, 832 y 1815.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración Final
Agua desionizada estéril		9.64 $\mu$ l	
Buffer de PCR	10X	2 $\mu$ l	1X
dNTPs	1.25mM	3.2 $\mu$ l	200 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2 $\mu$ l	2.0mM
Iniciadores	5 pmol/ $\mu$ l	0.8 $\mu$ l	5 pmol/reacción
BSA		1.16 $\mu$ l	
Taq Polimerasa	5 unidades (U) $\mu$ l	0.25 $\mu$ l	1.25U/reacción
Volumen total		19 $\mu$ l	

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un termociclador de BioRad PTC 200. Se diseñó un programa para cada microsatélite basado en dos temperaturas de anillaje, una temperatura inicial por 5 ciclos y la segunda temperatura 10 grados menor que la primera por 25 ciclos. Con este sistema de “touchdown:” se trató de disminuir el riesgo de que se presentaran alelos nulos por falta de amplificación. Para la amplificación de todos los microsatélites se empleó el siguiente programa, las temperaturas de anillaje variaron de acuerdo al microsatélite amplificado y se especifican en la tabla 3.

#### Programa PCR:

Denaturación inicial: 94°C por 4 minutos  
 Denaturación: 5 ciclos de: 95°C por 20 segundos  
 Primera T<sup>o</sup> anillaje: 20 segundos  
 Extensión: 72°C 20 segundos  
 Denaturación: 25 ciclos a 95°C por 20 segundos  
 Segunda T<sup>o</sup> anillaje 20 segundos  
 Extensión: 72°C 20 segundos  
 Extensión final: 72°C por 4 minutos.  
 Mantenimiento final: 4°C

### **4.5.3 Detección de los productos amplificados**

Realizada la PCR de cada uno de los microsatélites se realizó electroforesis en gel de agarosa 4% (2% Seakem 2% NuSieve) a 15 V y por 15 minutos para asegurar la presencia de producto amplificado.

### **5.5.4 Procedimiento para la detección de los productos amplificados**

Posteriormente se realizó la detección de los amplificados en un secuenciador AFLP II express por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida polimerizado por UV (ReproSet TM); el gel utilizado esta indicado para la detección de genotipos y secuenciación de fragmentos de hasta 450 bases (gel de alta resolución). En cada corrida se incluyeron un control externo en forma de marcador de peso molecular de 50-500 pares de bases y un marcador interno de 100 pares de bases el cual se añadió en cada muestra para controlar las variaciones en la corrida. Cada uno de los iniciadores forward se marcó con CY5 en el extremo 5' lo que permitió la detección de los genotipos por medio de fluorescencia.

#### **4.4.4.1 Montaje y polimerización del gel de poliacrilamida**

- Limpieza del cassette  
Para mejores resultados y una óptima polimerización, se limpiaron los vidrios del plato por ambos lados.
- Se realizo tratamiento con bind –silane en el termo plato y en la tapa de vidrio 2-3 cm. de la parte superior. (Bind- silane es tóxico y altamente volátil siempre se deben usar guantes y mascarilla).
- Ensamblaje del cassette: Se tomaron los espaciadores y se colocaron al lado derecho e izquierdo del termo plato, se coloco la tapa de vidrio sobre el termo plato, cuidadosamente se bajo el plato de vidrio hacia el termo plato y

se chequeo que los espaciadores de vidrio permanecieran en la posición correcta.

- Se colocaron los cuatro pares de clips a lo largo de la parte derecha e izquierda del cassettes, siendo cuidadosos al colocar el par de clip que van cerca del láser, estos fueron ubicados a unos pocos centímetros antes del láser.
- Se colocó el peine de 0,5 mm entre el termo plato y la tapa de vidrio en el borde superior del cassette
- Para realizar la polimerización del gel por luz UV se colocó el cassette en el centro del reproset, usando las marcas puestas en el.

La solución del Reprogel (gel de poliacrilamida) es proporcionada en dos botellas: una grande transparente (solución A) y una pequeña blanca (solución B). Se mezclaron las soluciones poniendo la solución de la botella pequeña dentro de la solución de la botella grande. (Se usaron guantes y se evito el contacto con las soluciones) evitando además la formación de burbujas.

Se coloco la solución suavemente a lo largo de la hendidura que se encuentra entre el termoplato y la tapa de vidrio, evitando la formación de burbujas.

- Se encendió la lámpara del el Reproset por 10 minutos
- Después de la polimerización el gel debe usarse inmediatamente aunque puede ser guardado hasta por una hora a temperatura ambiente.

#### **4.5.4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida.**

Las condiciones de la mezcla para la electroforesis en gel de poliacrilamida se observan en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de la mezcla para la electroforesis en gel de poliacrilamida

	DNA amplificado	Marcador 100 pb	Marcador 50-500 pb	Colorante de carga
Muestras	5µl	1µl		3µl
Marcador 100pb		1µl		3µl
Marcador 50- 500pb			3µl +3µl de TE 1X	3µl

El programa de electroforesis empleado fue el siguiente:

Tiempo de corrida 300-400 minutos. (Dependiendo del tamaño del producto esperado en cada microsatélite). Tampón de corrida TBE 1x, temperatura 55°C, voltaje 1500 w, 60 mA, 30W en un ReproGel de alta resolución.

El peso molecular de los fragmentos amplificados separados en el gel de acrilamida, se determinó utilizando el marcador de 50-500 pb y corrigiendo con el marcador de 100pb en cada carril.

#### 4.5.4.3 Análisis y asignación de alelos

El análisis y asignación de alelos se realizó con el programa de análisis de fragmentos Allele Locutor 1.0.3. Inicialmente se detectaron los picos de interés que correspondían a las muestras y a los estándares, luego se identificaron los alelos y se determinaron los tamaños usando el marcador externo (50-500pb) y el marcador interno (100pb). Para las asignaciones del tamaño de los alelos se tuvo en cuenta el locus, la posición de inicio / parada, el tamaño de la repetición y los alelos reportados para cada locus.

#### 4.6 Procesamiento de datos

Se utilizó el programa POPGENE, versión 1.31 (Yeh Francis *et al.*, 1999) para calcular el número total de alelos, el número efectivo de alelos, y las frecuencias alélicas las cuales fueron calculados para cada locus, para cada población y para



todas las poblaciones, la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) fue determinada para cada población en cada locus y para cada locus con todas las poblaciones, al igual que las desviaciones del equilibrio de Hardy Weinberg para cada locus en cada población y en forma global para cada locus en todas las poblaciones. El número efectivo de alelos ( $N_e$ ) fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:  $N_e = 1 / \sum x_i^2$  donde  $x_i$  es la frecuencia del alelo  $i$ th para cada locus. Para cada población también se determinó el número de alelos privados.

La variabilidad genética se evaluó en términos de heterocigosidad observada ( $h_o$ ) y esperada. La heterocigosidad observada fue calculada directamente de los genotipos observados. El test de Hardy Weinberg se realizó para calcular las frecuencias genotípicas esperadas usando los algoritmos de Levene (1949), pruebas de *chi* cuadrado ( $X^2$ ) y el ratio de probabilidad ( $G^2$ ). La deficiencia o exceso de heterocigotos para cada locus y población fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:  $D = (H_o - H_e) / (H_e)$ . La diferenciación genética de las poblaciones estudiadas y la consanguinidad se evaluó mediante el uso de las F-estadísticas de Wright's; se determinaron los F-estadístico ( $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$ ) para las poblaciones y por grupos de poblaciones. Los valores obtenidos de la heterocigosidad observada y esperada fueron empleados para calcular los índices de consanguinidad  $F_{IS}$  de acuerdo a la siguiente fórmula:  $F_{IS} = (H_e - H_o) / H_e$ . La diferenciación genética entre las poblaciones fue determinada utilizando  $F_{ST}$ , el cual fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula  $F_{ST} = \sum p [V_p / p (1-p)] / n$ . Donde  $V_p$  es la varianza de la frecuencia del alelo  $p$ ,  $p$  es el promedio de la frecuencia alélica a través de las muestras y  $n$  es el número de muestras.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Extracción de ADN, condiciones de amplificación y detección

#### 5.1.1 Extracción de ADN (sistema de Clontech)

Basados en los resultados de las amplificaciones que se realizaron a partir de los ADN extraídos por los dos métodos se verificó que el mejor método de extracción para obtener buena calidad de ADN era utilizando el sistema de clontech (nucleospin) como se puede observar en la Figura 3.

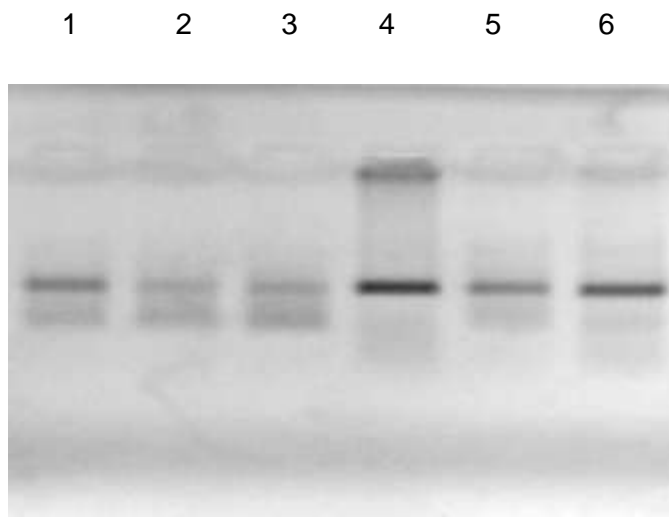


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 4% (3% Nusieve 1% SeaKem) del producto amplificado del microsatélite Pvan 1815. Carril 1-3. Extracción de ADN con isotiocianato de guanidío. Carril 4-6. Extracción de ADN la técnica de clontech (nucleospin).

### 5.1.2 Condiciones de amplificación

Las Figuras 4, 5, 6, 7 y 8 muestran ejemplos de las electroforesis en gel de agarosa al 4% (3% Nusieve 1% SeaKem) de productos amplificados con cada uno de los microsatélites.

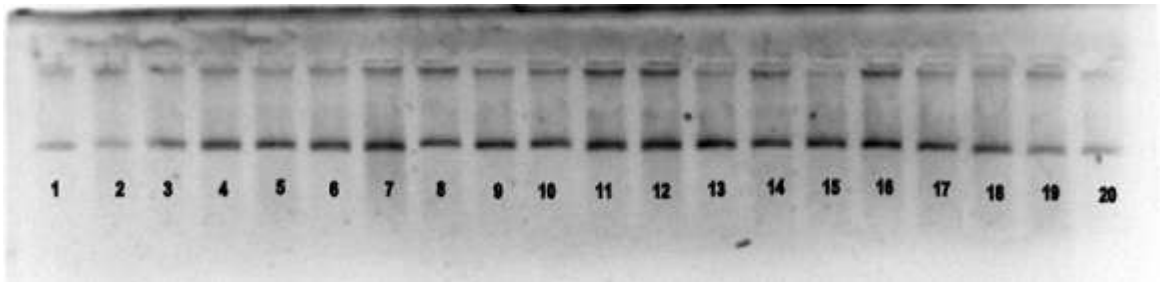


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 4% (3% Nusieve 1% SeaKem) del producto amplificado del microsatélite Pvan 1815.

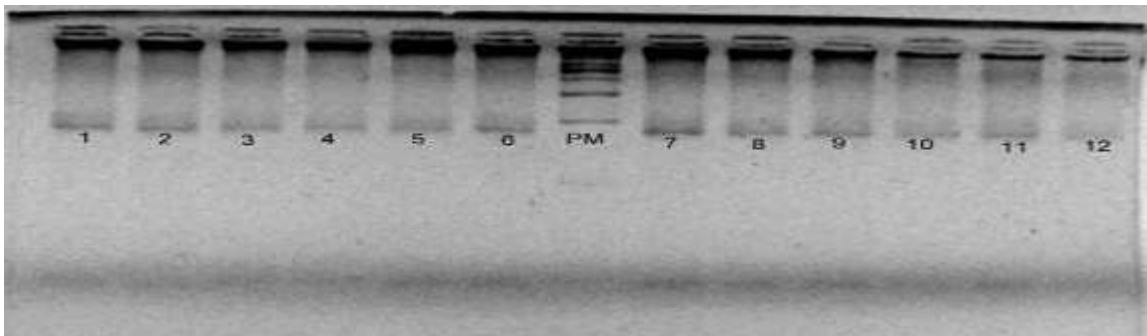


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 4% (3% Nusieve 1% SeaKem) del producto amplificado del microsatélite Pvan 1758.

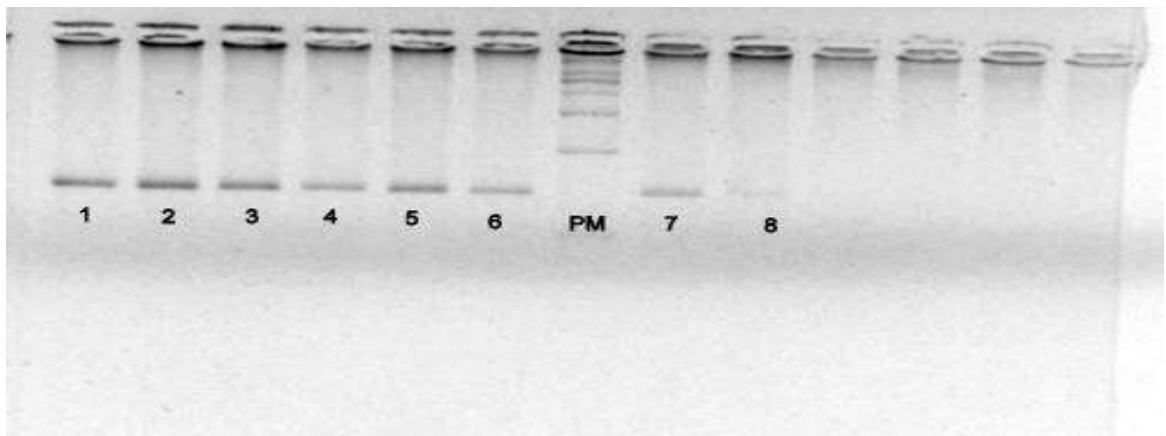


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 4% (3% Nusieve 1% SeaKem) del producto amplificado del microsatélite Pvan 535.

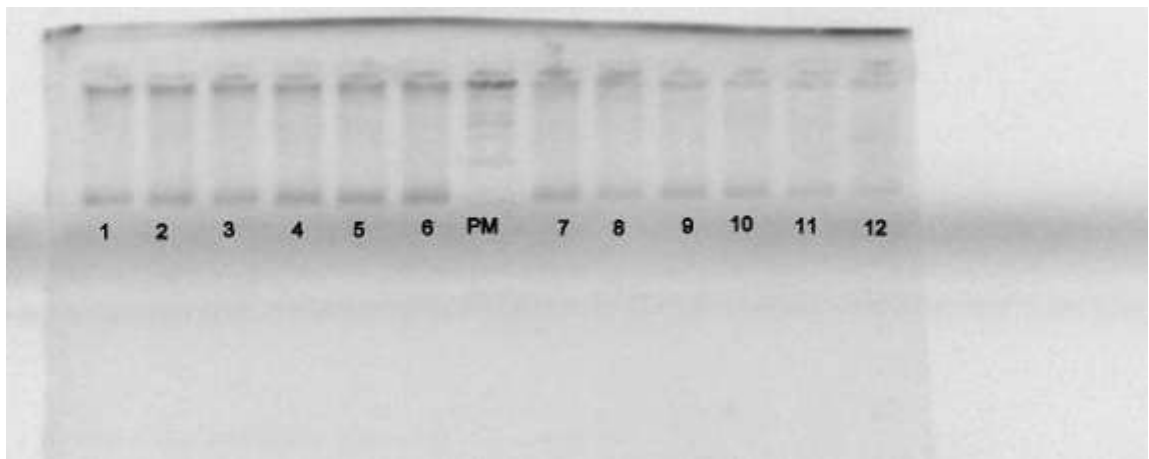


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 4% (3% Nusieve 1% SeaKem) del producto amplificado del microsatélite Pvan 538.

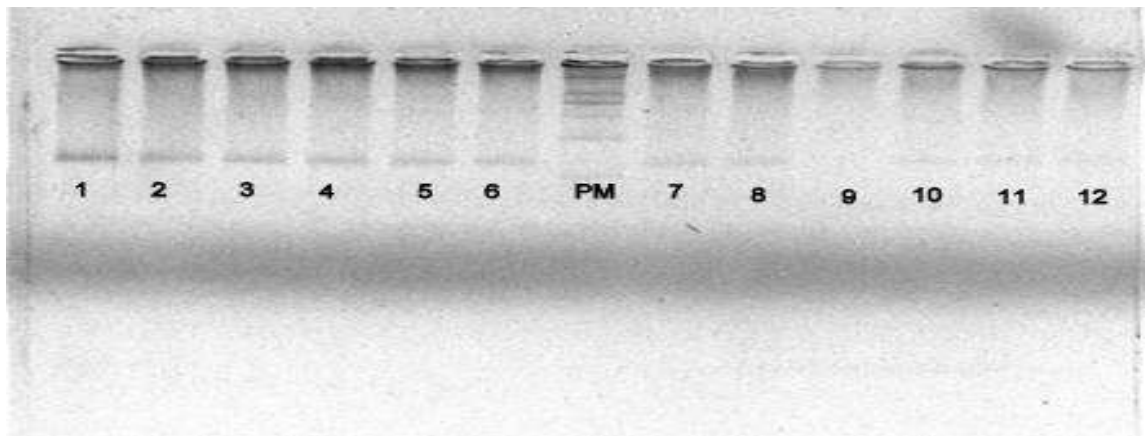


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 4% (3% Nusieve 1% SeaKem) del producto amplificado del microsatélite Pvan 832.

### 5.1.3 Condiciones de detección

En las figuras 9,10 y 11 se muestran como ejemplo los resultados de las detecciones de los genotipos (homocigotos y heterocigotos) en el secuenciador del microsatélite Pvan 535, además se observa el marcador externo en forma de marcador molecular de 50-500pb y el marcador interno de 100pb.

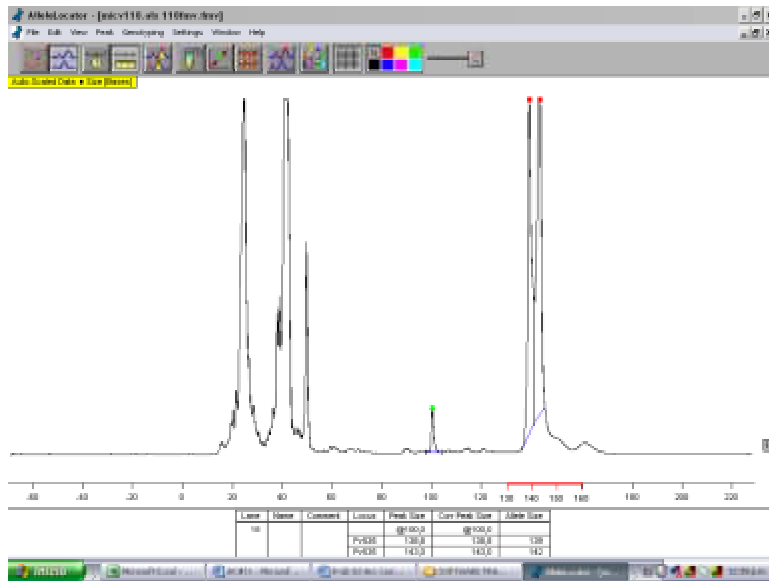


Figura 9. Electroforesis del microsatélite 535 en el secuenciador. La curva con el punto verde corresponde al marcador interno de 100 pares de bases. La curva con los puntos rojos muestra la genotipificación de una muestra heterocigota

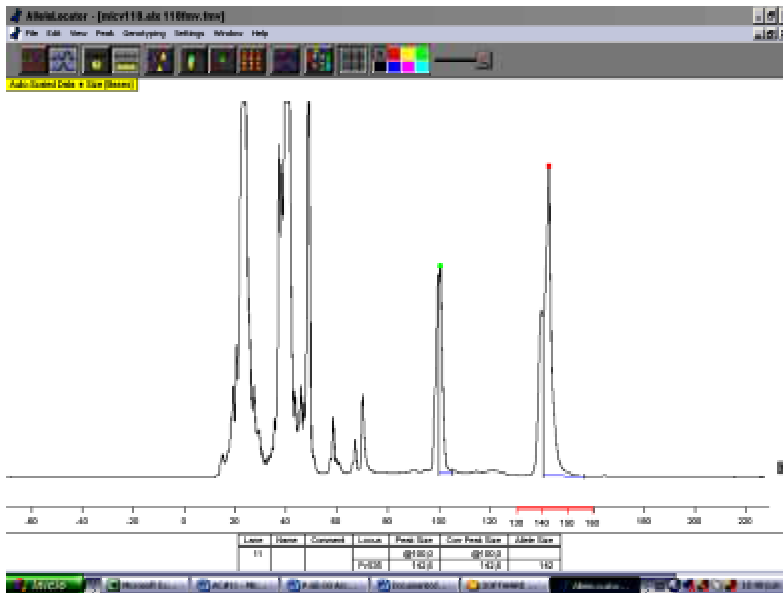


Figura 10. Electroforesis del microsatélite 535 en el secuenciador. La curva con el punto verde corresponde al marcador interno de 100 pares de bases. La curva con el punto rojo muestra la genotipificación de una muestra homocigota.

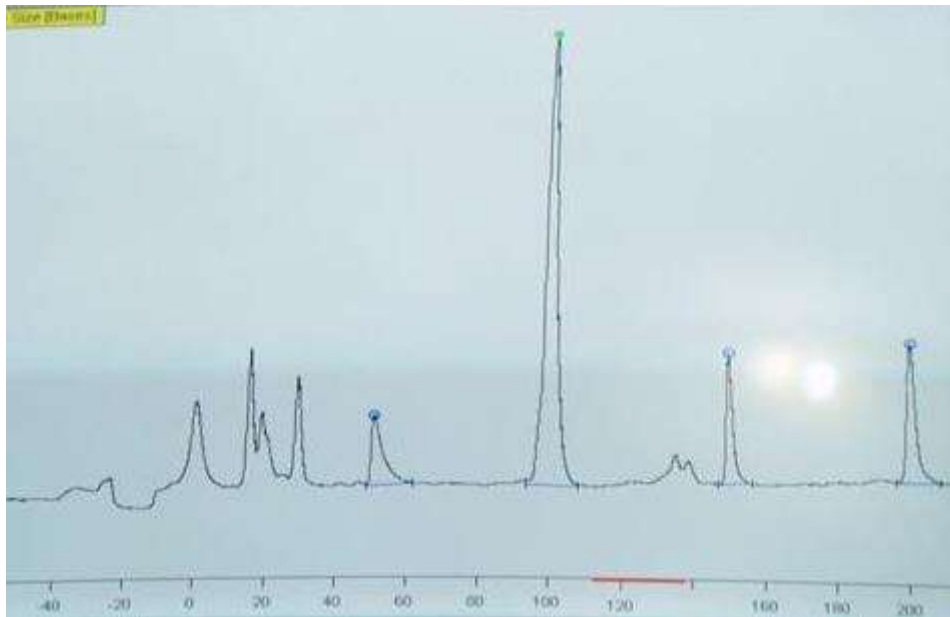


Figura 11. Marcador de peso molecular de 50- 500 pb, la figura muestra la escalera alélica hasta 200 pb.

## 5.2 ANÁLISIS GLOBAL DE LOS MICROSATÉLITES.

En las figuras 12 y 13 se muestran los resultados globales de las 5 poblaciones analizadas para posteriormente hacer el análisis de cada población individualmente.

### 5.2.1 Microsatélites polimórficos

En el análisis de todas las poblaciones y en cada uno de los locus se encontraron en un número superior a tres alelos. (Figura 12). Todos los locus de microsatélites evaluados en las diferentes poblaciones fueron polimórficos. El análisis de polimorfismo de los microsatélites a nivel de poblaciones también mostro variabilidad. (Figura 13).

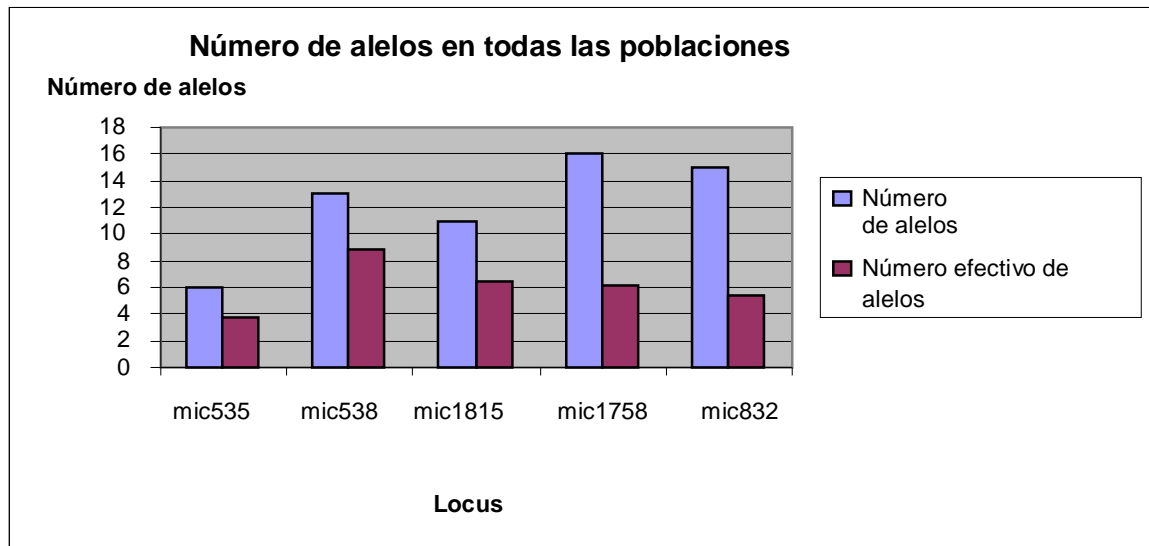


Figura 12. Número de alelos en cada uno de locus evaluados.

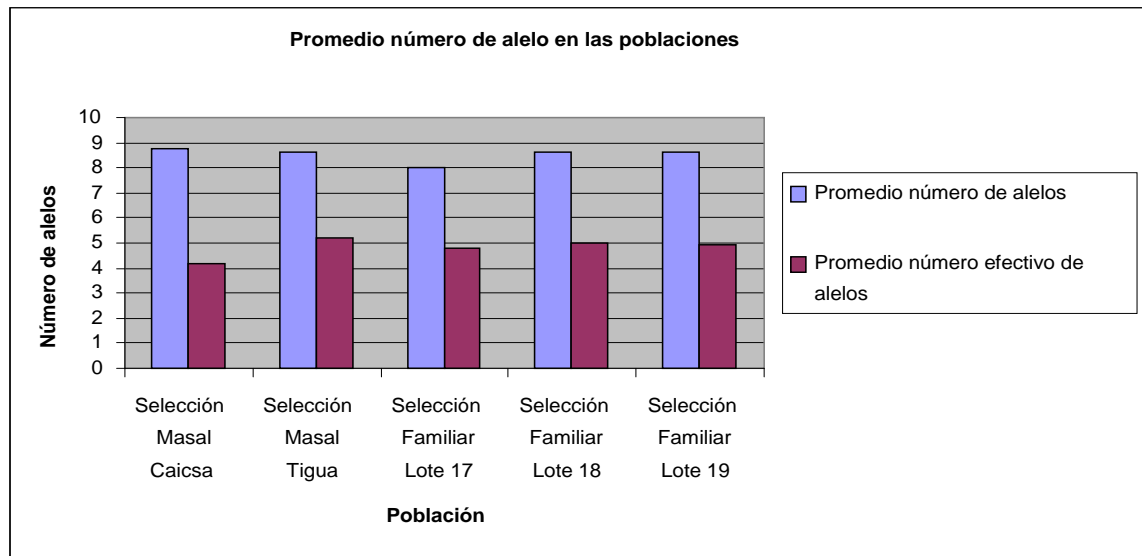


Figura 13. Valores promedio del número de alelos y número efectivo de alelos en las poblaciones.



## 5.2.2 Heterocigosidad observada y esperada

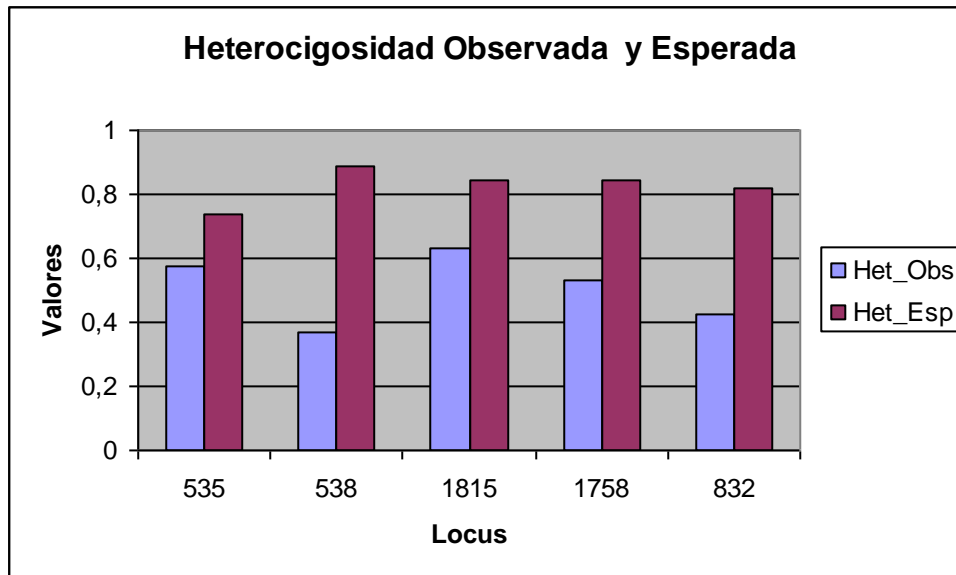


Figura 14. Heterocigosidad observada y esperada en los locus analizados.

Los valores de heterocigosidad observada fueron menores que los valores de heterocigosidad esperados por equilibrio de Hardy Weinberg, siendo más marcado el déficit de heterocigotos en el locus microsatélite 538 ( $p < 0.005$ ). (Figura 14).

## 5.2.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg

En promedio todos los locus se encontraron en desequilibrio de Hardy Weinberg por un déficit de heterocigotos a excepción del locus microsatélite 535 en la población de selección familiar correspondiente al lote 19 ( $p < 0.001$ ). (Tabla 7).

Tabla 7. Heterocigosidad observada y esperada en cada locus y para cada una de las poblaciones

Locus	Caicsa	Tigua	L17	L18	L19
mic535	0,60 <sup>HO</sup>	0,36 <sup>HO</sup>	0,58 <sup>HO</sup>	0,64 <sup>HO</sup>	0,69 <sup>HO</sup>
	0,71 <sup>HE</sup>	0,64 <sup>HE</sup>	0,68 <sup>HE</sup>	0,71 <sup>HE</sup>	0,72 <sup>HE</sup>
mic538	0,48 <sup>HO</sup>	0,22 <sup>HO</sup>	0,42 <sup>HO</sup>	0,26 <sup>HO</sup>	0,44 <sup>HO</sup>
	0,80 <sup>HE</sup>	0,88 <sup>HE</sup>	0,87 <sup>HE</sup>	0,83 <sup>HE</sup>	0,87 <sup>HE</sup>
mic1815	0,72 <sup>HO</sup>	0,50 <sup>HO</sup>	0,48 <sup>HO</sup>	0,75 <sup>HO</sup>	0,70 <sup>HO</sup>
	0,83 <sup>HE</sup>	0,80 <sup>HE</sup>	0,78 <sup>HE</sup>	0,84 <sup>HE</sup>	0,83 <sup>HE</sup>
mic1758	0,41 <sup>HO</sup>	0,52 <sup>HO</sup>	0,54 <sup>HO</sup>	0,48 <sup>HO</sup>	0,67 <sup>HO</sup>
	0,78 <sup>HE</sup>	0,84 <sup>HE</sup>	0,85 <sup>HE</sup>	0,83 <sup>HE</sup>	0,82 <sup>HE</sup>
mic832	0,40 <sup>HO</sup>	0,42 <sup>HO</sup>	0,28 <sup>HO</sup>	0,46 <sup>HO</sup>	0,56 <sup>HO</sup>
	0,62 <sup>HE</sup>	0,76 <sup>HE</sup>	0,63 <sup>HE</sup>	0,75 <sup>HE</sup>	0,63 <sup>HE</sup>
Promedio	0,52 <sup>HO</sup>	0,40 <sup>HO</sup>	0,46 <sup>HO</sup>	0,52 <sup>HO</sup>	0,61 <sup>HO</sup>
	0,75 <sup>HE</sup>	0,79 <sup>HE</sup>	0,76 <sup>HE</sup>	0,79 <sup>HE</sup>	0,77 <sup>HE</sup>

### 5.3. ANÁLISIS POR POBLACIÓN

#### 5.3.1 Selección masal Caicsa:

##### 5.3.1.1 Locus polimórficos

El número de alelos se encontró entre 5 para el mic 535 y 11 para el mic 1758 con una media de 8.8. El número efectivo de alelos fue menor que el número de alelos. Los locus evaluados tuvieron un número superior a 5 alelos, lo que demuestra que todos los locus evaluados en esta población son polimórficos. (Figura 15).

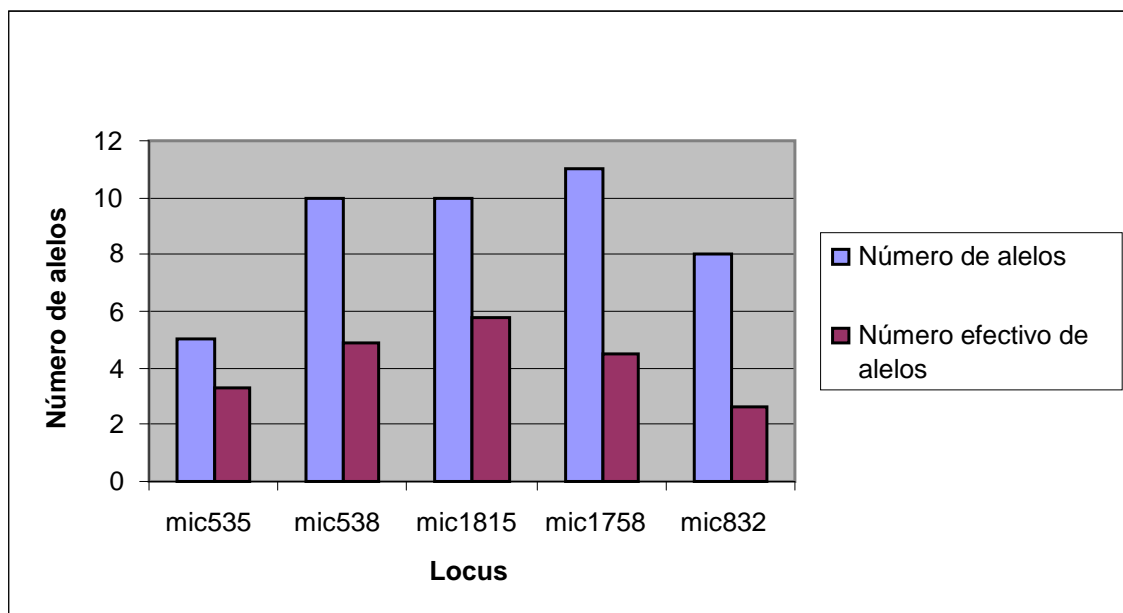


Figura 15. Número de alelos y número efectivo de alelos para la población de selección masal Caicsa

### 5.3.1.2 Heterocigosidad observada y esperada

La heterocigosidad observada se encontró entre 0,40 - 0,72 con un promedio de 0,52 mientras que la heterocigosidad esperada se encontró entre 0,62 - 0,83 con un promedio de 0,75 como se observa la figura 16. Todos locus en esta población se encontraron en desequilibrio de Hardy Weinberg por un déficit de heterocigotos. Las mayores diferencias entre la heterocigosidad observada y esperada se encontraron en el locus microsatélite 1758. ( $p < 0.005$ )

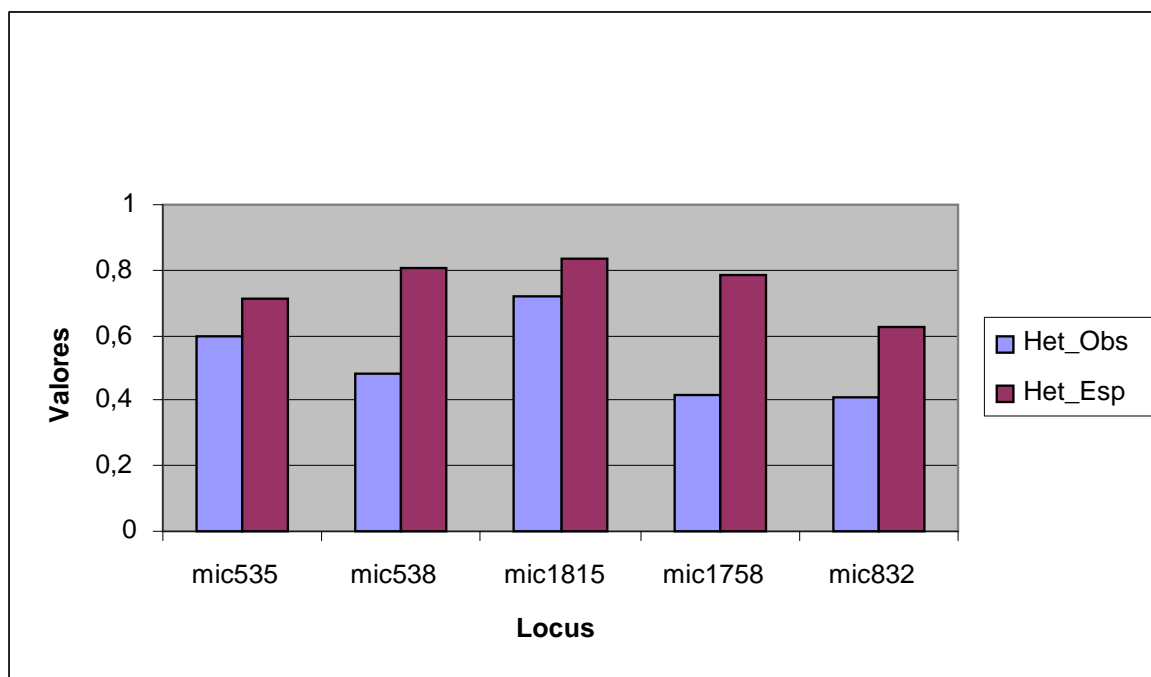


Figura 16. Heterocigosidad observada y esperada en los locus microsatélites para la población de selección masal Caicsa.

### 5.3.1.3 Equilibrio de Hardy Weinberg

Los valores de las heterocigosidades observadas (0,52) y esperadas (0,75) indican que la población de selección masal de Caicsa se encuentra en desequilibrio de Hardy Weinberg por un déficit de heterocigotos. (Tabla 8).

Tabla 8. Resumen de los datos de la heterocigosidad observada y esperada en todos los locus en la población de selección masal Caicsa.

Locus	Het_Obs	Het_Esp
mic535	0,6	0,71
mic538	0,48	0,8
mic1815	0,72	0,83
mic1758	0,41	0,78
mic832	0,4	0,62
Promedio	0,52	0,75
Desvest	0,13	0,08

### 5.3.2 Selección masal Tigua

#### 5.3.2.1 Locus polimórficos

El número de alelos se encontró entre 5 para el mic 535 y 11 para el mic 538 y el mic 1758. El número efectivo de alelos fue menor (promedio de 5.2) que el número de alelos en todos los locus. Los locus evaluados tuvieron un número superior a 5 alelos, lo que demuestra que todos los locus evaluados en esta población son polimórficos. (Figura 17).

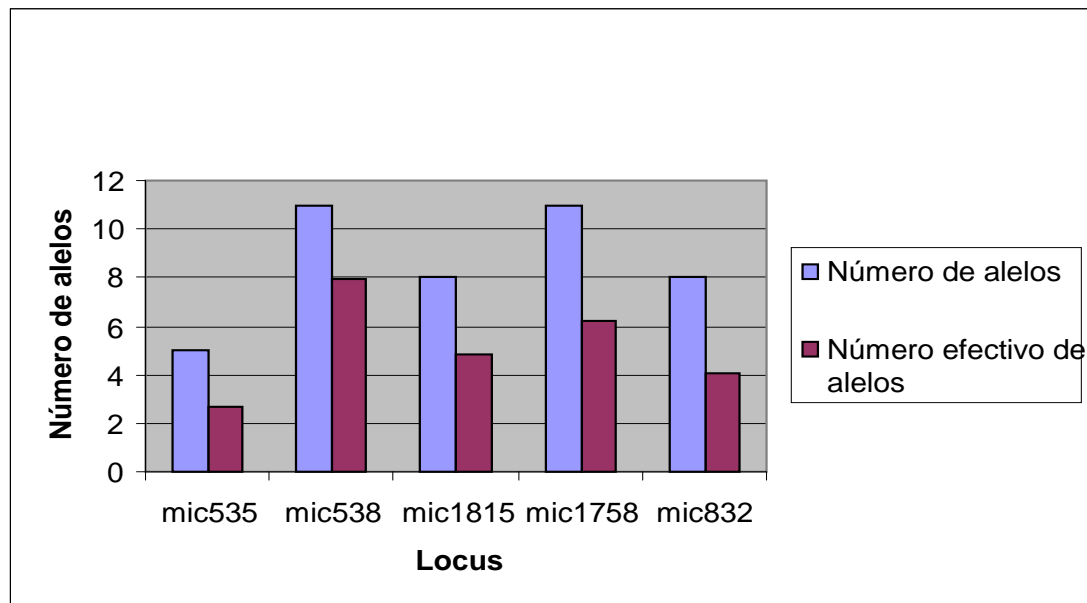


Figura 17. Número de alelos y número efectivo de alelos para la población de selección masal Tigua

#### 5.3.2.2 Heterocigosidad observada y esperada

La heterocigosidad observada se encontró entre 0,22-0,52 con un promedio de 0,40 mientras que la heterocigosidad esperada se encontró entre 0,64-0,88 con un promedio de 0,79, demostrándose que la población se encuentra en desequilibrio de Hardy Weinberg por un déficit de heterocigotos. (Figura 18).

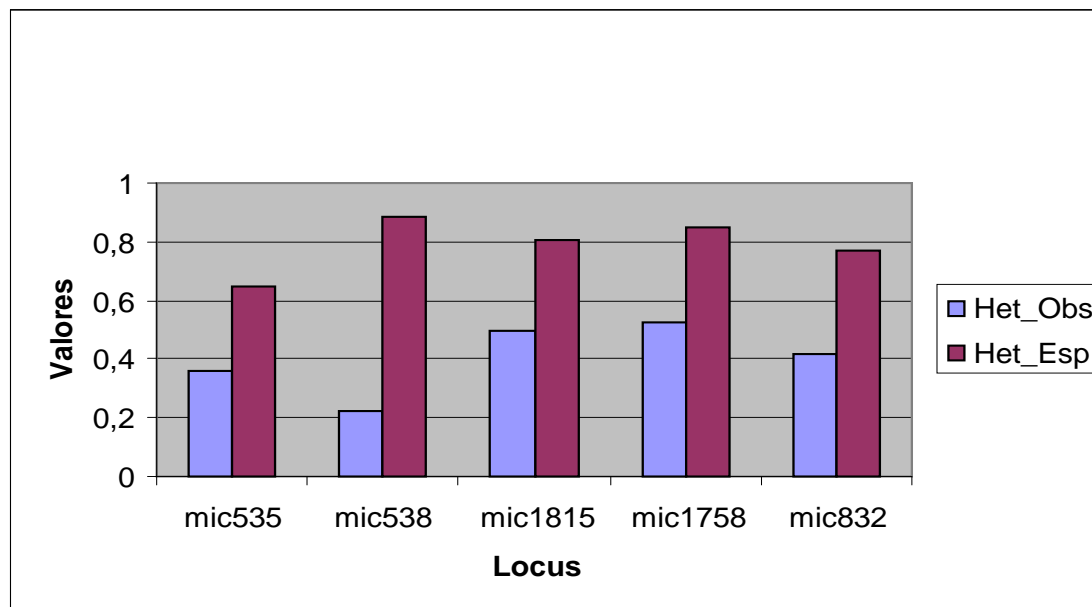


Figura 18. Heterocigosidad observada y esperada en los locus microsatélites para la población de selección masal Tigua

### 5.3.2.3 Equilibrio de Hardy Weinberg

En la tabla 9 se observa que todos los locus en esta población estuvieron de desequilibrio de Hardy Weinberg. Het Obs (0.40) Het Esp (0.79). Las mayores diferencias entre la heterocigosidad observada y esperada se encontraron en el locus microsatélite 538. ( $p < 0.005$ ).

Tabla 9. Resumen de los datos de la heterocigosidad y homocigosidad observada y esperada en todos los locus en la población de selección masal Tigua.

Locus	Het_Obs	Het_Esp
mic535	0,36	0,64
mic538	0,22	0,88
mic1815	0,5	0,8
mic1758	0,52	0,84
mic832	0,42	0,76
Promedio	0,4	0,79
Desvest	0,12	0,09

### 5.3.3 Selección Familiar Lote 17

#### 5.3.3.1 Locus polimórficos

El número de alelos se encontró entre 5 para el mic 535 y 11 para el mic 1758. El número efectivo de alelos fue menor que el número de alelos (promedio de 4.8). Los locus evaluados tuvieron un número superior a 5 alelos lo que demuestra que todos los locus evaluados en esta población son polimórficos. (Figura 19).

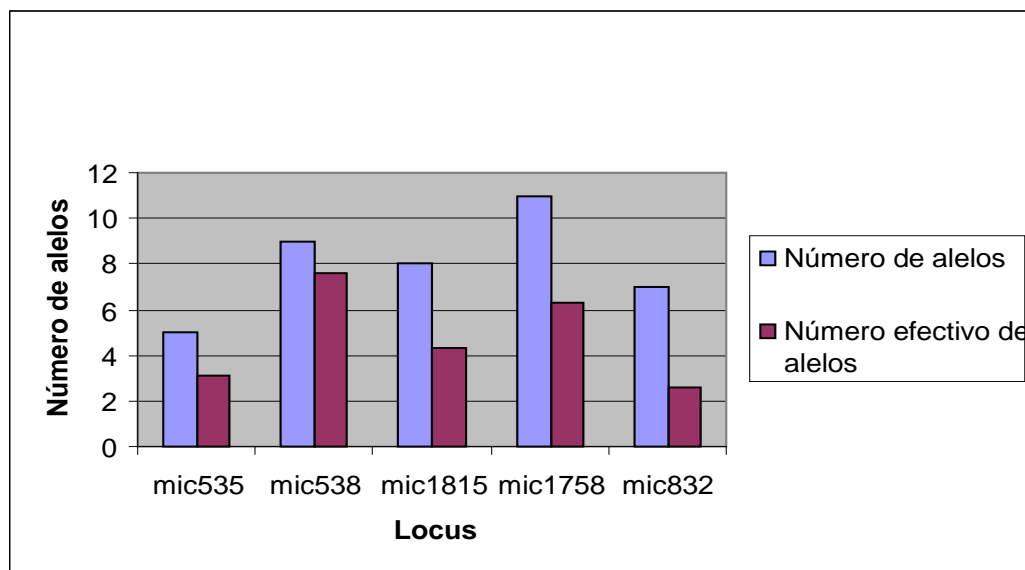


Figura 19. Numero de alelos y numero efectivo de alelos para la población de selección familiar lote 17.

#### 5.3.3.2 Heterocigosidad observada y esperada

La heterocigosidad observada se encontró entre 0,28-0,58 con un promedio de 0,46 mientras que la heterocigosidad esperada se encontró entre 0,63-0,87 con un promedio de 0,76. (Figura 20).

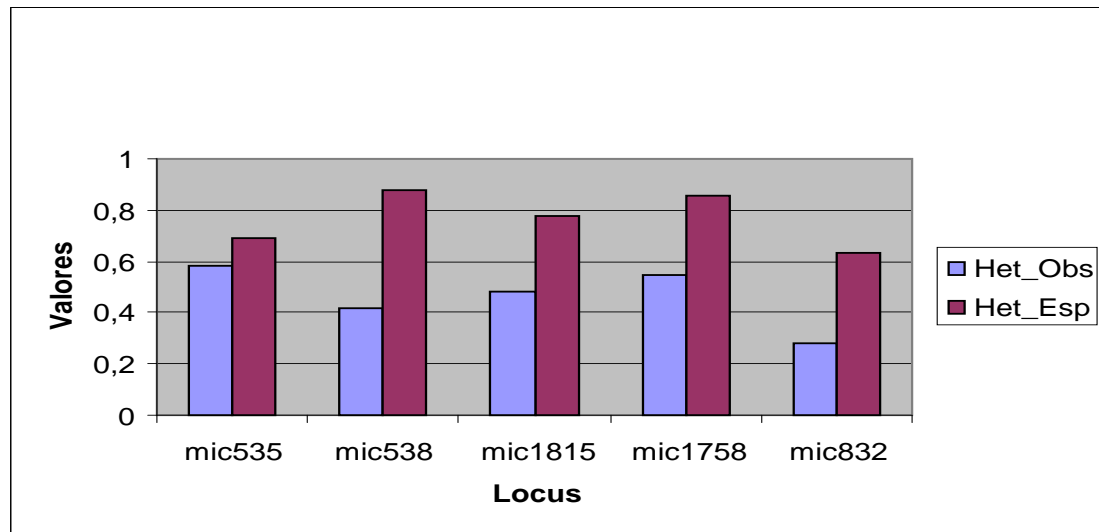


Figura 20. Heterocigosidad observada y esperada en los locus microsatélites para la población de selección familiar lote 17.

### 5.3.3.3 Equilibrio de Hardy Weinberg

Los cinco locus evaluados presentaron niveles de heterocigosidad observada (0,46) inferiores a los valores de heterocigosidad esperados (0,76) como se observa en la tabla 10. Estos valores indican que la población se encuentra en desequilibrio de Hardy Weinberg por un déficit de heterocigotos. Las mayores diferencias entre la heterocigosidad observada y esperada se encontraron en el locus microsatélite 538. ( $p < 0.005$ )

Tabla 10. Resumen de los datos de la heterocigosidad observada y esperada en todos los locus para la población de selección familiar lote 17

Locus	Het_Obs	Het_Esp
mic535	0,58	0,68
mic538	0,42	0,87
mic1815	0,48	0,78
mic1758	0,54	0,85
mic832	0,28	0,63
Promedio	0,46	0,76
Desvest	0,11	0,1



### 5.3.4 Selección Familiar Lote 18

#### 5.3.4.1 Locus polimórficos

El número de alelos se encontró entre 5 para el mic 535 y 11 para el mic 538 y 1758 con un promedio de 8.6. El número efectivo de alelos fue menor que el número de alelos (promedio de 5.0) Los locus evaluados tuvieron un número superior a 5 alelos, lo que demuestra que todos los locus evaluados en esta población son polimórficos. (Figura 21)

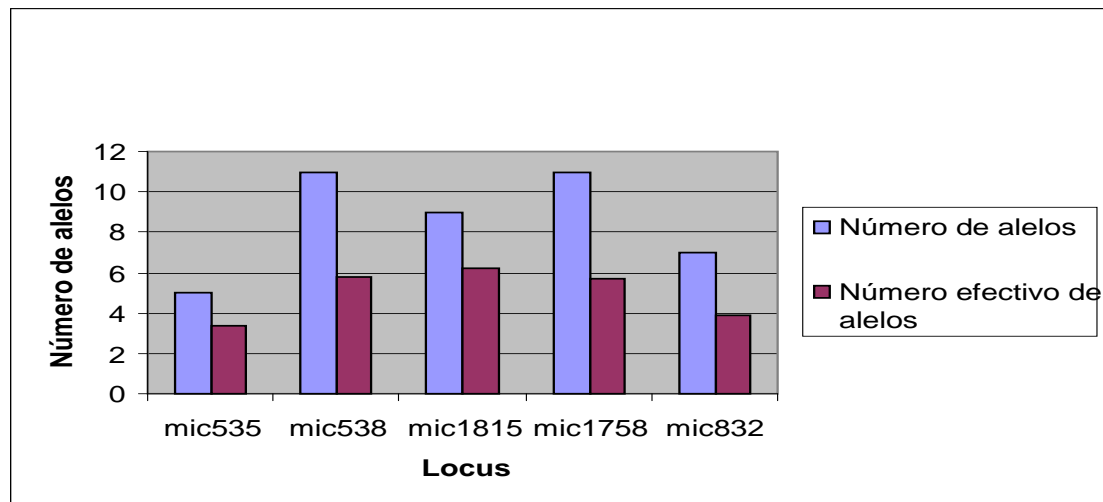


Figura 21. Número de alelos y número efectivo de alelos para la población de selección familiar lote 18

#### 5.3.4.2 Heterocigosidad observada y esperada

La heterocigosidad observada se encontró entre 0,26-0,75 con un promedio de 0,52 mientras que la heterocigosidad esperada se encontró entre 0,71-0,84 con un promedio de 0,79. (Figura 22).

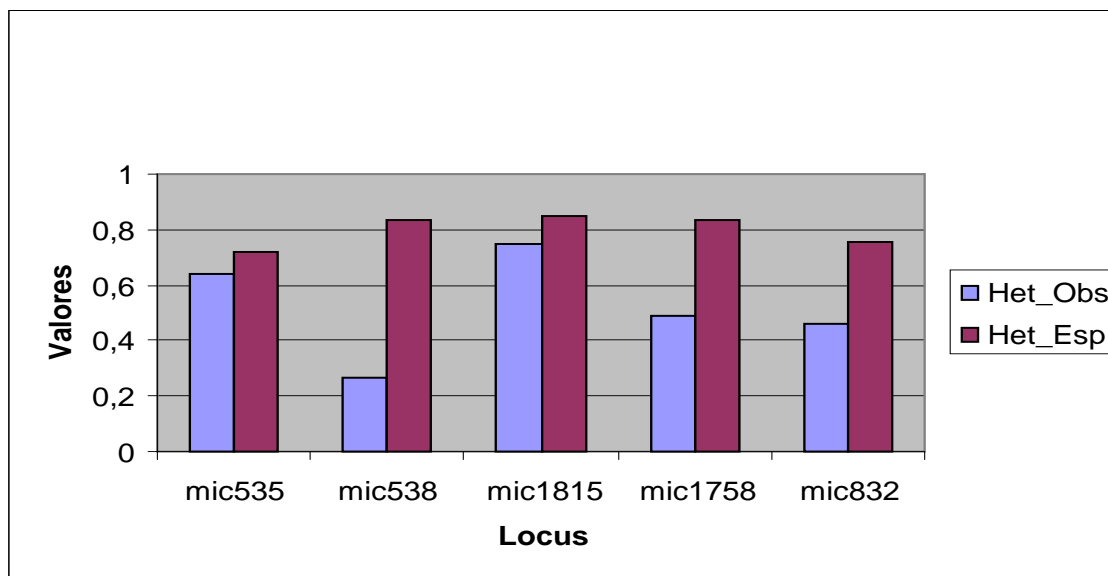


Figura 22. Heterocigosidad observada y esperada en los locus microsatélites para la población de selección familiar lote 18.

### 5.3.4.3 Equilibrio de Hardy Weinberg

Los valores observados demuestran que la población se encuentra en desequilibrio de Hardy Weinberg por un déficit de heterocigotos. Las mayores diferencias entre la heterocigosidad observada y esperada se encontraron en el locus microsatélite 538. (Tabla 11).

Tabla 11. Resumen de los datos de la heterocigosidad observada y esperada en todos los locus para la población de selección familiar lote 18.

Microsatélite	Het_Obs	Het_Esp
mic535	0,64	0,71
mic538	0,26	0,83
mic1815	0,75	0,84
mic1758	0,48	0,83
mic832	0,46	0,75
Promedio	0,52	0,79
Desvest	0,18	0,05

### 5.3.5 Selección Familiar Lote 19

#### 5.3.5.1 Locus polimórficos

El número de alelos se encontró entre 5 para el mic 535 y 11 para el mic 538 y el mic 1758 con un promedio de 8.6. El número efectivo de alelos fue menor que el número de alelos (promedio de 4.9) Los locus evaluados tuvieron un número superior a 5 alelos, lo que demuestra que todos los locus evaluados en esta población son polimórficos. (Figura 23).

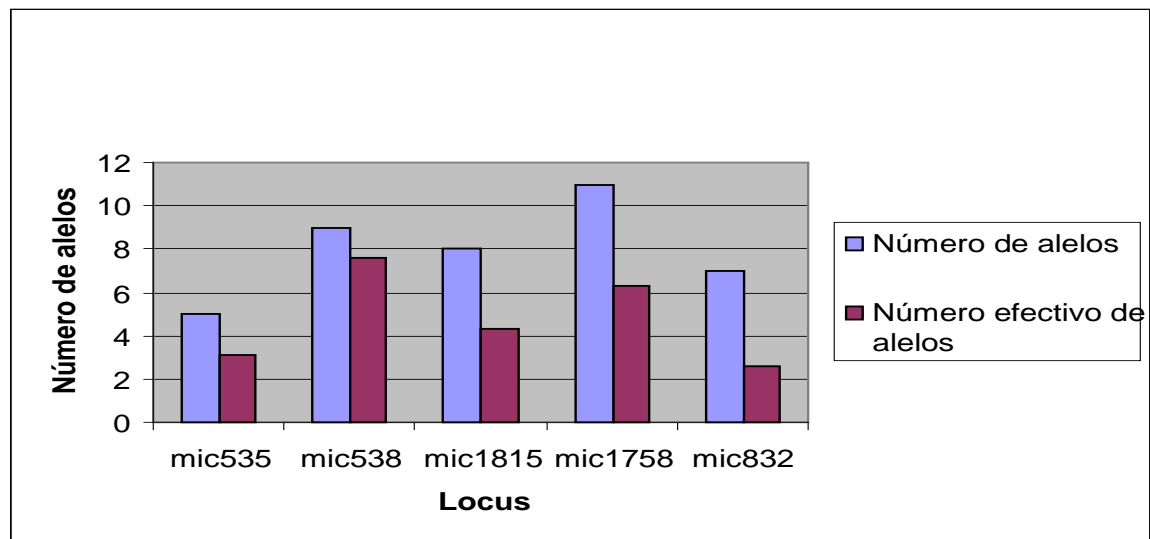


Figura 23. Número de alelos y número efectivo de alelos para la población de selección familiar lote 19.

#### 5.3.5.2 Heterocigosidad observada y esperada

La heterocigosidad observada se encontró entre 0,44-0,69 con un promedio de 0,61 mientras que la heterocigosidad esperada se encontró entre 0,63-0,87 con un promedio de 0,77. (Figura 24).

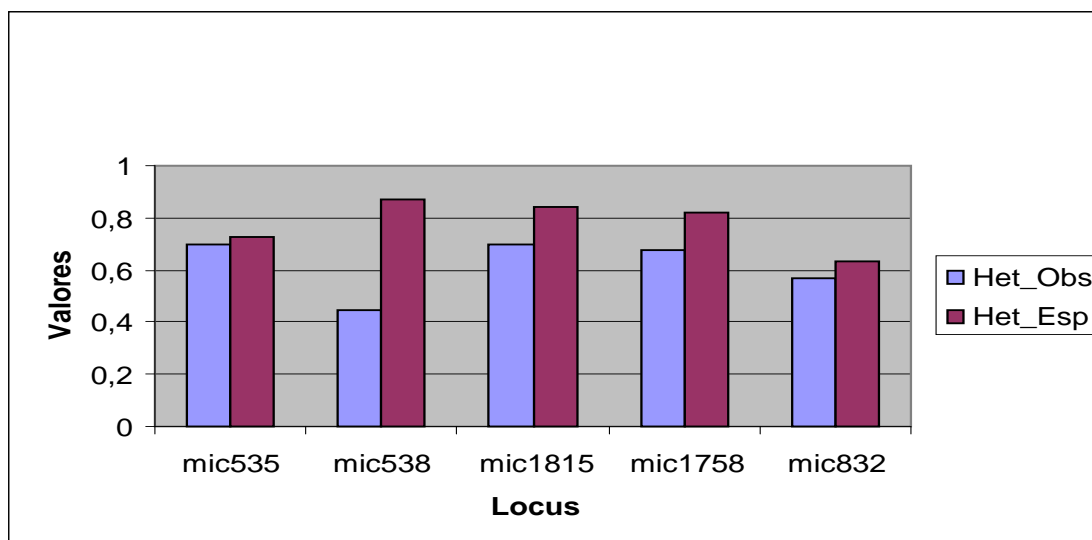


Figura 24. Heterocigosidad observada y esperada en los locus microsatélites para la población de selección familiar lote 19.

### 5.3.5.3 Equilibrio de Hardy Weinberg

La población se encuentra en desequilibrio de Hardy Weinberg por un déficit de heterocigotos, Het Obs (0.61) - Het Esp (0.77) a excepción del locus 535 Het Obs (0.70) Het Esp (0.72). Las mayores diferencias entre la heterocigosidad observada y esperada se encontraron en el locus microsatélite 538 Het Obs (0.44) - Het Esp (0.87). (Tabla 12)

Tabla 12. Resumen de los datos de la heterocigosidad observada y esperada en todos los locus para la población de selección familiar lote 19

Microsatélite	Het_Obs	Het_Esp
mic535	0,7	0,72
mic538	0,44	0,87
mic1815	0,7	0,83
mic1758	0,67	0,82
mic832	0,56	0,63
Promedio	0,61	0,77
Desvest	0,1086	0,0969

## 5.4 Análisis del F-estadístico

### 5.4.1 $F_{IS}$ . Coeficiente de consanguinidad

#### 5.4.1.1 $F_{IS}$ . Coeficiente de consanguinidad en la población de selección masal Caicsa

Los valores positivos nos indican un exceso de homocigotos en todos los locus, principalmente en el locus 1758. En promedio el valor de  $F_{IS}$  en esta población se encontró en 0.296 indicando un exceso individuos homocigotos. (Figura 25)

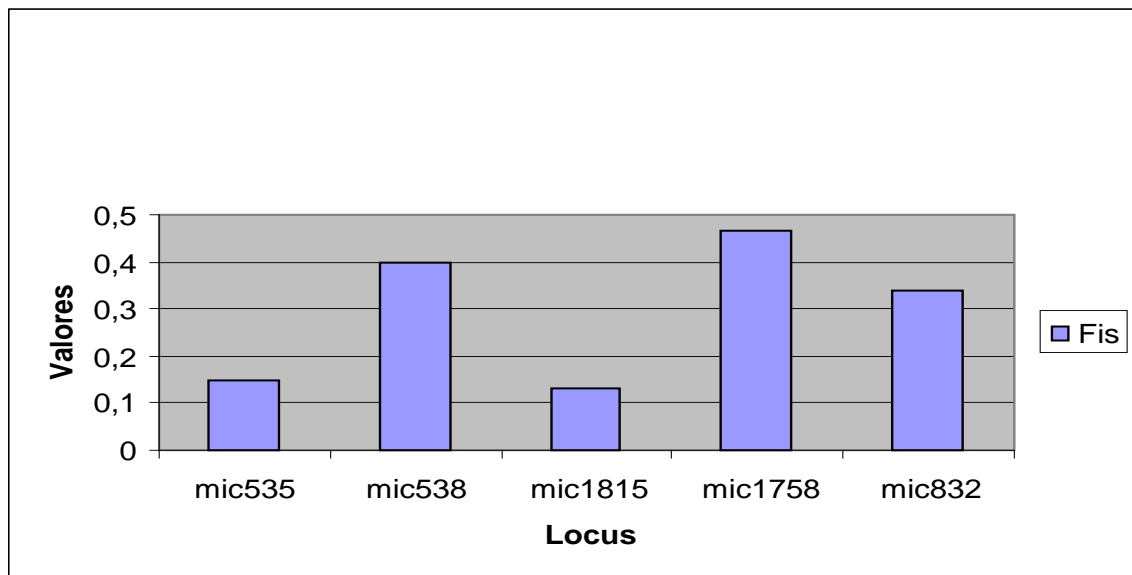


Figura 25. Coeficiente de consanguinidad en cada uno de los locus en la población de selección masal Caicsa.

#### 5.4.1.2. FIS .Coeficiente de consanguinidad en la población de selección masal Tigua

En los cinco locus evaluados se observaron valores que indican excesos de homocigotos siendo más evidente en el mic 538 con un valor de 0.74, en promedio el coeficiente Fis se encontró en un valor de 0,48 indicando que esta población tienen un alto grado de consanguinidad. (Figura 26).

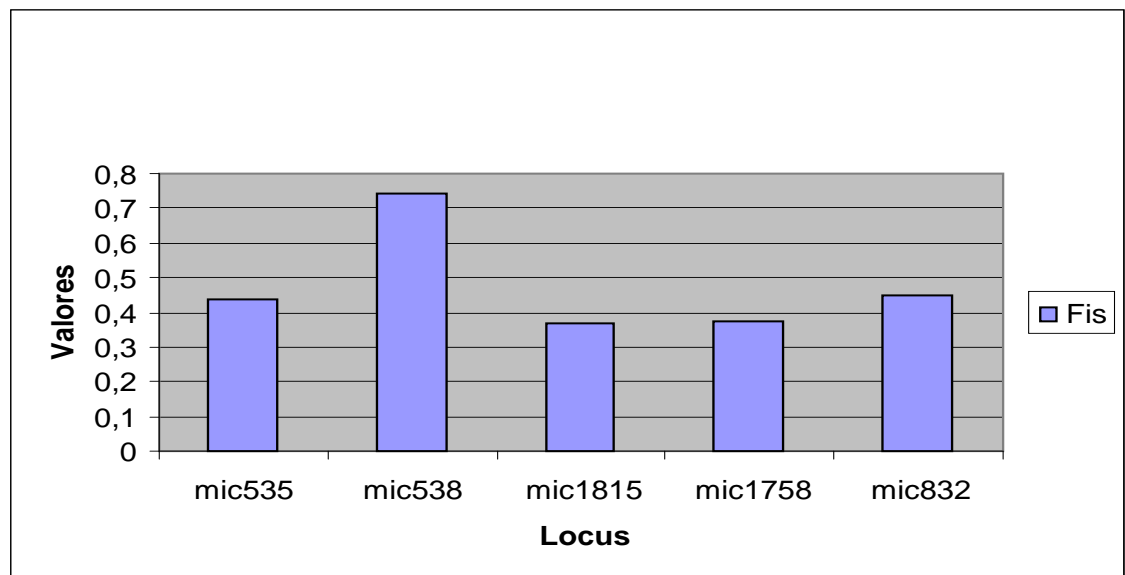


Figura 26. Coeficiente de consanguinidad en cada uno de los locus en la población de selección masal tigua

### 5.4.1.3. FIS .Coeficiente de consanguinidad en la población de selección familiar Lote 17

En los cinco locus evaluados se observaron valores que indican excesos de homocigotos, en promedio el coeficiente Fis se encontró en un valor de 0,39. Siendo el valor del índice más alto en el locus 832 seguido muy de cerca por el locus 538. (Figura 27).

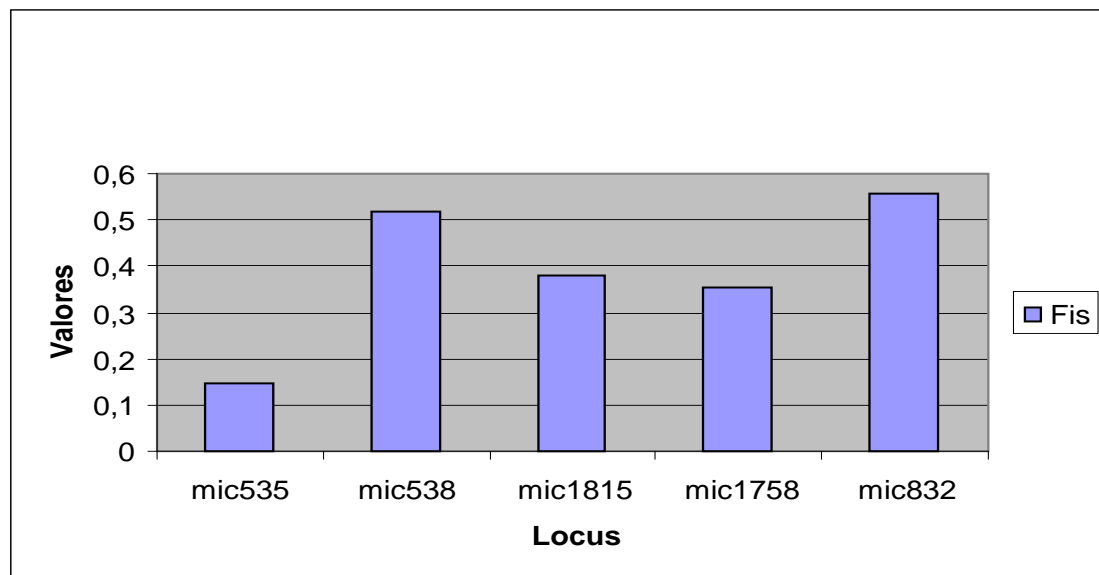


Figura 27. Coeficiente de consanguinidad en cada uno de los locus en la población de selección familiar Lote 17

#### 5.4.1.4 $F_{IS}$ . Coeficiente de consanguinidad en la población de familiar Lote 18

Todos los locus evaluados presentaron valores de  $F_{IS}$  indicativos de excesos de homocigotos; el valor en promedio fue de 0.34. Al igual que en la mayoría de los casos el locus 538 fue el que presento mayor índice de consanguinidad. (Figura 28).

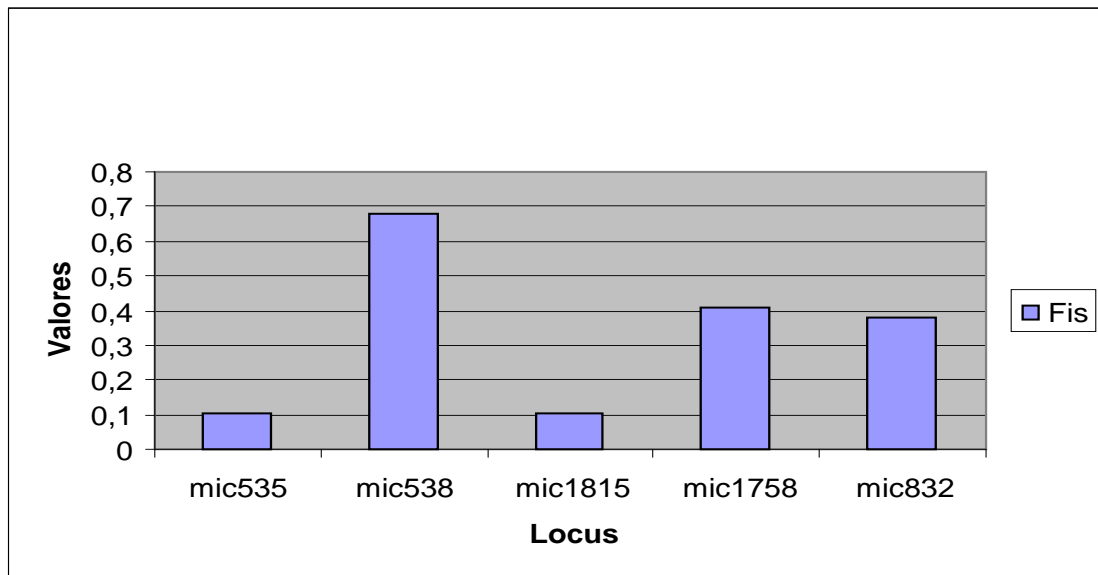


Figura 28. Coeficiente de consanguinidad en cada uno de los locus en la población de selección familiar Lote 18



#### 5.4.1.5 FIS .Coeficiente de consanguinidad en la población de selección familiar Lote 19

El exceso de homocigotos en esta población se presentó en todos los locus, el valor promedio de Fis indicativos de excesos de homocigotos fue de 0,19 el cual corresponde al menor valor de consanguinidad entre las poblaciones, el mayor valor de Fis en esta población lo encontramos en locus 538. (Figura 29).

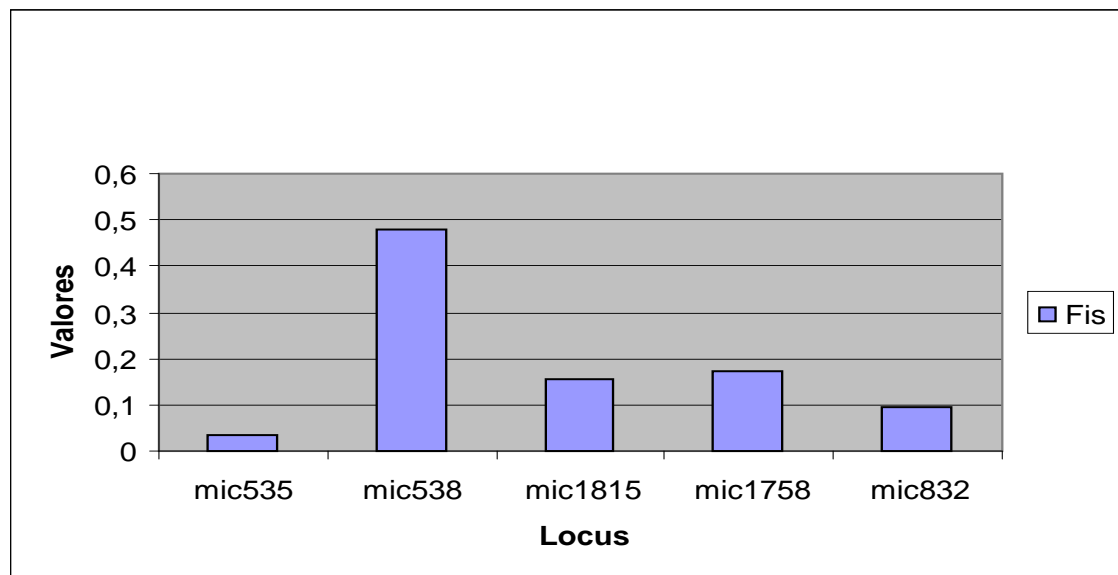


Figura 29 Coeficiente de consanguinidad en cada uno de los locus en la población de selección familiar Lote 19.

#### 5.4.1.6 $F_{is}$ en los locus microsatélites para todas las poblaciones

En promedio de todos los locus y en todas las poblaciones se determinó que el locus que presento mayor índice de consanguinidad fue el mic538 para el cual se deben realizar pruebas de herencia mendeliana y de esta forma descartar la presencia de alelos nulos y así confirmar una verdadera homocigosidad a nivel de este locus. (Figura 30).

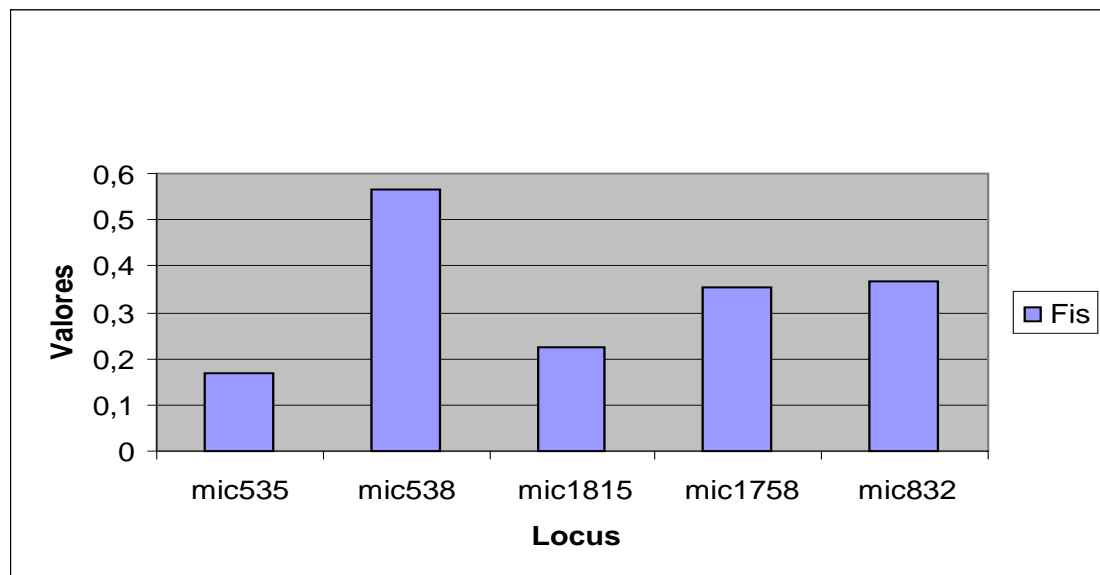


Figura 30. Valores promedio de  $F_{is}$  en los locus microsatélites para todas las poblaciones.

#### 5.4.1.7 $F_{IS}$ en cada una de las poblaciones

La población de selección masal de Tigua presentó el mayor grado de consanguinidad ( $F_{IS}$  0,48). En las poblaciones de selección familiar hay una sustancial disminución en los índices de consanguinidad de 0.39 en el lote 17 a 0.19 en el lote 19. (Figura 31).

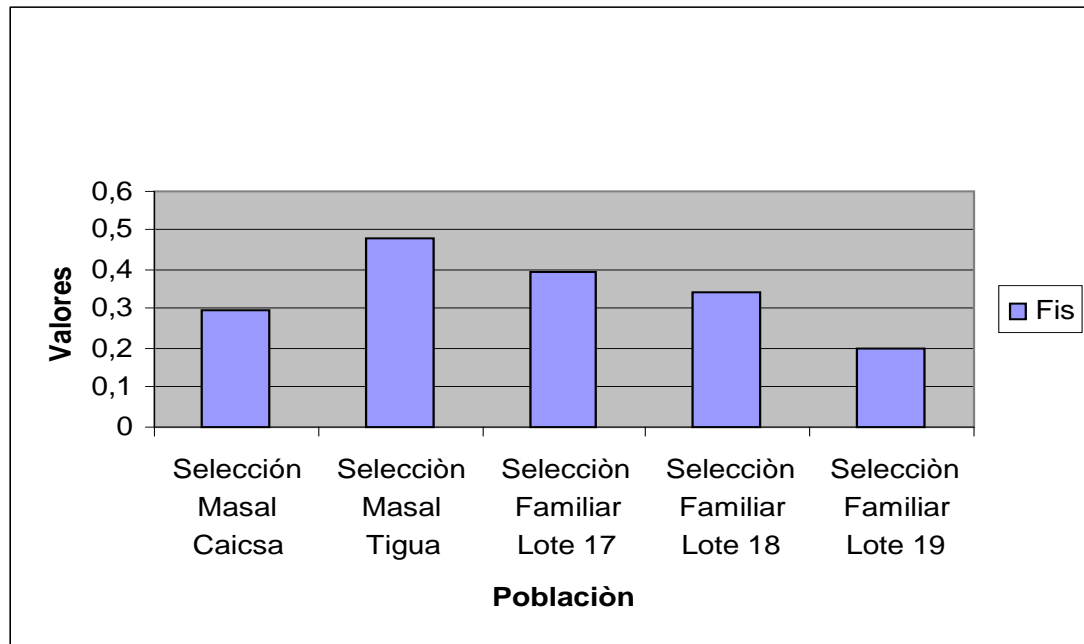


Figura 31. Valores promedio de  $F_{IS}$  en cada una de las poblaciones

#### 5.4.2 $F_{ST}$ . Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones

El rango de diferenciación genética con el estimador  $F_{ST}$  es de 6.76% entre las poblaciones, el locus que más contribuyó con la diferenciación fue el mic 832 (0.176). (Figura 32 y tabla 13).

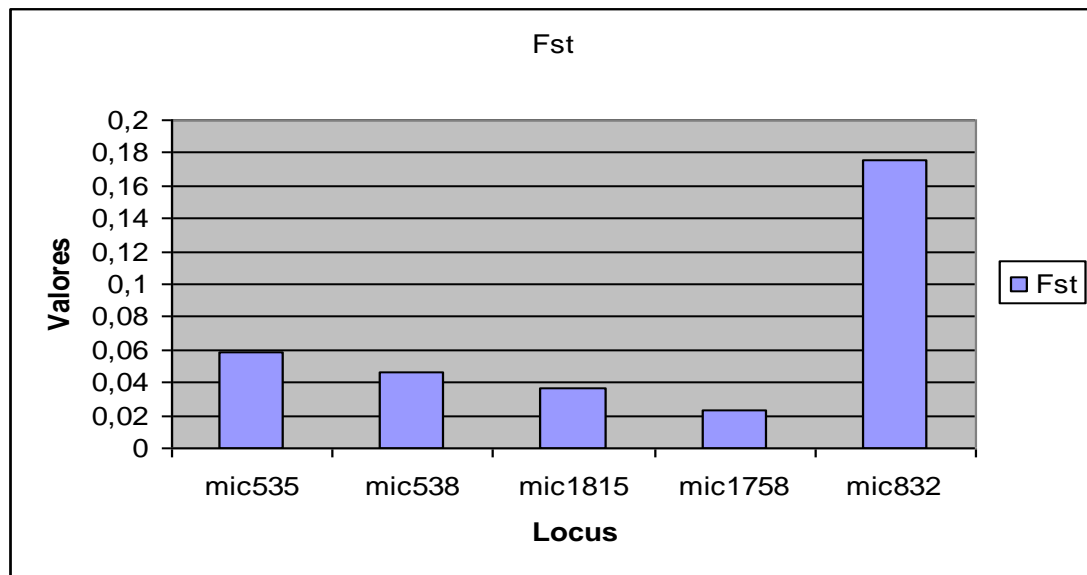


Figura 32. Diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) por locus microsatélite

Tabla13. Valores de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) por locus microsatélite.

Locus	$F_{ST}$
mic535	0,059
mic538	0,045
mic1815	0,037
mic1758	0,023
mic832	0,176
Promedio	0,067

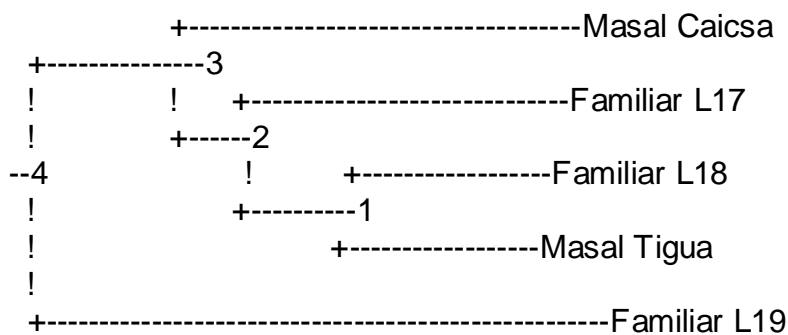


Figura 33. Dendrograma. Based Nei's (1972) Genetic distance: Method = UPGMA modified from NEIGHBOR procedure of PHYLIP Version 3.5

### 5.4.2 Valores promedio de la heterocigosidad observada y esperada en las poblaciones

Se refleja claramente un aumento en los valores de la heterocigosidad observada desde el lote 17 al lote 19, lo que evidencia un efecto positivo de las estrategias utilizadas en la creación de los lotes de selección familiar.

Además se evidencia la población de selección Masal Tigua como la de menor valor en lo que a heterocigosidad observada se refiere (Tabla 14)

Tabla 14. Valores promedio de la Heterocigosidad observada y Esperada en las poblaciones.

Promedios Heterocigosidad observada y esperada en las poblaciones		
Población	Het_Obs	Het_Esp
Selección Masal Caicsa	0,52	0,75
Selección Masal Tigua	0,40	0,79
Selección Familiar Lote 17	0,46	0,76
Selección Familiar Lote 18	0,52	0,79
Selección Familiar Lote 19	0,61	0,78

### 5.4.3 Valores de AMOVA para los locus polimórficos.

Las estimaciones para la diferenciación de las poblaciones muestran que el mayor porcentaje de variación está dado por diferencias entre individuos. (Tabla 15).

Tabla 15. AMOVA para los locus polimórficos

Fuente de variación	d.f	Suma de cuadrados	Componente de varianza	% de variación
Entre poblaciones	4	51.698	0.11437	9.60
Entre individuos dentro de las poblaciones	245	364.440	0.41076	34.48
Entre individuos	250	166.500	0.66600	55.91

## 6. DISCUSIÓN

Con este estudio sobre la variabilidad genética en los camarones *P. vannamei* que integran el programa de mejoramiento genético de CENIACUA se identificaron las frecuencias y distribuciones alélicas en los diferentes lotes de selección familiar y en los individuos de selección masal. Todos los loci de microsatélites evaluados en las diferentes poblaciones fueron polimórficos. El análisis a nivel de poblaciones también mostró variabilidad. El análisis de polimorfismo de los microsatélites a nivel de poblaciones no mostró diferencias significativas entre las mismas. En todas las poblaciones evaluadas el número efectivo de alelos fue menor que el número de alelos. (Figura 13).

Estos datos son similares a lo reportado por otros investigadores como en el estudio realizado por Valles-Jiménez *et al* en el 2005 en donde al evaluar la estructura genética de poblaciones de *Penaeus vannamei* desde México hasta Panamá encontró un rango en el número de alelos entre 2-16 y un rango menor en el número efectivo de alelos desde 1,5 a 10,5.

Al realizar los análisis individuales de las poblaciones, en todas las poblaciones se encontró un déficit de heterocigotos por lo que podemos decir que todas las poblaciones se encontraron en desequilibrio de Hardy-Weinberg. Con estos datos podemos corroborar la importancia de supervisar la variación genética en los programas de mejoramiento para revelar cambios en la variabilidad causada por la deriva genética, endogamia, o selección (Allendorf y Ryman, 1987).

Varios autores han reportado una clara evidencia de la pérdida de variación genética en las poblaciones cultivadas a través de varias generaciones; Sbordonni *et al* (1986) observó una progresiva reducción de la heterocigosidad de una

generación F1 a una F6 en un cultivo de *Penaeus japonicus* causado por un efecto de cuello de botella estimado por un bajo número efectivo de padres. La pérdida de variabilidad genética en las poblaciones cultivadas causadas por el uso de unos pocos padres y estrategias inadecuadas de apareamiento conllevan a un exceso en la deriva genética y a la endogamia como se ha reportado también en poblaciones de *Penaeus stylirostris* (Bierne et al., 2000), *Penaeus monodon* (Xu et al 2001) y *Penaeus vannamei* (García et al 1994; Wolfus et al., 1997). Este hallazgo fue más evidente en la población masal de tigua la cual presentó los niveles más bajo de heterocigosidad al ser comparada con todas las poblaciones (Het Obs 0.40-Het Esp 0.79). Por otra parte, la población de selección masal de Caicsa mostró niveles de heterocigosidad un poco más altos (Het\_Obs 0.52 vs Het Esp de 0.75).

El bajo grado de heterocigosidad de la población de selección masal de Tigua puede ser causado entre otras cosas porque los individuos utilizados en los cruces tienen alguna relación de parentesco y por lo tanto comparten genotipos provocando importantes procesos endogámicos. Esta población presentó el mayor grado de consanguinidad de las 5 poblaciones estudiadas ( $F_{is} = 0.48$ ). Esta es una de las líneas más antiguas en Colombia y en los últimos años se ha presentado problemas de enfermedades durante la cría y levante de reproductores en finca que han ocasionado una disminución en el número efectivo de reproductores y una disminución en la variabilidad genética de esta línea. Existen reportes de diferentes autores que atribuyen este tipo de comportamiento a las interacciones genotipo-ambiente (Kjartansson et al 2001, Jonsdottir et al 2002), sin embargo, hay que tener en cuenta que en un típico cultivo semi-intensivo de camarón todos los organismos están sujetos a las mismas condiciones básicas (calidad de agua y alimento), de tal forma que las grandes diferencias en crecimiento y resistencia a enfermedades se deben de relacionar a una base genética y a la interrelación genotipo-ambiente. En otras palabras, la constitución genética de los organismos los hace responder de una forma diferente frente a



enfermedades bajo las mismas condiciones de cultivo.

La línea de Caicsa por el contrario tuvo un grado de consanguinidad menor ( $F_{IS} = 0.29$ ) esto podría explicarse porque que en la creación de esta línea se utilizaron reproductores de varios orígenes y comparado con las otras poblaciones el número de cruces es menor, solo lleva aproximadamente cuatro generaciones de selección.

En cuanto a las poblaciones de selección familiar se refleja claramente el efecto positivo de la estrategia utilizada en la creación de los lotes ya que aumento de un 0,46 en el lote 17 a 0,61 en el lote 19 los valores de heterocigosidad observada en las poblaciones.(Tabla 14).

Teniendo en cuenta los valores de heterocigosidad observada y el coeficiente de consanguinidad del lote 17 al lote 19 podemos afirmar que las estrategias de entrecruzamiento de individuos propuestas dentro del programa de mejoramiento genético está cumpliendo los objetivos de tener una semilla de *P. vannamei* con una buena variabilidad genética y bajos índices de consanguinidad, lo que se traduce en buenos índices de productividad y resistencia a enfermedades, como lo evidencian los datos reportados por Gitterle et al 2005 en donde se demuestra una tasa de heredabilidad entre  $0.03 \pm 0.02$  and  $0.07 \pm 0.02$  para resistencia al virus de la mancha blanca (WSSV) y de  $0.21 \pm 0.04$  y  $0.20 \pm 0.04$  para el peso de cosecha en camarones *Penaeus vannamei* mejorados genéticamente por selección familiar. Es evidente que la estrategia de mezclar las líneas empleadas en la creación del lote 19 además permitió disminuir el grado de consanguinidad de aproximadamente 39% en el lote 17 a 19% en lote 19.

Por otro lado hay que tener en cuenta que la técnica de PCR para amplificación de los microsatélites puede verse afectada y producir los llamados alelos nulos lo que

origina falsos homocigotos que se generan porque uno o ambos sitios de unión de los iniciadores de la PCR presentan modificaciones puntuales, inserciones o deleciones de fragmentos de ADN, lo que impide la amplificación y produce un déficit de heterocigotos en un locus específico. En nuestro caso sospechamos de la formación de alelos nulos en el locus microsatélites 538; siendo esto una de las explicaciones para el déficit de heterocigotos como se ha planteado en investigaciones realizadas por Gaffney et al 1990 y Castric *et al* 2002. Teniendo en cuenta la estrategia propuesta por algunos autores como Wolfus 1997 quien los identifico al observar que los alelos presentes en algunos de los descendientes provenientes de cruces de *Penaeus vannamei* tenían solo el alelo materno, otros solo el alelo paterno, algunos tenían ambos y otros no tenían ninguno de los dos. Estas observaciones fueron concluyentes para identificar la presencia de alelos nulos: teniendo en cuenta estas estrategias deberían realizarse estudios de herencia mendeliana para descartar la presencia de estos falsos homocigotos en las amplificaciones por PCR.

Las estimaciones para la diferenciación de las poblaciones (AMOVA) mostraron que el mayor porcentaje de variación esta dado por diferencias entre individuos 55.9%, seguido de un 34.5% por diferencias de los individuos dentro de las poblaciones y el 9.60% restante de la varianza alélica está dado por diferencias entre poblaciones. (Tabla 15).

El grado de diferenciación entre las poblaciones de 9.6% nos confirma que se ha presentado un grado de mezcla entre las poblaciones. Otros autores han publicado resultados similares es el caso de camarón rosado *Farfantepenaeus notialis* del cual se recolectaron muestras entre las localidades del Golfo de Ana María y los resultados encontrados sugirieron una homogenización genética que podría deberse a que las larvas provenientes de diferentes localidades contribuyan a zonas de cría específicas, provocando un flujo genético entre las poblaciones. Páez y Utset, 1998).

La estructuración poblacional a grandes escalas geográficas ha sido estudiada en otras especies de peneidos. La diferenciación genética significativa encontrada en las poblaciones de *P. monodon* que habitan los Océanos Índico y Pacífico (Benzie et al. 1993; Klibunga et al. 1998, Benzie 2000), y las poblaciones del Sur de África, sureste asiático y Australasia (Benzie et al. 2002), se vinculó a fenómenos geológicos.

De manera similar, las poblaciones de *L. setiferus* que habitan el Atlántico Oeste y el Golfo de México mostraron diferencias, debido a que la península de la Florida limita el flujo de individuos entre las zonas mencionadas (McMillen-Jackson y Bert, 2003).

## 7. CONCLUSIONES

Todos los microsatélites evaluados mostraron polimorfismo (número de alelos mayor de 5) lo que permitió la evaluación de la variabilidad genética de las poblaciones.

Las poblaciones evaluadas se encontraron en desequilibrio de Hardy Weinberg por un déficit de heterocigotos. Sin embargo la variabilidad genética de las poblaciones de selección familiar ha ido aumentando (15%), siendo esto producto de las estrategias utilizadas en la creación de los lotes de individuos.

Se demostró una disminución sustancial del índice de consanguinidad entre la creación del lote 17 (0.39) hasta el lote 19 (0.19) en las poblaciones de selección familiar e individual.

La descripción genética de estas poblaciones permitió evidenciar que una de las poblaciones de selección masal (Tigua) tiene un valor de consanguinidad significativamente alto (0.48), producto seguramente de procesos endogámicos que se han dado en la creación de esta población.

La población masal de Caicsa mostró índices de consanguinidad menores (0.29) y valores de heterocigosidad mayores (0.52) al ser comparados con la población de selección masal de Tigua, la cual presento valores de índices de consanguinidad de (0.48), y de heterocigosidad de (0.40) demostrándose así el potencial genético de la población de selección masal Caicsa.

El grado de diferenciación entre las poblaciones de 9.6% es bajo con respecto a la diferenciación entre individuos dentro de las poblaciones (34.48%) y entre individuos (55.91) , lo que confirma que se ha presentado un grado de mezcla entre las poblaciones, en especial entre las poblaciones del programa de mejoramiento genético basado en la selección familiar.

Los bajos niveles de diferenciación genética encontrada en las poblaciones estudiadas evidencia la mezcla que han sufrido estas poblaciones entre sí e indica que para enriquecerlas genéticamente es necesario introducir individuos de otros orígenes.

## 8. RECOMENDACIONES

En la población de selección masal de Tigua sería recomendable realizar una renovación de la base genética utilizando individuos procedentes de otros orígenes y así introducir en ella nuevos genes que permitan aumentar la variabilidad genética en esta población y así mejorar el rendimiento de los individuos en condiciones de cultivo.

En todas las poblaciones se evidenció la presencia de alelos únicos (por ejemplo el alelo 136 del microsatélite 535 en la población de selección familiar del lote 17) los cuales podría ser útiles en estudios a futuro para utilizarlos como marcadores genéticos de la población y también podrían utilizarse para identificar alelos microsatélites marcadores que estén relacionados con caracteres de interés comercial.

El bajo grado de diferenciación entre las poblaciones confirma que se ha presentado un grado de mezcla entre las poblaciones, en especial entre las poblaciones del programa de mejoramiento genético basado en la selección familiar por lo que se sugiere que en caso de que posteriormente sea necesario aumentar la variabilidad genética de las poblaciones de *P. vannamei* en Colombia sería necesario contar con animales de diferentes orígenes, idealmente de programas de mejoramiento genético de otros países.

Este estudio nos ha permitido conocer y evaluar la variabilidad genética de la semilla de *P. vannamei* cultivada en Colombia, contribuyendo a un mejoramiento del programa y a la vez ayudo a identificar los lotes de familias con mejores índices de variabilidad los cuales tendrían la capacidad de

responder con mayor eficiencia a las diferentes condiciones ambientales y de cultivo; y además a combatir con mayor eficacia las infecciones provocadas por distintos patógenos y de esta forma contribuir con el aumento en las productividades del sector Acuicultor Colombiano.

Es importante señalar que este estudio nos genera muchas posibilidades de aplicación, por ejemplo los microsátélites nos podrían servir para inferir relaciones de parentesco entre individuos, y también para implementar programas de selección genética asistidos por marcadores moleculares, evitándose así el uso de marcaje físico (elastómeros fluorescentes) o el uso de tanques independientes por grupos familiares que implican infraestructuras físicas especiales y en consecuencia gastos en recursos económicos destinados a personal y a las instalaciones.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Alcívar-Warren, Meehan-Meola D, Wang Yongping, Guo X, Zhou L, Xiang J, Moss S, Arce S, Warren W, Xu Z, Bell K. Isolation and mapping of telomeric pentanucleotide (TAACC)<sub>n</sub> repeats of the pacific whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*, using fluorescent in situ hybridization. En: Marine biotechnology. Volumen 8. 2006. 467- 480 p.

Allendorf, F.W., and Ryman, N. Genetic management of hatchery stocks. En: Population Genetics and Fishery Management, Ryman, N., and Utter, F. (Eds.). Seattle: University of Washington Press, 1987. 141–159 p.

Avise J.C. Molecular markers, natural history and evolution. En: New York, USA: Chapman & Hall. 1994. 422p.

Avise J.C. Molecular markers, natural history and evolution, 2<sup>nd</sup> edition Sunderland, MA, USA. Sinauer Press. 2000.

Bagshaw, J., Bucholt, M. A novel satellite/microsatellites combination in the genome of the marine shrimp *Penaeus vannamei*. En: Gene, Volumen 184. 1997. 211-214p.

Bagshaw, J., y J. Quiel. Structure and polymorphism of ribosomal RNA genes in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. En: Aquaculture 159 (3-4). 1998. 333-343p.



Ball, A.O., Leonards, S., Chapman, R.W. "Characterization of (GT)<sub>n</sub> microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*)". En: Mol Ecol .Volumen 7, 1998. 1251- 1253 p.

Beckman, J.S., and Soller, M. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. En: Euphytica .Volumen 35: 1986. 111- 124p.

Benzie J. A. H, Ballment E, Frusher S. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. En: Aquaculture Volumen 111. 1993. 89- 93 p.

Benzie J. Penaeid Genetics and Biotechnology. En: Aquaculture. Volumen 164. 1998. 23- 47 p.

Benzie J. A. H. Population genetic structure in penaeid prawns. En: Aquaculture Research. Volumen 31. 2000. 95– 119 p.

Benzie J. A. H, Ballment E, Forbes A. T, Demetriades N. T, Sugama K, Haryanti M, Moria S. Mitochondrial DNA variation in Indo-Pacific populations of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. En: Molecular Ecology .Volumen 11. 2553- 2571 p.

Benzie. Genetic mapping of the black shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. En: Aquaculture Volumen 204. 2002. 297-309 p.

Bierne Nicolas, Tsitroneb Anne, and David Patrice. An Inbreeding Model of Associative Overdominance during a Population Bottleneck. En: Genetics, Vol. 155, 2000. 1981- 1990 p.

Bierne, N., Beuzart, I., Vonau, V., Bonhomme, F., and Bedier, E. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. En: *Aquaculture* .Vol 184, 2000. 203– 219 p.

Black W. PCR with Arbitrary Primers: Approach with Care. *Insect*. En: *Mol. Bio.*Vol 2, 1993. 1-6. p

Bowcock, A. M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J. Minch, E., Kidd, J. R., and Cavalli-Sforza, L. L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites.En: *Nature*. Vol 368, 1994 . 455-457. p

Broker, A. and J. Benzie. Population structure of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in Australian waters, determined using microsatellite markers. En: *Marine Biology*. Volumen 136. 2000. 149-157. p

Brown, S., Szewc-Mcfadden, A., Kresovich, S. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis. En: *Methods of genome analysis in plants*. Editado por Prem P. Jauhar. CRC Press, Inc. 1996. 147- 158 p.

Castric V, L Bernatchez, K Belkhir and F Bonhomme. Heterozygote deficiencies in small lacustrine populations of brook charr *Salvelinus Fontinalis* Mitchill (Pisces, Salmonidae): a test of alternative hypotheses En:*Heredity* . Volumen 89. 2002. 27– 35 p.

Cavalli-Sforza, L and Edwards, W.F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Amer. J. Human*. En: *Genet*. Volumen 19. 1967. 233-257. p

Chakravarti, A., L. Lasher y J. Reefer. A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. En: Genetics. Vol 128, 1991. 175-182p.

Chambers y MacAvoy . Microsatellites: consensus and controversy. Comp Biochem Physiol B Biochem .En: Mol Biol.; 126(4), 2000. 455- 476 p.

Charlesworth B and Charlesworth D. The genetic basis of inbreeding depression. En: Genet Res Camb., 674. 1993. 29-340 p.

Cheng H. H. and Crittenden, L.B. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. En: Poultry Sci. 73: 1994. 539- 546 p.

Chow, S., W. Dougherty y P. Sandifer. Meiotic chromosome complements and nuclear DNA contents of four species of shrimps of the genus *Penaeus*. En: Journal of Crustacean Biology 10 (1), 1990..29-36 p.

Crawford, A.M. A review of QTL experiments in sheep. Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. En: Genet., 14: 2001.33-38p.

Crococ P, Keys S, Dabvis G, Preston N. Indications of inbreeding depression in the growth, survival and reproductive performance of experimental inbred lines of domesticated shrimp *P. japonicus* in Australia. Abstract WAS 2001. 144p.

Darwin CR. The effects of cross and self fertilization in the vegetable kingdom. London John Murria. 1876.

Dorsten LE, Hotchkiss LA, King TM. . The effect of inbreeding on early childhood mortality: twelve generations of Amish settlement. En: Demography. Volumen 36. 1999. 262- 267p.

Dunham, R.A. The contribution of genetically improved aquatic organisms to global food security. En: International Conference on sustainable contribution of fishery to food security. Kyoto, Japan, December, 1995. 4-9 p.

FAO El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma. 2004. 1-70 p. Parte 1.

FAO Perspectivas alimentarias. Análisis del Mercado mundial Pescado y productos pesqueros. Roma. Junio 2008. 52-57 p.

Fenucci Jorge. Manual para la cría de camarones peneidos. 1988. Project reports #8.

Frankel, O.H., M.E Soulé. Conservation and evolution. Cambridge University Press, UK. 1981. 278-309p. ISBN 9780521232753

Fries, R. Mapping the bovine genome: methodological aspects and strategy. En: Anim. Genet, 24, 1993. 111-116p.

Garcia, D.K., Faggart, M.A., Rhoades, L., Alcivar-Warren, A., Wyban, J.A., Carr, W.H., and Sweeney, J.N. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. En: Mol Mar Biol Biotechnol 3, 1994. 270– 280p.

García de León, FJ, Dallas, JF. Chatain, B., Canonne, M., Versini, J.j., Bonhomme, F. Development and use of microsatellite markers in sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Perciform:serranidae). En: Mol.Mar.Biol.Biotechnol, 4, 1995. 62- 68 p.

García, D. Y J. Benzie. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. En: Aquaculture, 130, 1995. 137-144p.

Garcia, D.K., and Alcivar-Warren, A. Identification and organization of microsatellites in *Penaeus vannamei* shrimp. Proceedings of the XXVth International Conference on Animal Genetics, Tours, France, July, 21-25, 1996, Abstract C061

Garibaldi L. List of animal species used in aquaculture. Rome.FAO Fisheries 1996.Circular No 914.

Gitterle T, Rye M, De la Vega E, Faillace J, Penagos N, Soler G, Suarez Carlos. Selective Breeding of *Litopenaeus Vannamei* in Colombia. En: Panorama Acuicola, V.7. 2002. 30-31 p

Gitterle, T., Pierde B, Lozano CA, Johansen H, Suárez JA, Suárez CA, Faillace J, Erazo C de la Vega E and Rye M 2003. Selective Breeding of *Litopenaeus vannamei* in Selective breeding to improve aquaculture production. En: World Aquaculture, 28. 2003. 33-45p.

Gjedrem J. 1997. Gitterle Thomas, Salte Ragnar, Gjerde Bjarne, Cock James, Johansen Harry, Salazar Marcela, Lozano Carlos and Rye Morten. Genetic (co)variation in resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) and harvest weight in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. En: Aquaculture, Volume 246, Issues 1-4, 18. May 2005. 139- 149p.

Glenn, K. L.; Grapes, L.; Suwanasopee, T.; Harris, D. L. ; Li, Y.; Wilson, K. [S]; Rothschild, M. F. SNP analysis of AMY2 and CTSL genes in *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* shrimp. En: Animal Genetics, 36(3). 2005. 235- 236p.

Goldstein, D.B., Ruiz-Linares, A., Cavalli-Sforza, L.L. and Feldman, M.W. An evaluation of genetic distance for use with microsatellite loci. En: Genetics ,139. 1995. 463-471p.

Goodfellow, P.N. Microsatellites and the new genetic maps. En: Curr. Biol, 3. 1993. 149-151p.

Goyard E., Arnaud S., Vonau V., Bishoff V., Mouchel O., Pham D., Wyban J., Boudry P. Residual genetic variability in domesticated populations of the pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. En: Elsevier Volumen 16 ,Issue 6 .2003. 501-508p

Gregorius, H. R. and Roberds, J. H. Measurement of genetical differentiation among subpopulations. Theor. Appl. En: Genet. 71. 1986. 82~ 834 p.

Gupta , P.K., Balyan, H.s., Sharma, P.C., Ramesh, B. Microsatellites in plants a new class of molecular markers. En Curr.Sci.,70. 1996. 45-54p.

Hizer SE, Dhar AK, Klimpel KR, Garcia DK. RAPD markers as predictors of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) resistance in shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). En: Genome ,45. 2002. 1-7p.

Jenkins Jhon B. Genetica. Swarthmore College, Segunda edición. Barcelona España. Editorial Revertè, S.A. 1982. ISBN 84-291-5543-0.

Jones Adam, Ardren William. Review methods of parentage analysis in natural populations. En: Molecular ecology, 12. 2003. 2511-2523p.

Jonsdottir ODB, Imsland AK, Danielsdottir AK, Marteinsdottir G. Genetic heterogeneity and growth properties of different genotypes of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) at two spawning sites off south Iceland. En: Fish Res. 55. 2002. 37-47p.

Kimura, M. The neutral theory of molecular evolution, Cambridge University Press, Cambridge (UK), 1983.

Kjartansson AI, Foss A, Naevdal G, Stefansson SO. 2001. Selection or adaptation: Differences in growth performance of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* Refinesque) from two close-by localities off Norway. En: Sarsia. Volumen 86. 2001. 43-51p.

Klibunga S, Penman D. J, McAndrew B. J, Tassanakajon A, Jarayabhand P. Genetic variation, population differentiation, and gene flow of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* inferred from mtDNA-RFLP data. En: Advances in shrimp biotechnology. Eds. Flegel, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, 1998. 51– 59 p.

Klibunga S, Siludjai D, Wudthijinda W, Tassanakajon A, Jarayabhand P, Menasveta P (2001) Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and mitochondrial DNA RFLP analyses. En: Mar. Biotechnol, 3. 2001. 428-438p.

Koljonen, M.L., J. Tähtinen, M. Säisä y J. Koskiniemi. Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. En: Aquaculture, 212. 2002. 69-92p.

Laikre L, Jorde PE, Ryman N. Temporal change of mitochondrial DNA haplotype frequencies and female effective size in a brown trout (*Salmo trutta*) population. En: Evolution, 52. 1998. 910–915p.

Latter BD. Mutant alleles of small effect are primarily responsible for the loss of fitness with slow inbreeding in *Drosophila melanogaster*. J. En: Genetics, 148. 1998. 1143-1158p.

Levene H. On a matching problem in genetics. En: Ann Math Stat, 20. 1949. 91-94p.

Luikart, G., Sherwin, W.B., Steele, B.M., Allendorf, F.W. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. En: Mol. Ecol. 7, 1998. 963–974p.

Lyons RE, Dierens L.M, Tan SH, Preston NP, Li. Characterization of AFLP markers associated with growth in the Kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, and identification of a candidate gene. En: Marine biotechnology, 9. 2007. 712-721p.

MacNelly, J.A., Millar, K.R., Reid, W., Mittermier, R.A., Werner, T.B., 1990. Conserving the world's biological diversity. IUCN, Gland, Swiss.

MacMillen-Jackson A. L, Bert T. M Disparate patterns of population genetic structure and population history in two sympatric penaeid shrimp species (*Farfantepenaeus aztecus* and *Litopenaeus setiferus*) in the eastern United States. En: Molecular Ecology, 12. 2003. 2895–2905p.

Marklund, S., Ellegren, H, Ericsson, S., Sandberg K., Andersson, L. Parentage testing and linking analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. En: Anim. Genet. , 25, 1994. 19- 23p.



Montaño-Pérez, Karla, Villalpando-Canchola Enrique, Flores-Tom Alejandro y Vargas-Albores Francisco. Ventajas del uso de marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético. En: Panorama acuícola magazine. Edición de enero 2005

Moore, S.S., Whan, V.A., Davis, G.P., Byrne, K., Hetzel, D.J.S., Preston, N. "The development and application of genetic markers for the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. En: Aquaculture 173. 1999. 19-32p.

Morgante, M., Olivieri, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plants. En: The Plant Journal 3(1), 1993.175-182p.

Moxon y Wills. DNA microsatellites: agents of evolution. En: Scientific American 1999. 94- 99 p.

Muhlia-Almazan A., Peregrino-Uriarte A.B., Yepiz-Plascencia G.; "The mitochondrial genome of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Complete sequence analysis and description"; Submitted (20-APR-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Aquatic Molecular Biology, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unpublished

Naciri-Graven Y, Laueny A, Sebayon SA, Gerarr AA, Baud JP. Influence of parentage upon growth in *Ostrea edulis*: evidence for inbreeding depression. J En: Genet Res, 76. 2000. 159-168p.

Nagamine, Y., Higuchi, M. Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers. J. En: Anim. Breed. Genet, 118 (3). 2001. 101-109p.

Nei M .Genetic distance between populations. En: Am Nat, 106. 1972. 283-292p.

Nei, M.. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided population. En: Ann. Hum. Genet, 41. 1977. 225- 233p.

Nei, M., Tajima, F. and Tatenno, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. J. En: Mol.Evol. 19, 1983. 153-170p.

New, M. Global aguaculture: current trends and challengers for the 21 st. Century. En: World Aquaculture, 30 (1). 1999. 8- 13p.

Østergaard S, Hansen MM, Loeschcke V, Nielsen EE. Longterm temporal changes of genetic composition in brown trout (*Salmo trutta L.*) populations inhabiting an unstable environment. En:Mol Ecol., 12. 2003. 3123–3135p.

Páez J, Utset, A. A Geostatistical application to the Cuban Shrimp population management at Ana María Gulf. Second CFRAMP/FAO/DANIDA Stock Assessment workshop on the Shrimp and Groundfish Fisheries of the Brazil-Guianas Shelf. FAO, Rome, 1998 1-15p.

Pérez Julio E. La acuicultura y la conservación de la biodiversidad. En: Interciencia 21(3). 1996. 154-157p.

Pérez F, Erazo C, Zhinauka M, Volckaertb F, y Calderón J. A sex-epecific linkage map of the White shrimp *Penaeus (Litopenaeus vannamei)* base don AFLP markers. En Aquaculture . Volumen 242, issues 1-4, 20. 2004. 105-118p.

Pierce Benjamín A. Genética un enfoque conceptual. Segunda edición. Editorial medica panamericana. 2006. ISBN 8479038896.

Pongsomboon S., Whan, V., Moore, S.S. and Tassanakajorn, A. Characterization of tri- and tetranucleotide microsatellites in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. En: Science Asia, 26. 2000. 1– 8p.

Ponsuksili, S., Wimmers, K., Schmoll, F., Horst P., and Schellander, K. Comparison of Multilocus DNA fingerprints and Microsatellites in an Estimate of Genetic Distance in Chicken. J. En: Hered. , 90(6) .1999. 656- 659 p.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm análisis. En: Mol Breed., 2. 1996. 225- 238p.

Robertson Alan And. Hill William G. Deviations From Hardy-Weinberg Proportions: Sampling Variances And Use In Estimation Of Inbreeding Coefficients Genetics Abril 1984. 107 (4):703

Rochambeau, H., Fournet-Hanocq, F. and Vu Tien Khang, J.. Measuring and managing genetic variability in small populations. En: Ann. Zootech. 49. 2000. 77- 93 p.

Roseberry,B. World shrimp farming. Shrimp news International, 1998.San Diego,California, USA.

Rossetto, M., Mclauchlan, A., Harriss, F., Henry, R., Baverstock, P., Lee, L., Maguire, T., EDWARDS, K. Abundance and polymorphism of microsatellite markers in the tea tree (*Melaleuca alternifolia*, *Myrtaceae*) Theoretical and Applied En: Genetics. Volumen98, Issue 6/7. 1999. 1091-1098p.

Ruppert e., Barnes D., Zoología de los invertebrados, Mc Graw-Hill .1996.p 683-690p.

Rutten, M. J. M.; Komen, H.1; Deerenberg, R. M.; Siwek, M.2; Bovenhuis, H.2. Caracterización genética de cuatro cepas de tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*) usando marcadores microsatélites En: Animal Genetics, Volumen 35, Number 2, April 2004. 93-97(5) p.

Sbordoni, V., De Metthaeis, M., Cobolli Sbordoni, M., La Rosa, G., and Mattoccia, M. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicas* (Crustacea, Decapoda). En: Aquaculture 57. 1986. 239–251p.

Schlotterer, C., Tautz, D.. Slippage synthesis of simple sequence DNA, Nucleic En: Acids Research 20(2). 1992. 211-215p.

Schug M.D., Mackay T.F and Aquadro C.F. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila Melanogaster*. En: Nat. Genet., 15. 1997. 99-102p.

Simões, P, Rose, M.R, Duarte, A, Gonçalves, R, Matos, M, 2007. Evolutionary domestication in *Drosophila subobscura*. J. En: Evol. Biol., 20 (2). 2007. 758–766p.

Slettan , A,Olsaker, I. and Lie, O.Isolation and characterization of variable (GT)<sub>n</sub> repetitive sequences from atlantic salmon (*Salmo salar L.*). En: Anim. Genet., 24.1993.195–197p.

Subasinghe R, DM Bartly, S Megladdery, U Barg Sustainable shrimp culture development: biotechnological issues and challenges. Proc. Special Session on Shrimp Biotechnology, 5th. Asian Fisheries Forum, Thailand.1998

Takezaki, N. and Nei, M. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. En: Genetics, 144. 1996. 389-399p.

Tassanakajon A., Pongsomboon, S., Jarayabhand, P., Klinbunga, S. and Boonsaeng, V. Genetic structure in wild populations of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis. J. En: Mar. Biotechnol., 6. 1998. 249– 254p.

Tassanakajon, A., Tiptawonnukul, A., Supungul, P., Rhimphanitchayakit, V., Cook, D., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., Boonsaeng, V. "Isolation and characterization of microsatellites markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*". En: Mol Mar Biol Biotechnol 7: 1998. 55-61p

Tautz D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. En: Nucleic Acids Res 17. 1989. 6463-647p.

Thaewnon-ngiw, B., Klinbunga, S., Phanwichien, K., Sangduen, N. Lauhajinda, N. and Menasveta, P. Genetic diversity and molecular markers of introduced and native apple snails (*Genera Pomacea and Pila*) in Thailand. En: Biochem. Mol. Biol. 37, 2004. 493-502

Tiptawonnukul, A., Supungul, P., Rhimphanitchayakit, V., Cook, D., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., Boonsaeng, V. "Isolation and characterization of microsatellites markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*". En: Mol Mar Biol Biotechnol, 7. 1998. 55- 61p.

Tong, J., S. Lehnert, K. Byrne, H. Kwan y K. Chu. Development of polymorphic EST markers in *Penaeus monodon*: applications in penaeid genetics. En: Aquaculture 208 (1-2). 2002. 69-79p.

Utter, F.M. Biochemical genetics and fishery management: a historical perspective. En: Fish Biol., 39. 1991. 1–21p.

Valles-Jimenez R, Cruz P., Perez-Enriquea R. Population Genetic Structure of pacific whitw shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA variation. En: Mar.Biotechnol.,6. 2005. 475-484p.

Vonau, V., Ohresser, M., Bierne, N., Delsert, C., Beuzart, I., Bedier, E., onhomme, F. "Three polymorphic microsatellites in the shrimp *Penaeus stylirostris*. " Anim Genet. 30. 1999. 234-235p.

Weber, J. Informativeness of human (dG-dA)<sub>n</sub> polymorphismo. En: Genomics, 7. 1990. 524- 530p.

Weber J.L. and Wong C. Mutation of human short tandem repeats. En: Hum. Mol. Genetic., 2. 1993. 1123-1128p.

Weir, B.S. and Cockerham, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. En: Evolution, 38. 1984. 395-420p.

Wilson, K., Y. Li, V. Whan, S. Lehnert, K. Byrne, S. Moore, S. Pongsomboon, A. Tassanakajon, G. Rosenberg, E. Ballment, Z. Fayazi, J. Swan, M. Kenway y J. M. and Benzie, J. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. En: Aquaculture, 204. 2002. 297-309p.

Wolfus, G.M., García, D.K., Alcivar-Warren, A. Application of microsatellite technique for analysing genetic diversity in shrimp breeding programs. En: Aquaculture 152, 1997. 35- 47p.

Wright, S. Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. En: *Evolution*, 19. 1965. 395-420p.

Wright, S. *Evolution and the genetics of populations. Volumen 2. The theory of gene frequencies.* University of Chicago Press, Chicago. 1969.

Wright, S. *Evolution and the Genetics of Populations vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations.* University of Chicago Press, Chicago, IL. 1978.

Wyban, J.A., J.S. Swingle, J.N. Sweeney, and G.D. Pruder.. Specific pathogen free *Penaeus vannamei*. En: *World Aquaculture*, 24. 1993. 39- 45p.

Xu, Z., Dhar, A.K., Wyrzykowski, J., Alcivar-Warren, A., Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*). En: *Anim Genet.*, 30. 1999. 1-17p.

Xu, Z., Primavera, J.H., de la Pena, L.D., Pettit, P., Belak, J., and Alcivar-Warren, A. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. En: *Aquaculture*, 199. 2001. 13–40p.

Yeh, F.C., R.C. Yang, T.B.J. Boyle, Z.H. Ye y J.X. Mao.. POPGENE, the user-friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Centro de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad de Alberta, Canadá. 1999

Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. En: *Molecular Ecology*, 11. 2002. 1-16p.

Zeng Digang, Chen Xiaohan, Li Yongmei, Peng Min, Ma Ning, Jiang Weiming, Yang Chunling, and Li Ming . Analysis of Hsp70 in *Litopenaeus vannamei* and detection of SNPS.En Journal of Crustacean Biology, 28(4). 2008. 727-730p.



## ANEXOS

### Soluciones utilizadas

#### TAMPON TE 1X (Tris-EDTA)

Tris- HCl 1M (pH 8.0)	10ml
EDTA 0.5M (pH 8.0)	2 ml
Agua bidestilada	988ml de

Filtrar con filtro de 0,5 micrones y autoclavar.

#### TAMPON TRIS BORATO 5X (TBE 5X)

Tris base	54g
Acido bórico	27.5g
EDTA 0.5M (pH 8.0)	20ml
H <sub>2</sub> O a 1lt	

#### TAMPON TRIS ACIDO ACETICO EDTA 10X (TAE 10X)

Tris	48.4 gr
EDTA 0.5M (pH 8.0)	20 ml
Acido acético glacial	11.42 ml

Agregar suficiente agua destilada para disolver los sólidos, ajustar el pH a 7.6-7.8 y llevar a un volumen final de 1000ml con agua destilada

## TAMPON DE CARGA

Azul de bromofenol	0.25%
Glicerol	30%
Agua destilada	10ml
Conservar a 4` C	

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente.

## TIOCIANATO DE GUANIDIO

Solución de Isotiocianato de guanidio (4M isotiocianato de guanidio, 50mM Tris- HCl (pH7.5), 25mM EDTA)	23ml
2-Mercaptoetanol (1000X)	2ml

## GEL DE AGAROSA 4%

Agarosa Seakem	2%
Agarosa Nusieve	2%
Buffer de TAE 1X	75ml