



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN
POBLACIONES SELECCIONADAS Y SILVESTRES DE
CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO (*Litopenaeus
vannamei*) USANDO MICROSATÉLITES**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A
SERGIO VELA AVITÚA**

TUTOR: HUGO HORACIO MONTALDO VALDENEGRO

COMITÉ TUTORAL: ROGELIO ALONSO MORALES

HÉCTOR CASTILLO JUÁREZ

México D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

Es muy difícil nombrar a todos aquellos que han ayudado a formar esta tesis, pero quiero dedicar este trabajo en primer lugar a mi sobrina Jimena Vela por enseñarme que cada día se puede dibujar una sonrisa, a mis padres Irma y Fernando y mis hermanos Zandra, Fernando y Andrés sin ustedes no hubiera sido posible llegar hasta aquí. A mis abuelos, por consentirme tanto y enseñarme aun más.

Solecito, Adriana Espino Del Castillo, siempre vas a estar conmigo para recordarte cuando busque un rayo de sol.

Pauline Coster, eres insustituible en mi memoria, te quiero y te extraño.

A mis amigos y compañeros Sofía Rodríguez, Ana Alejandra Arroyo, Erika Trani, Mariana Gurrola, Gabriela Ortiz, Brenda Carapia, y Gisel Montaña, Adimelda Del Carmen. Andrés Campos, Ernesto Cerda y Santiago Álvarez., José Ángel Contreras, Ivan Olivera, Antonio Torres. Y los muchos que por obra de mi mala memoria no puedo recordar.

Gabriela Carranza, Ximena García Trigos y Familia Skartados, Luz Tirado. A mis amigos en el Instituto de Biología-UNAM y en Mazatlán, Sinaloa.

Y a todas las personas que con su obra y amistad han forjado a la persona que soy.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM e instalaciones de la empresa Maricultura del Pacífico S.A. de C.V. y fue parcialmente financiado con recursos del Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos CONACYT-SAGARPA-2005-12100 en conjunto con fondos de la empresa Maricultura del Pacífico S.A. de C.V.

A mi tutor Dr. Hugo H. Montaldo por su apoyo y guía durante este enriquecedor proceso.

Mi más sincero agradecimiento a la empresa Maricultura del Pacífico S. A. de C. V. y en especial al Ing. Juan Carlos Quintana, Ing. Cesáreo Cabrera e Ing. Alfonso Martínez.

De la misma manera agradezco a mi comité tutorial: Dr. Héctor Castillo y Dr. Rogelio Alonso. Integrantes del comité evaluador de esta tesis: Dr. José M. Berruecos, M. en C. Laura M. Márquez, Dr. Carlos Vásquez y Dr. Raúl Ulloa.

Personal del Instituto de Biología de la UNAM en especial a la M en C. Laura Margarita Marquez.

Personal del departamento de Genética y Bioestadística de la FMVZ-UNAM, en especial a la M. en C. Frida Salmerón. M. en C. Rocio De La Torre.

A mi familia, compañeros y amigos.

A todos ellos mi más sincero agradecimiento.

Resumen

VELA AVITÚA SERGIO. Evaluación de la variabilidad genética en poblaciones seleccionadas y silvestres de Camarón Blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) usando microsatélites. (Bajo la dirección de HUGO HORACIO MONTALDO VALDENEGRO, ROGELIO ALONSO MORALES y HÉCTOR CASTILLO JUÁREZ).

Se evaluó la variabilidad genética entre tres poblaciones de *Litopenaeus vannamei* usando microsatélites. Dos de estas poblaciones correspondieron a las generaciones 2005 y 2007 de la población de un núcleo genético comercial bajo un programa de selección para características de crecimiento y sobrevivencia. La tercera población fue una muestra de organismos silvestres tomados de 12 puntos diferentes de la costa del Pacífico Norte de México. Para el estudio usamos 77 camarones de 208 familias de la generación 2005, 73 camarones de 208 familias de la generación 2007 y 54 camarones silvestres. Todas las muestras fueron genotipificadas usando 26 loci polimórficos usando PCR en multiplex. En las poblaciones estudiadas observamos altos niveles de polimorfismo con una heterocigosidad esperada (He) promedio igual a 0.621 y un número de alelos por locus (Na) promedio de 8.48. Los valores de He fueron 0.57, 0.58 y 0.72, los valores de Na fueron 6.3, 7.2 y 12 alelos por locus para las poblaciones 2005, 2007 y silvestres respectivamente. Los valores de He y Na entre las dos generaciones bajo cultivo no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) pero hubo diferencias entre la población silvestre y ambas generaciones de la población bajo cultivo ($P < 0.05$). Estos resultados fueron confirmados usando dendrogramas

que mostraron la mayoría de los individuos silvestres como un conglomerado en una rama y separados claramente de los individuos domesticados. Sin embargo, los valores de F_{st} y R_{st} evidenciaron una pequeña diferenciación genética entre las dos generaciones de organismos domesticados ($P < 0.05$) lo cual puede sugerir que el programa de selección puede ya estar reduciendo de una forma poco perceptible la variación genética. Basados en los valores observados de H_e y N_a nuestros resultados sugieren que el efecto fundador y el programa de selección han tenido un efecto reduciendo la variabilidad genética de la población cultivada con respecto de la variabilidad presente en la población silvestre.

Palabras Clave: Heterocigosidad; diversidad poblacional; tamaño efectivo de la población, mejoramiento genético, camaronicultura, estadísticos de F.

Abstract

VELA AVITÚA SERGIO. Genetic variation between farmed and wild populations of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using microsatellite loci. (Directed by HUGO HORACIO MONTALDO VALDENEGRO, ROGELIO ALONSO MORALES and HÉCTOR CASTILLO JUÁREZ).

Genetic variation between three populations of *Litopenaeus vannamei* was evaluated using microsatellites. Two of these populations were generations 2005 and 2007 of a domesticated population under genetic selection for growth and survival in a commercial breeding program. The third population was a sample of wild organisms drawn from 12 different points of the North Pacific coast of Mexico. We used 77 shrimp samples from 208 families from generation 2005, 73 shrimp samples from 208 families from generation 2007 from the farmed population and 54 shrimp samples from wild organisms. All the samples were genotyped for 26 polymorphic microsatellite loci using multiplex PCR. In the studied population we observed high polymorphism levels with an average expected heterozygosity (H_e) of 0.621 and average number of alleles per locus (N_a) of 8.48. The H_e values were 0.57, 0.58 and 0.72 for the 2005, 2007 and wild populations, respectively, and the N_a values were 6.3, 7.2 and 12 alleles per locus for the populations 2005, 2007 and Wild population, respectively. H_e and N_a values between the two generations were not statistically different ($P > 0.05$) but there were differences ($P < 0.05$) between the wild population and both generations of selected shrimp. These results were confirmed using dendrograms which showed most of the wild individuals as a cluster into a node clearly separated from the domesticated

individuals. Nevertheless, the significant F_{st} and R_{st} observed values ($P < 0.05$) evidenced a small genetic differentiation between the two generations of domesticated shrimps, which may suggest that the selection breeding program can be already slightly reducing the genetic variation of the domesticated population. Based on H_e and N_a observed values, our results also suggest that the founder effect and the selection program have had a reducing effect on the genetic variation of the farmed population when compared to that observed on the wild population.

Keywords: Heterozygosity, population diversity, effective population size, genetic improvement, shrimp culture, F-statistics.

Contenido

Resumen	iii
Abstract	v
Lista de Cuadros	ix
Lista de Figuras.....	x
1. Introducción.....	1
1.1 Situación de la camaronicultura en México.....	1
1.2 Importancia de la variabilidad genética en programas de mejoramiento genético	2
1.3 Uso de microsatélites en estudios de variabilidad genética	3
1.4 Índices de variabilidad genética de poblaciones	5
1.5 Resultados de estudios de variabilidad genética en acuicultura	7
2. Justificación.....	9
3. Objetivos	11
4. Hipótesis.....	12
5. Material y Métodos	13
5.1 Material biológico	13
5.1.1 Determinación del tamaño de muestra	13
5.1.2 Origen y descripción de las muestras	14
5.2 Genotipificación de las muestras	15
5.2.1 Extracción de ADN.....	16
5.2.2 Elección de los loci candidatos para la creación de los grupos en multiplex.....	16
5.2.3 Generación de los grupos de multiplex.....	17
5.2.4 Reacciones de PCR.....	22
5.3 Índices y métodos para la evaluación de la variabilidad genética poblacional y diferenciación poblacionales.	25
6. Resultados	27
6.1 Niveles de Polimorfismo.....	27
6.2 Variabilidad Genética de las Poblaciones.	30
6.3 Distancias Genéticas	38
6.4 Diferenciación Génica	38

6.5 Diferenciación Genotípica	40
6.6 Dendrogramas	41
7. Discusión.....	45
8. Conclusiones.....	51
9. Bibliografía	53
Anexo A.....	64
Anexo B.....	66

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Información de los loci elegidos para el estudio de microsatélites.....	19
Cuadro 2. Microsatélites usados en el estudio de acuerdo al grupo de multiplex correspondiente.	24
Cuadro 3. Resultado de la prueba para comprobar equilibrio H-W por cada población.....	28
Cuadro 4. Resultados de H_e y H_o por población por locus y promedio.	31
Cuadro 5. Resultados de H_e y H_o por locus y promedio en todas las poblaciones.	32
Cuadro 6. Resultados de Diversidad Alélica por población, por loci y media a través de todos los loci.	34
Cuadro 7. Resultados de la prueba de cuello de botella de acuerdo a los diferentes modelos de mutación..	36
Cuadro 8. Resultados de tamaño efectivo de población (N_e) por población.	37
Cuadro 9. Resultados de distancias pareadas entre poblaciones.	38
Cuadro 10. Diferenciación Génica. Resultados de la prueba de J_i cuadrada para todos los loci	38
Cuadro 11. Valores de probabilidad de diferenciación génica pareadas por locus.	39
Cuadro 12. Diferenciación genotípica, resultados de la prueba de J_i cuadrada para todos los loci	40
Cuadro 13. Valores de probabilidad de diferenciación genotípica pareadas por locus.....	41

Lista de Figuras.

Figura 1. Error estándar de la heterocigosidad esperada de acuerdo al número de individuos y loci utilizados	14
Figura 2. Valores de <i>He</i> y <i>Ho</i> por población.	30
Figura 3. Resultados de diversidad alélica por población.....	33
Figura 4. Dendrograma mostrando la distancia existente entre las poblaciones....	42
Figura 5. Dendrograma mostrando los individuos de acuerdo al resultado de los análisis de alelos compartidos.	43
Figura 6. Dendrograma mostrando los individuos de las poblaciones de cultivo por el método de alelos compartidos.....	44

1. Introducción

1.1 Situación de la camaronicultura en México

En México la camaronicultura se desarrolla como una actividad económica estable desde la década de 1980. A partir de entonces se ha constituido en una importante fuente de empleos permitiendo la creación hasta el año 2004 de más de 12,000 puestos de trabajo permanentes directos tan solo en el noreste mexicano (FAO, 2006; FAO *et al.*, 2006), además de los empleos indirectos que se generan en áreas como procesamiento, mercadeo etc. (FAO *et al.*, 2006).

En el país, la producción de camarón cultivado en sistemas controlados aumentó de 35 toneladas en 1985 a 72,279 toneladas en 2004 lo que para ese año representó el 57.56% de la producción de camarón nacional, con un valor de \$3,048,496,000.00 pesos (CONAPESCA-SAGARPA, 2004). Tan solo en el estado de Sonora, principal productor de camarón del país, se registraron 44,529 toneladas en 2004 con un valor estimado de \$1,890,973,000.00 pesos lo que representó un aumento del 10% con respecto al año 2003 (CONAPESCA-SAGARPA, 2003; 2004).

A consecuencia del crecimiento de la industria camaronícola han surgido empresas dedicadas a la producción de larvas de camarón como forma de sustituir el uso de larvas de origen silvestre en el ciclo de producción de este crustáceo, debido principalmente a la disminución de la disponibilidad, requerimientos sanitarios, la necesidad de organismos con mejor desempeño productivo y restricciones con respecto a su captura (Gjedrem, 2005; FAO *et al.*,

2006). Algunas de estas empresas han incorporado programas de mejora genética, con el fin de satisfacer la necesidad de la industria y ofrecer organismos con mejor desempeño productivo, en donde las estrategias de selección son una herramienta fundamental para alcanzar sus objetivos.

1.2 Importancia de la variabilidad genética en programas de mejoramiento genético

La respuesta genética en programas de selección depende principalmente de cinco factores: variabilidad genética, intervalo generacional, intensidad de selección, tamaño efectivo de la población y precisión de selección (Aggrey *et al.*, 1995). En un programa de mejora genética se hace uso de estrategias de selección, cuyo objetivo es elegir a aquellos organismos que contengan las variantes genéticas más adecuadas a las condiciones de producción bajo las que son evaluados, con la finalidad de ser los progenitores de la siguiente generación, lo que trae como consecuencia la disminución del tamaño efectivo de la población (Gomez-Raya *et al.*, 2002).

Dado que la variación genética se pierde paulatinamente debido a la acción de la deriva génica debido al tamaño finito de la población y como resultado de la selección, en el mediano y largo plazo, y con el fin de continuar avanzando en los programas de mejora genética o reorientar el programa hacia otras características, la variabilidad genética deberá tomarse en cuenta en los esquemas de mejora genética, para tratar de disminuir, en la medida de lo posible, su pérdida (Goldstein *et al.*, 1995; Goldstein y Schlötterer, 1999; Notter, 1999; Bierne *et al.*, 2000; Hill, 2000; Gautschi *et al.*, 2003; Toro *et al.*, 2006).

En los programas de selección del camarón, como en cualquier programa de selección, existe una tendencia a reducir la variación genética aditiva, debido a la disminución en el tamaño efectivo de las poblaciones (Gjedrem, 2005).

Disminución que puede producir acumulación de consanguinidad en la población, y ocasionar lo que se conoce como depresión por consanguinidad (Gjedrem, 2005).

Por lo anterior, se recomienda el monitoreo de la variabilidad genética a lo largo de las generaciones, para revelar cambios (Ryman y Utter, 1987). Razón por la cual en camaronicultura y en el cultivo de otras especies acuícolas de interés económico, se han realizado trabajos encaminados a la evaluación de la variabilidad genética de poblaciones sujetas a esquemas de mejora genética.

La variabilidad genética puede evaluarse mediante el uso de marcadores moleculares que permitan diferenciar entre genotipos de los organismos, además de poder evaluarse usando información de pedigrís (Wright, 1922; Baumung y Sölkner, 2003), marcadores genéticos basados en el fenotipo (Kristensen *et al.*, 2005) y características cuantitativas (Carvajal-Rodríguez *et al.*, 2005).

1.3 Uso de microsatélites en estudios de variabilidad genética

El uso de microsatélites como marcadores genéticos es una opción eficaz para realizar evaluaciones en la diversidad genética en poblaciones, como lo demuestra su amplio uso (Wolfus *et al.*, 1997; Morera *et al.*, 1999; Diez-Tascon *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001; Baumung y Sölkner, 2003; Cruz *et al.*, 2004; Valles-Jiménez *et al.*, 2004; DeDonato *et al.*, 2005). Además, debido al gran número de alelos por locus,

los microsatélites tienen el mayor contenido de información polimórfica de entre todos los marcadores de ADN (Liu y Cordes, 2004).

Los microsatélites consisten en múltiples copias de secuencias simples repetidas de uno a seis pares de bases organizadas en tándem (Liu y Cordes, 2004). Se han encontrado gran abundancia de este tipo de marcadores en todas las especies estudiadas; en peces se ha estimado uno de ellos cada 10 Kb (Liu y Cordes, 2004). Además se han encontrado repartidos en todo el genoma, tanto en regiones codificantes, regiones intrónicas como en secuencias fuera de los genes (Liu y Cordes, 2004). La mayoría de los microsatélites son de tamaño relativamente pequeño, partiendo de algunos pocos repetidos hasta algunos cientos. Este tamaño relativamente pequeño facilita la reacción en cadena de la polimerasa necesaria para su resolución. Se ha observado que los microsatélites formados por un número mayor de repeticiones se relacionan con un mayor polimorfismo (Liu y Cordes, 2004).

Su alto nivel de polimorfismo se atribuye a su tasa de mutación que ha sido estimada en magnitudes de hasta 10^{-2} eventos por locus por replicación en *Escherichia coli*; de entre 10^{-4} y 10^{-5} en levaduras y de 10^{-3} a 10^{-4} en ratones, comparado con los niveles de mutaciones puntuales estimadas en magnitudes de 10^{-9} (Goldstein y Schlötterer, 1999). Tratando de explicar esta alta tasa de mutación se han elaborado varias hipótesis, siendo las más aceptadas dos de ellas; la primera involucra solamente a una de las cadenas de la doble hélice de ADN postulando que se debe a errores durante la replicación de ADN llamados "slippage" o deslices, lo que aumenta o disminuye la cadena en una o más

repeticiones; el segundo modelo se refiere a la recombinación entre moléculas de ADN (Goldstein y Schlötterer, 1999; Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

El uso de técnicas de fluorescencia empleadas en la secuenciación automática, así como el uso de electroforesis capilar, ha ayudado a aumentar la capacidad de procesamiento de muestras, facilitando y promoviendo el uso de los microsatélites (Liu y Cordes, 2004).

En investigación acuícola los microsatélites ya han sido utilizados para estudios de mapas genéticos, asignación de paternidades y estudios de genética de poblaciones (Liu y Cordes, 2004).

1.4 Índices de variabilidad genética de poblaciones

Como medida de variabilidad genética se ha usado tradicionalmente el concepto de Heterocigosidad Esperada (\hat{H}_e) (Nei y Roychoudhury, 1974) que se define como la proporción de heterocigotos en la población si la misma se encontrara en equilibrio Hardy-Weinberg (H-W), su estimador insesgado se calcula como:

$$\hat{H}_e = \frac{2N}{2N - 1} \left(1 - \sum_{i=1}^n \hat{p}_i^2 \right)$$

Donde N es el número total de individuos, p_i la frecuencia del alelo i de entre n alelos.

Además de estas medidas encontramos la Heterocigosidad Observada (\hat{H}_o) (Nei, 1987) que es un estimador cercano al valor de \hat{H}_e en poblaciones en equilibrio H-W y se define como el número de heterocigotos observados en la población y se calcula como:

$$\hat{H}_o = \sum_{i < j}^n \hat{P}_{ij}$$

Donde \hat{P}_{ij} es la frecuencia del alelo i del locus j de entre n loci.

Además de estas medidas, se utilizan índices de diversidad alélica los cuales se proponen como una alternativa o medidas complementarias a los valores de heterocigosidad. Dentro de estos índices encontramos valores de Número de Alelos Observados (A_n) (Gillespie, 2004) definido como el número de alelos presentes en la población; Número de Alelos Efectivos (A_e) (Gillespie, 2004) que se define como el número de alelos que contribuyen a la variabilidad genética para la siguiente generación y el Número de Alelos Únicos (A_p) (Gillespie, 2004) que se define como el número de alelos presentes en una población y que no están presentes en el resto de las poblaciones. Debido a que las medidas de diversidad alélica se ven fuertemente influenciadas por el tamaño de muestra (Leberg, 2002) se ha usado el método de rarefacción para compensar las diferencias en el tamaño de muestra de cada población. Usando el método de rarefacción se han desarrollado estimadores de Número de Alelos (corregidos por rarefacción) (A_c) (Leberg, 2002; Kalinowski, 2005a) que se define como el número de alelos presentes en cada población suponiendo tamaños de muestra iguales; Número de Alelos Únicos (A_u) (Kalinowski, 2002) que se define como el número de alelos exclusivos de una población y que no están presentes en otras poblaciones suponiendo tamaños de muestras iguales.

1.5 Resultados de estudios de variabilidad genética en acuicultura

En acuicultura, la mayor parte de los trabajos se han enfocado hacia la evaluación de poblaciones cautivas, comparando además esta variabilidad con poblaciones silvestres (Xu *et al.*, 2001; Goyard *et al.*, 2003; Lundrigan *et al.*, 2005; Melon Barroso *et al.*, 2005; Luan *et al.*, 2006); en menor cantidad se han realizado trabajos que evalúan la variabilidad genética a lo largo de varias generaciones (Norris *et al.*, 1999; Lundrigan *et al.*, 2005; Machado Tamayo, 2006) empleando en ambos casos diferentes marcadores genéticos.

En el estudio realizado por Goyard *et al.* (2003), usando valores de heterocigosidad esperada (H_e) y número de alelos (A_n) se obtuvieron valores en ocho poblaciones de Camarón Azul (*Litopenaeus stylirostris*) bajo selección y de una población silvestre usando microsatélites, observando que los niveles de H_e y A_n eran menores en las poblaciones bajo selección con respecto a la población silvestre. Resultados similares fueron obtenidos por Xu *et al.* (2001) en poblaciones silvestres y bajo cultivo de la especie *Peneaus monodon* observando valores de A_n mayores para la población silvestre con respecto de los cultivados. Luvesuto *et al.* (2007) al comparar tres generaciones de una población sujeta a un programa de selección usando microsatélites no encontraron evidencia de diferencias en los valores de H_e y A_n entre las generaciones. Por otro lado, en estudios de variabilidad genética en el Salmón del Atlántico (*Salmon salar*) Norris *et al.* (1999) y Rengmark *et al.* (2006) hallaron diferencias en poblaciones en cautiverio bajo selección comparado con poblaciones silvestres usando valores de A_n y Alelos únicos o privados (A_u) pero no para la H_e . Por otra parte Norris *et al.*

(1999) al comparar entre generaciones de las poblaciones bajo selección no encontraron diferencias entre los valores de H_e , A_n ni de A_u . Brown (2004) al analizar poblaciones silvestres y en cautiverio de *Sparus aurata* observó que los valores de H_e en la población de cautiverio fueron mayores que en la población silvestre, sin embargo los valores de A_n fueron mayores en la población silvestre, estos resultados fueron atribuidos a la poca diferenciación entre las poblaciones observado en los resultados de pruebas de diferenciación genética (G_{st}) donde los valores obtenidos fueron menores a 0.1.

2. Justificación

Este trabajo responde al interés por obtener información sobre la variabilidad genética de la población núcleo de camarón Blanco del Pacífico de la empresa Maricultura del Pacífico. Esta población formada en 1998 a partir de varias poblaciones de camarones silvestres y domesticadas, fue sometida a un programa de selección masal hasta el año 2002, en que se implementó un programa de selección usando información combinada familiar y masal. Este interés se basa en la necesidad de conocer el efecto de la selección y el efecto fundador sobre la variabilidad genética con el fin de conservarla o incrementarla mediante estrategias que pueden incluir la incorporación de material genético silvestre.

A pesar de que se han publicado algunos trabajos de variabilidad genética en *L. vannamei* (Freitas y Galetti Jr, 2002; Cruz *et al.*, 2004; Valles-Jiménez *et al.*, 2004; Freitas y Galetti Jr, 2005; Freitas *et al.*, 2007a; Souza de Lima *et al.*, 2008), no se han realizado trabajos con el objetivo de comparar generaciones sucesivas de selección de la misma población con organismos silvestres usando microsatélites y sólo el trabajo de Arena *et al.* (2003) hace comparaciones entre la variabilidad de organismos silvestres y generaciones sucesivas de selección en *L. vannamei* haciendo uso de isoenzimas como marcadores moleculares, sin embargo, las isoenzimas han probado ser menos polimórficas e informativas que los microsatélites (Liu y Cordes, 2004). Este tipo de estudios puede permitir cuantificar las pérdidas de variabilidad genética de poblaciones cautivas seleccionadas y compararlas con poblaciones silvestres (Norris *et al.*, 1999;).

Adicionalmente, la metodología usada en varios de estos estudios (número de loci, tipo de marcadores genéticos utilizados) ha limitado probablemente la potencia de las comparaciones.

3. Objetivos

1. Comparar la variabilidad genética de la población núcleo seleccionada de Camarón Blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) de la empresa Maricultura del Pacífico, S.A. de C.V., con una población silvestre a partir de muestras obtenidas en el Océano Pacífico Mexicano.
2. Comparar la variabilidad de dos generaciones de la población núcleo de selección 2005 vs 2007.

4. Hipótesis

1. La población silvestre tiene mayor variabilidad genética que la población del núcleo genético de Maricultura del Pacífico, S.A. de C.V.
2. La selección realizada en el núcleo genético de la empresa Maricultura del Pacífico, S.A. de C.V., ha provocado una disminución de la variabilidad genética de la población entre las generaciones 2005 y 2007.

5. Material y Métodos

5.1 Material biológico

5.1.1 Determinación del tamaño de muestra

Dado que en el presente estudio el número de individuos y el número de loci deberían permitir establecer diferencias pequeñas entre las poblaciones, en especial entre dos generaciones de organismos de cultivo, se realizaron evaluaciones para estimar la varianza de la heterocigosidad esperada al muestreo (Nei, 1973; Nei y Roychoudhury, 1974; Nei, 1977) con la finalidad de evaluar estos parámetros dadas diferentes condiciones de número de loci y tamaño de muestra. Para la realización de estos cálculos se usaron datos de frecuencias alélicas de 4 loci reportados en Cruz *et al.* (2004). Adicionalmente se generaron datos de frecuencias alélicas de loci que se supusieron neutros y con distribución normal de los tamaños de fragmentos.

En la Figura 1 se observa el comportamiento del error estándar de la heterocigosidad para diferente número de loci donde se puede apreciar un comportamiento similar para todos los números de loci evaluados a medida que aumenta el tamaño de la muestra.

Los cálculos muestran que a partir de 50 individuos muestreados, el cambio en la varianza intralocus es mínima (menor a 0.01), sin embargo, a medida que aumenta el número de loci muestreados, el cambio en el error estándar se ve afectado en mayor medida. Lo anterior nos indica que el número de loci muestreados tiene un efecto mayor que el número de organismos muestreados para disminuir el valor del error estándar de la heterocigosidad. Lo anterior

permitió establecer tanto el número de individuos y el número de loci requeridos con el fin de disminuir el error estándar de la heterocigosidad, de modo que se contara con una mayor potencia estadística en el estudio.

A partir de lo anterior se concluyó que se utilizarían al menos 25 loci para todas las poblaciones, y al menos 70 organismos por generación para el caso de las poblaciones provenientes del núcleo genético.

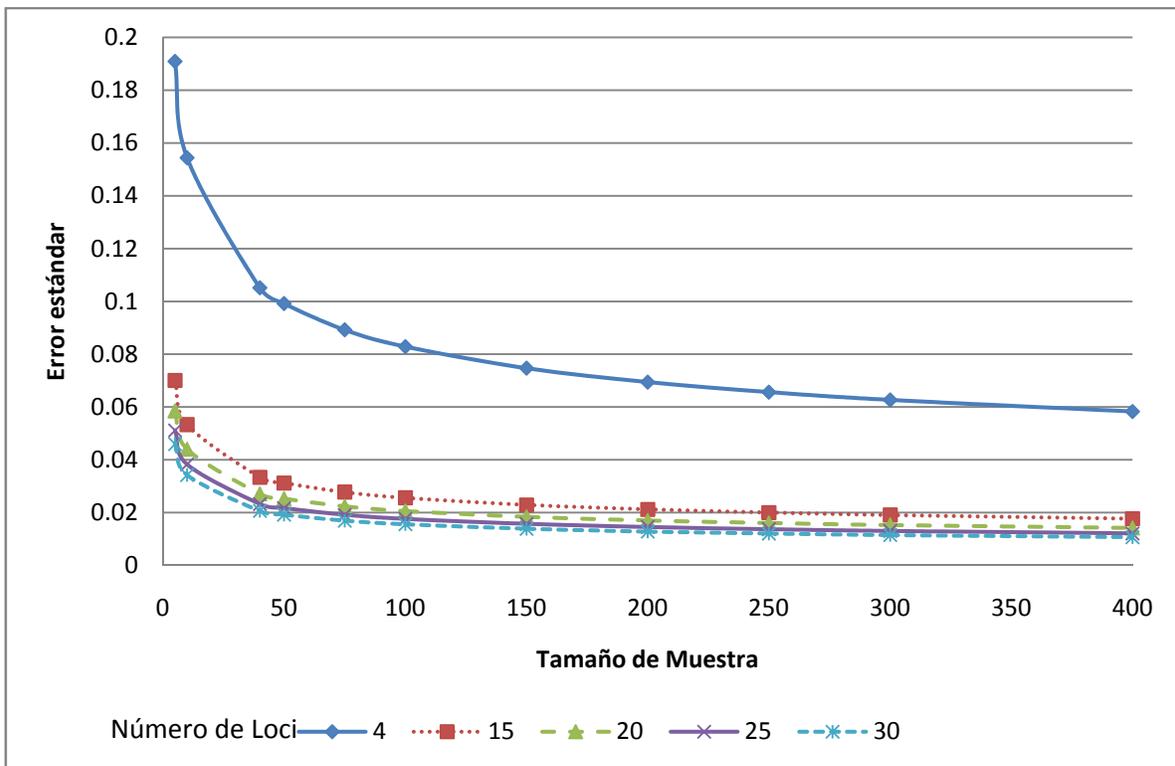


Figura 1. Error estándar de la heterocigosidad esperada de acuerdo al número de individuos y loci utilizados

5.1.2 Origen y descripción de las muestras

Para la realización de este trabajo se utilizaron muestras pertenecientes a organismos provenientes del núcleo de mejora genética de la empresa Maricultura del Pacífico S.A. de C.V. y organismos de origen silvestre. Como ya se menciono anteriormente, la población de la empresa Maricultura del Pacífico S.A. de C.V. se

formo en el año 1998 a partir de varias poblaciones de camarones silvestres provenientes de la costa de Sinaloa incorporando a su vez organismos domesticados provenientes de Venezuela, Colombia, Florida y Ecuador poblaciones que fueron formadas por individuos silvestres obtenidos originalmente del Océano Pacífico.

Se almacenaron postlarvas de 206 familias de la generación 2005 y 201 familias de la generación 2007 del núcleo de mejora genética correspondientes a postlarvas de 30 días de edad. Además se obtuvieron 54 muestras de organismos silvestres correspondientes a abdómenes provenientes de 12 puntos diferentes del Océano Pacífico Mexicano ubicados entre las latitudes 21°48' a 24°13' W y altitudes 105°47' a 107°27' N. Las postlarvas y abdómenes fueron mantenidas en etanol al 70% hasta su procesamiento.

Se seleccionaron en forma aleatoria 77 familias de la generación 2005 la cual se denominó población G05 y 73 familias de la generación 2007 que se denominó población G07, de cada una de las cuales se usó un organismo.

Para el caso de los organismos silvestres se usaron las 54 muestras disponibles y a esta población se le denominó población Silv.

5.2 Genotipificación de las muestras

El procesamiento de las muestras y los análisis de los fragmentos se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM.

5.2.1 Extracción de ADN

Con la finalidad de obtener ADN con la pureza y concentración requeridos, se compararon dos diferentes métodos de extracción. Para ésto se realizaron 3 extracciones con cada uno de los métodos y se compararon los resultados de concentración, pureza y tiempo requerido por extracción. Los métodos que se evaluaron fueron:

- 1. Kit de extracción Qiagen DNeasy Blood and Tissue (Foster City, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante;
- 2. Protocolo de precipitación por sales para extracción de ADN a partir de tejido (Anexo A).

De acuerdo a los resultados obtenidos se eligió el uso del Kit de extracción de Qiagen.DNeasy Blood and Tissue.

Con el fin de disminuir el tiempo de almacenamiento, las extracciones de ADN de todas las muestras elegidas se realizaron una vez que fueron obtenidos los parámetros para las reacciones de PCR. Cada una de las extracciones fue cuantificada mediante espectrofotometría, además de electroforesis en geles de agarosa al 1%.

5.2.2 Elección de los loci candidatos para la creación de los grupos en multiplex

Los loci tipo microsatélites evaluados fueron obtenidos a partir de la literatura y bases de datos públicas GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y MENotes-DB-search (Molecular Ecology Notes primers DBase Search) (<http://tomato.bio.trinity.edu>).

A partir de esta búsqueda se generó una lista de 72 microsatélites polimórficos para *L. vannamei*. Los criterios para su elección fueron que al menos el tamaño de fragmento fuera de 80 pares de bases (pb), ésto debido a que en los análisis de electroforesis capilar para análisis de fragmentos con fluorescencia no es posible una clara resolución de fragmentos de menor tamaño; el segundo criterio fue que al menos cada locus tuviera 3 alelos reportados para garantizar su polimorfismo.

5.2.3 Generación de los grupos de multiplex

Mediante el uso del programa MultiPLX (Kaplinski *et al.*, 2005) se crearon cinco grupos de microsatélites con características compatibles para su amplificación en reacciones de PCR tipo multiplex. Este software incorpora evaluaciones para evitar interacciones entre los iniciadores de PCR (primers) y con las secuencias blanco que quieren ser amplificadas, además de evaluar diferencias en las temperaturas de alineamiento de los mismos y diferencias entre los tamaños de los amplificados.

El análisis mediante el software generó cinco grupos de marcadores de los cuales sólo se conservaron cuatro ya que el quinto grupo tenía sólo tres loci. Los microsatélites de cada uno de estos grupos fueron ordenados de acuerdo al rango de tamaño en pares de bases (pb) de los alelos reportados y analizado manualmente para asignarle un fluoróforo, de tal manera que loci con rangos que se traslapasen o con diferencias menores a 20pb no fueran asignados con el mismo fluoróforo y de esta forma pudieran ser distinguidos, dando siempre prioridad a loci que presentaran mayor número de alelos.

Como resultado final de este procedimiento se obtuvieron 4 grupos con un total de 36 microsatélites que se muestran en el Cuadro 1. Los grupos fueron denominados como LvMG1, LvMG2, LvMG3 y LvMG4

Cuadro 1. Información de los loci elegidos para el estudio de microsatélites.

Nombre	Dirección	Secuencia Primers	Marcaje	Rango de tamaño de alelos (Pb)	# Alelos reportados
CNM-MG-479*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	GTGAAGTTGGGATTATAG CTGCCAGTTTAGCGAC	FAM	96-109	12
Pvan0040	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	TTTACGATCAGATTGTTC GAAATAGAAAATAAAGAAC	FAM	145-157	6
CNM-MG-356*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	TGCGTTCACATTTCCA AATTGAGTGTCCCTTGC	FAM	180-192	4
CNM-MG-351*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	GCAAACAGGAGACAAT CGGACTCTAGCAATAA	FAM	212-238	15
CNM-MG-412*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	GCCATTTGATTGCTCT TGACTTGGTCTTTGTTAG	FAM	243-256	5
CNM-MG-364*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	CGTCGTAGTCACAAGAT CAGTATCAATACCGTCCT	HEX	166-186	7
CNM-MG-339*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	AAACAACATATTGCAGTTC AAGCGTCAGATTCCAG	HEX	150-192	9
CNM-MG-387*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	CAGTCATACGGAGAC CTTGCGTGAAATTGTT	HEX	217-230	4
Lvan10+	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	ATAAGAAGGTCGTTTCTCTC AATACGACTCAACTATAGGG	HEX	279-326	10
CNM-MG-421*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	TTTCTGCCACGGAGTT CTGTTGCCCAAATAGC	FAM	145-153	4
CNM-MG-390*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	CGTAAGATGTGCCAGT CAGTTATAAAGTCAAAGTA	FAM	259-268	5
CNM-MG-367*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	AAACCACCCTGACCATC CTGTGCCAAATTACAAGC	FAM	285-308	6

CNM-MG-384*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	ATCGGGAATACAATCG AACCCCTAACAAACAATAAG	HEX	226-257	9
CNM-MG-386*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	CGAGCACAGGAAGATA TCTGGGAGAAGGGATA	HEX	273-293	4
CNM-MG-357*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	GCTTGAATCGCTACTGC GTTGCTGCCACTCATT	HEX	308-319	4
Lvan09‡	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	ATCTCGATAAGGAACTGAC GACAGGTTTGTCTTCACAG	TET	189-223	12
CNM-MG-355*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	TGGCATTTCATCTTTGG AAGAGGCACTTCATCC	TET	287-305	7
Pvan1815	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	GATCATTGCCCCCTCTTTTT ATCTACGGTTCGAGAGCAGA	TET	380-392	5
Lvan07‡	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	AAAGAGGAAGATGAGGAAG CCTCGGTTACGTATTTATTG	FAM	427-500	10
CNM-MG-487*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	GACAGACAGTGGTGGCG CGTTCTCCTTGCGTGATG	FAM	194-227	13
CNM-MG-496*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	TGTCACTGTTGAGCCCTACT CAGATTCCTCAGCCTCCT	FAM	251-260	7
HLJN-030†*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	AAGTGTGTGAGCGAGTGTGG GTCGGGTCTTGGCTGTCA	FAM	273-286	5
CNM-MG-430*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	GGGAAGCCCAAATAAGA AAAGAAGAGGAAAGGGATAG	HEX	126-141	12
CNM-MG-369*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	AGCAAGCATTCCCTCCTA TTGTGGTCGAACCTAAAC	HEX	188-246	18
CNM-MG-383*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	TTCCTCGTCATTTTAC TGCTTACACCGCCAGA	HEX	189-201	7
Lvan01‡	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	GCCATAAACGCAAGACTGAG GCAGGTATACGGTCATGTGTA	FAM	136-146	6

Pvan1758†	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	TATGCTCGTTCCTTTGCTT TTGAAGGAAAAGTGTGGGG	FAM	163-189	14
CNM-MG-354*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	AAGACAGAAAGGGTGA CAAGAGGGAGAAAGTAG	FAM	200-210	10
HLJN-004†*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	GGGAGGCTAAAAGATGGTGA GGGTGAGGCGAGACAATTC	FAM	225-249	7
CNM-MG-416*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	TGCCAGTGCCATTTGA CCTCCTCCTCCCAACT	FAM	294-324	7
CNM-MG-362*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	TACTTGGACCTCAGTCA GCACGCTTAGTCTCAA	HEX	189-224	21
CNM-MG-380*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	CGAGCGTTATCAAATG GAAATGATGGGGAAGA	HEX	236-266	7
CNM-MG-371*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	CCAAGAGGGAGTAGAAA GGATAAACACGAAACC	HEX	284-309	10
CNM-MG-507*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	GATCCCGATGCCGTAGC TGTTTACCAGTTGGGTCCAT	HEX	360-370	4
HLJN-023†*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	AAGAGAGATGGAAGGAGTAAGTGC GATCAATACCTTGCAGCGAAA	TET	226-238	5
CNM-MG-474*	Fw 5'-3' Rv 5'-3'	CTGGCTTGTGGAATGG CAACGAAAGGCAGATGG	TET	274-280	4

‡ (Freitas *et al.*, 2007b)

†* (Zhi-Ying *et al.*, 2006)

† (Cruz *et al.*, 2002)

* (Pérez *et al.*, 2005)

5.2.4 Reacciones de PCR

Los oligonucleótidos iniciadores (primers) para PCR fueron comprados a Invitrogen (Carlsbad, CA) los cuales fueron provistos en forma desalada a una concentración de 200 nmoles.

Cada uno de los primers fue probado en forma separada haciendo uso de 3 muestras y con los parámetros originalmente reportados y observando los productos de los mismos en geles de agarosa al 3%.

Para las reacciones tipo multiplex se utilizó el kit Qiagen Multiplex PCR (Foster City, CA) el cual es un kit específico para la optimización de reacciones en multiplex y una termocicladora Applied Biosystems 9700.

Una vez probada la amplificación independiente de cada uno de los microsatélites, se procedió a la evaluación de las reacciones en multiplex; para esto se utilizó una termocicladora de gradiente, con el fin de probar diferentes temperaturas de alineamiento (T_m), pues la T_m es reconocida como uno de los factores más importantes dentro de los parámetros para una exitosa PCR. Cada uno de los 4 grupos obtenidos mediante el análisis en computadora se probó en un rango de 43°C a 65°C, con una concentración final de cada uno de los iniciadores de 0.2 μ M, $MgCl_2$ 6mM y ADN molde en concentración de 8 a 10 ng.

Los productos de PCR se llevaron a resolver mediante electroforesis capilar en el ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, capaz de distinguir entre los diferentes fluoróforos con los que habían sido marcados los iniciadores. Una vez obtenidos los resultados se observó que solamente los grupos LvMG1 y LvMG2 lograron ser

amplificados de forma exitosa, consiguiéndose la amplificación de 8 y 7 loci respectivamente, en los dos grupos restantes se observaron menos de 50% de loci amplificados.

Debido a los resultados anteriores y dado que la amplificación independiente de cada loci había sido exitosa, los grupos LvMG3 y LvMG4 fueron nuevamente evaluados mediante el software MultiPLX para formar 2 subgrupos de cada uno de ellos. Esta evaluación se realizó utilizando mayores restricciones en la diferencia de temperaturas de alineamiento e interacciones entre los iniciadores obteniéndose 4 nuevos grupos denominados LvMG3-1, LvMG3-2, LvMG4-1 y LvMG4-2.

Estos 4 subgrupos fueron amplificados en las condiciones de concentración de iniciadores, ADN molde y sales ya mencionadas, utilizando el mismo rango de temperaturas de alineamiento de 43°C a 65°C y resueltos mediante el uso del secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. En esta ocasión se obtuvo la correcta amplificación en todos los grupos. En el cuadro 2 se muestra la composición final de cada uno de los grupos y en el Anexo B se muestran los parámetros finales elegidos para las reacciones de PCR.

Para la genotipificación se realizaron diluciones para obtener concentraciones de ADN de entre 8 y 12 ng/μl de todas las muestras.

Posteriormente se realizaron las reacciones de PCR en multiplex como se describió anteriormente y fueron resueltos haciendo uso del secuenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer.

Los electroferogramas resultantes fueron analizados usando el software GeneMapper V3.7 Applied Biosystems (Foster City, CA) para realizar la asignación de alelos y formar una base de datos conteniendo los genotipos de cada una de las muestras.

Cuatro loci fueron eliminados del estudio debido a que en más del 10% de las muestras no fueron amplificadas, lo que se atribuyó a un problema en la técnica de PCR.

Cuadro 2. Microsatélites usados en el estudio de acuerdo al grupo de multiplex correspondiente.

Grupo	Loci
LvMG1	CNM-MG-339 CNM-MG-356 CNM-MG-367 CNM-MG-387 CNM-MG 412 CNM-MG-421 CNM-MG-479 Lvan10
LvMG2	Pvan0040 CNM-MG-351 CNM-MG-390 CNM-MG-364 CNM-MG-384 CNM-MG-386 CNM-MG-357
LvMG3-1	CNM-MG-430 Lvan07 CNM-MG-369 CNM-MG-383
LvMG3-2	CNM-MG-507 HLJN-030 CNM-MG-487 CNM-MG-496
LvMG4-1	CNM-MG-371 CNM-MG-380 CNM-MG-354 CNM-MG-362
LvMG4-2	CNM-MG-416 HLJN-004 Lvan01 Pvan1758

5.3 Índices y métodos para la evaluación de la variabilidad genética poblacional y diferenciación poblacionales.

Para el cálculo de la heterocigosidad esperada para todos los loci y poblaciones se usó el método de Nei (1987) usando el programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Se calcularon las desviaciones en el equilibrio de H-W y diferenciación poblacional mediante el uso del programa GENEPOP versión 3.1 (Raymond y Rousset, 1995).

Se obtuvo el número de alelos por loci (A_c) y el número de loci únicos (A_u) por población y por loci mediante el método de rarefacción, este método permite obtener valores suponiendo tamaños de muestra iguales; para este cálculo se usó el software HP-RARE 1.1 (Kalinowski, 2005b). Además se obtuvieron los valores de número de alelos observados (A_n) y alelos efectivos (A_e) (Hartl, 1987; Gillespie, 2004).

Se usó el programa Fstat (Goudet, 1995) para el cálculo de los valores de F_{st} para todas las poblaciones (Weir y Cockerham, 1984) y entre pares de poblaciones (Slatkin, 1995). Los valores de R_{st} (Slatkin, 1995) fueron calculados usando el programa RstCalc (Goodman, 1997).

También se comprobó la probabilidad de eventos de cuellos de botella en las poblaciones bajo los supuestos de tres diferentes tipos de modelos de mutación, el Modelo de Alelos Infinitos (IAM por sus siglas en inglés), el Modelo de Mutación a Manera de Pasos (SMM por sus siglas en inglés) y el Modelo de Dos Pasos (TPM por sus siglas en inglés) usando el programa Bottleneck (Cornuet y Luikart, 1996) el cual realiza una prueba de significancia comparando la heterocigosidad

observada con respecto de la heterocigosidad esperada en equilibrio de deriva génica y mutación (Heq) ambos calculados a partir del número de alelos observados; para el caso del modelo TPM se supuso un 90% de los loci bajo un modelo de SMM. Se estimaron además los tamaños efectivos de población para las poblaciones mediante el análisis propuesto por Hill (1981) haciendo uso del software NeEstimator V1.3 (Peel *et al.*, 2004).

Para la construcción de los dendrogramas se usó el software Populations; primeramente se construyó un árbol filogenético para las poblaciones el cual se realizó mediante el método de *neighbor joining* (NJ) a partir de matrices de las distancias D_A entre las poblaciones bajo estudio de acuerdo al método de Nei (1987); separadamente se realizó un dendrograma por individuos mediante el método NJ de alelos compartidos usando el método de D_s descrito por Jin y Chakraborty (1994).

6. Resultados

6.1 Niveles de Polimorfismo

Todos los loci analizados en el estudio fueron polimórficos, es decir, se observaron más de dos alelos en cada una de las poblaciones analizadas.

En el cuadro 3 se muestra el resultado de los análisis de equilibrio Hardy-Weinbergh (H-W) a través de todas las poblaciones. De los 26 loci usados en el estudio 23 presentaron un desequilibrio H-W ($P < 0.05$), y solo los loci CNM-MG 364, CNM-MG 386 y Lvan 07 se encontraban en equilibrio H-W. El mismo análisis para cada población mostró que para la generación 2005 los loci CNM-MG 412, CNM-MG 479, CNM-MG 364, CNM-MG 384, CNM-MG 386, CNM-MG 390, Lvan 07, CNM-MG 496, Lvan 01 y Pvan 1758 no mostraron desviaciones del equilibrio H-W. Para la generación 2007 los loci CNM-MG 364, CNM-MG 390, Lvan 07 y Lvan 01 mostraron desviaciones del equilibrio H-W. Finalmente para los organismos silvestres los loci CNM-MG 412, CNM-MG 364, CNM-MG 384, CNM-MG 390, CNM-MG 496 y Lvan 01 no presentaron desviación en el equilibrio H-W.

Cuadro 3. Resultado de la prueba para comprobar equilibrio H-W por cada población.

LOCUS	Generación 2005		Generación 2007		Silvestres	
	Equilibrio H-W P(ds)	F_{is}	Equilibrio H-W P(ds)	F_{is}	Equilibrio H-W P(ds)	F_{is}
CNMMG339	0.0128(0.0008)	0.0690	0.0002(0.0001)	0.1810	0.0002(0.0002)	0.2660
CNMMG356	0.0239(0.0007)	0.3170	0.0000(0.0000)	0.4350	0.0000(0.0000)	0.0030
CNMMG387	0.0000(0.0000)	0.3640	0.0000(0.0000)	0.4180	0.0000(0.0000)	0.7280
CNMMG412	0.8806(0.0007)	-0.0870	0.0061(0.0005)	0.1180	0.0001(0.0001)	0.2110
CNMMG421	0.0065(0.0001)	0.2650	0.0000(0.0000)	0.6990	0.0001(0.0000)	0.5150
CNMMG479	0.3622(0.0048)	0.0650	0.0017(0.0004)	-0.0160	0.0097(0.0011)	0.1190
CNMMG351	0.0000(0.0000)	0.3720	0.0000(0.0000)	0.5930	0.0004(0.0002)	0.3450
CNMMG364	0.1134(0.0017)	0.1000	0.4487(0.0028)	0.0180	0.1249(0.0028)	0.0330
CNMMG384	1.0000(0.0000)	-0.3000	0.9829(0.0013)	-0.1930	0.9292(0.0070)	-0.0650
CNMMG386	0.7586(0.0004)	-0.0280	0.0210(0.0002)	0.3370	0.3860(0.0030)	0.0840
CNMMG390	0.2615(0.0005)	0.1260	0.9170(0.0003)	-0.1030	0.0000(0.0000)	0.5170
CNMMG369	0.0000(0.0000)	0.3680	0.0003(0.0001)	0.2560	0.0000(0.0000)	0.5650
CNMMG430	0.0339(0.0021)	0.0950	0.0034(0.0004)	0.1480	0.0458(0.0046)	0.1350
Lvan07	0.4361(0.0037)	-0.0180	0.0003(0.0001)	0.0960	0.0002(0.0001)	0.1060
CNMMG487	0.0429(0.0009)	0.1300	0.0007(0.0000)	0.1670	0.0000(0.0000)	0.3520
CNMMG496	1.0000(0.0000)	-0.7430	1.0000(0.0000)	-0.7510	0.6973(0.0027)	-0.1340
CNMMG507	0.0000(0.0000)	1.0000	0.0000(0.0000)	0.9720	0.0000(0.0000)	0.7960
HLJN030	0.0145(0.0007)	0.1530	0.0000(0.0000)	0.7300	0.0000(0.0000)	0.6130
CNMMG354	0.0000(0.0000)	0.6840	0.0000(0.0000)	0.8760	0.0000(0.0000)	0.5840

CNMMG362	0.0000(0.0000)	-0.0140	0.0000(0.0000)	-0.0740	0.0000(0.0000)	0.3480
CNMMG371	0.0000(0.0000)	0.5750	0.0000(0.0000)	0.6480	0.0000(0.0000)	0.8490
CNMMG380	0.0000(0.0000)	0.6440	0.0000(0.0000)	0.4830	0.0000(0.0000)	0.4110
CNMMG416	0.0000(0.0000)	0.0330	0.0000(0.0000)	0.1230	0.0000(0.0000)	0.4900
HLJN004	0.0000(0.0000)	0.9580	0.0000(0.0000)	0.9180	0.0000(0.0000)	0.8980
Lvan01	0.9708(0.0006)	-0.1270	0.1713(0.0009)	0.1040	0.0003(0.0001)	0.3420
Pvan1758	0.0708(0.0017)	0.0760	0.0037(0.0003)	-0.0320	0.0146(0.0018)	0.1480

6.2 Variabilidad Genética de las Poblaciones.

La H_e promedio para todas las poblaciones y todos los loci fue de 0.6212 (Cuadro 5), y el número de alelos efectivos (A_e) por loci para todas las poblaciones fue de 8.49.

Los valores de H_e promedio por población fueron de 0.5658, 0.5778 y 0.7198 para las poblaciones G05, G07 y Silv respectivamente (Cuadro 4). El A_e promedio para las mismas poblaciones fue de 6.35, 7.15 y 11.97 respectivamente. El número de A_c promedio por población fue de 5.18 para la población G05, 5.48 para la G07 y 9.77 para la población Silv. El número de alelos únicos promedio por población fue de 0.43, 0.51 y 4.65 alelos para las poblaciones G05, G07 y Silv respectivamente (Cuadro 6).

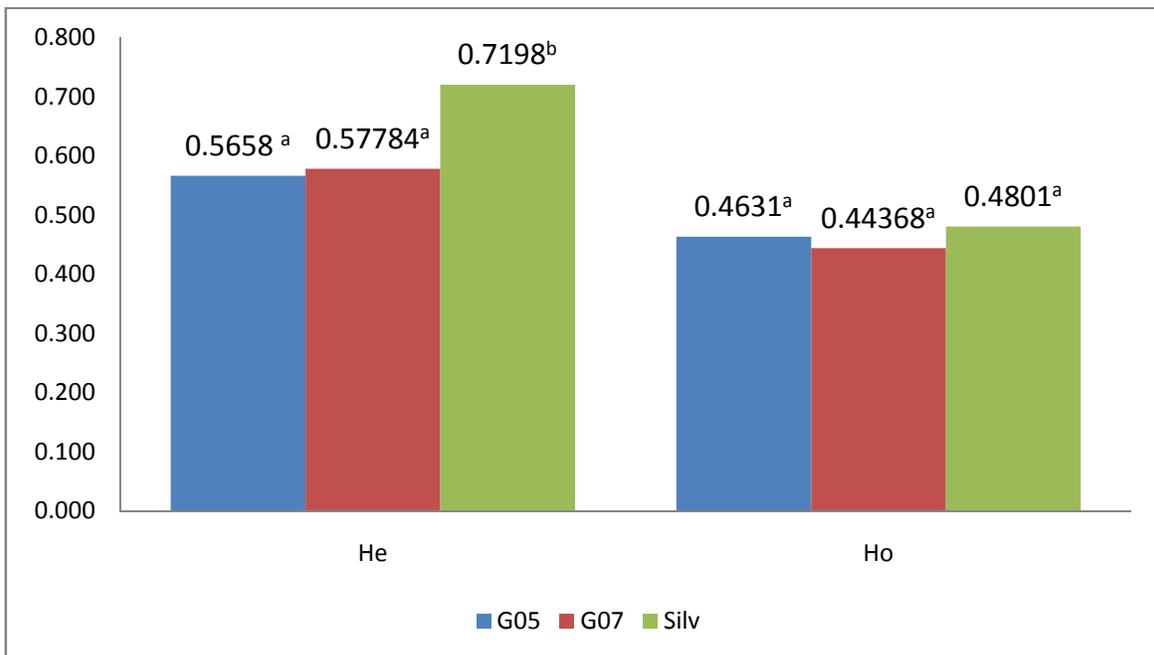


Figura 2. Valores de H_e y H_o por población. Literales diferentes denotan diferencias significativas $P < 0.05$.

Cuadro 4. Resultados de H_e y H_o por población por locus y promedio.

	Generación 2005		Generación 2007		Silvestres	
	H_e	H_o	H_e	H_o	H_e	H_o
CNM-MG 339	0.8088	0.7532	0.7451	0.6111	0.9233	0.6792
CNM-MG 356	0.4747	0.3247	0.5558	0.3151	0.6128	0.6111
CNM-MG 387	0.6404	0.4085	0.7265	0.4242	0.8349	0.2292
CNM-MG 412	0.2749	0.2987	0.3776	0.3333	0.7085	0.5600
CNM-MG 421	0.0882	0.0649	0.2263	0.0685	0.3416	0.1667
CNM-MG 479	0.6940	0.6494	0.7686	0.7808	0.9024	0.7963
CNM-MG 351	0.7016	0.4416	0.6027	0.2466	0.8733	0.5741
CNM-MG 364	0.6781	0.6104	0.6648	0.6528	0.7466	0.7222
CNM-MG 384	0.7508	0.9740	0.7931	0.9452	0.8699	0.9259
CNM-MG 386	0.2275	0.2338	0.1856	0.1233	0.4848	0.4444
CNM-MG 390	0.2078	0.1818	0.2858	0.3151	0.1909	0.0926
CNM-MG 369	0.7587	0.4805	0.6251	0.4658	0.8468	0.3704
CNM-MG 430	0.8463	0.7662	0.8195	0.6986	0.8984	0.7778
Lvan 07	0.6887	0.7013	0.7416	0.6712	0.8899	0.7963
CNM-MG 487	0.5073	0.4416	0.5257	0.4384	0.8539	0.5556
CNM-MG 496	0.5466	0.9481	0.5661	0.9863	0.5559	0.6296
CNM-MG 507	0.5290	0.0000	0.4861	0.0137	0.3598	0.0741
HLJN 030	0.5897	0.5000	0.3246	0.0882	0.5131	0.2000
CNM-MG 354	0.5325	0.1688	0.4396	0.0548	0.7529	0.3148
CNM-MG 362	0.7685	0.7792	0.7248	0.7778	0.8936	0.5849
CNM-MG 371	0.5862	0.2500	0.6337	0.2239	0.8001	0.1220
CNM-MG 380	0.6616	0.2368	0.6605	0.3425	0.8143	0.4815
CNM-MG 416	0.6801	0.6579	0.7478	0.6567	0.8945	0.4595
HLJN 004	0.3077	0.0130	0.5075	0.0417	0.5102	0.0526
Lvan 01	0.4038	0.4545	0.5196	0.4658	0.7165	0.4737
Pvan 1758	0.7583	0.7013	0.7700	0.7945	0.9253	0.7895
Media	0.5658	0.4631	0.5778	0.4437	0.7198	0.4801
ds	(0.2041)	(0.2773)	(0.1824)	(0.2926)	(0.2080)	(0.2576)

*ds: desviación estándar

Cuadro 5. Resultados de H_e y H_o por locus y promedio en todas las poblaciones.

	H_e		H_o	
	Media(ds)	Het. Tot	Media (ds)	Het Tot
CNM-MG 339	0.8257(0.0737)	0.8422	0.6812(0.0711)	0.6832
CNM-MG 356	0.5478(0.0567)	0.5972	0.4170(0.1682)	0.3971
CNM-MG 387	0.7339(0.0796)	0.7302	0.3540(0.1084)	0.3676
CNM-MG 412	0.4537(0.1850)	0.4475	0.3973(0.1419)	0.3769
CNM-MG 421	0.2187(0.1036)	0.2092	0.1000(0.0577)	0.0931
CNM-MG 479	0.7883(0.0862)	0.7942	0.7422(0.0807)	0.7353
CNM-MG 351	0.7258(0.1118)	0.7637	0.4207(0.1647)	0.4069
CNM-MG 364	0.6965(0.0358)	0.7027	0.6618(0.0565)	0.6552
CNM-MG 384	0.8046(0.0493)	0.8283	0.9484(0.0242)	0.9510
CNM-MG 386	0.2993(0.1323)	0.2902	0.2672(0.1632)	0.2500
CNM-MG 390	0.2282(0.0413)	0.2333	0.1965(0.1120)	0.2059
CNM-MG 369	0.7435(0.0911)	0.7800	0.4389(0.0598)	0.4461
CNM-MG 430	0.8547(0.0328)	0.8713	0.7475(0.0428)	0.7451
Lvan 07	0.7734(0.0852)	0.7874	0.7229(0.0653)	0.7157
CNM-MG 487	0.6289(0.1593)	0.6659	0.4785(0.0668)	0.4706
CNM-MG 496	0.5562(0.0079)	0.5744	0.8547(0.1958)	0.8775
CNM-MG 507	0.4583(0.0718)	0.4774	0.0293(0.0394)	0.0248
HLJN 030	0.4758(0.1114)	0.4824	0.2627(0.2129)	0.2707
CNM-MG 354	0.5750(0.1314)	0.5908	0.1795(0.1303)	0.1667
CNM-MG 362	0.7956(0.0716)	0.8022	0.7140(0.1118)	0.7277
CNM-MG 371	0.6733(0.0917)	0.6858	0.1986(0.0677)	0.2111
CNM-MG 380	0.7121(0.0723)	0.7211	0.3536(0.1227)	0.3399
CNM-MG 416	0.7741(0.0895)	0.8007	0.5914(0.1142)	0.6167
HLJN 004	0.4418(0.0948)	0.4551	0.0358(0.0205)	0.0321
Lvan 01	0.5466(0.1291)	0.5276	0.4647(0.0096)	0.4628
Pvan 1758	0.8179(0.0761)	0.8202	0.7618(0.0524)	0.7553
Media	0.6211(0.0699)	0.6339	0.4623(0.0182)	0.4609
Ds	(0.1870)	(0.1894)	(0.2613)	(0.2642)

*ds: desviación estándar

Los resultados del Análisis de Varianza (ANDEVA) para comprobar diferencias en las medias de la H_e fue significativo ($P=0.0106$). El valor de H_e de la población silvestre fue más alto con respecto a los valores observados en las poblaciones bajo selección ($P<0.05$). Entre las poblaciones de las generaciones 2005 y 2007 no se observaron diferencias significativas en los valores de H_e promedio ($P>0.05$). Al aplicar la prueba no paramétrica de Krustal-Wallis, se obtuvieron resultados similares a los del ANDEVA para diferencias entre las medianas de H_e ($P<0.0001$) (Figura 2).

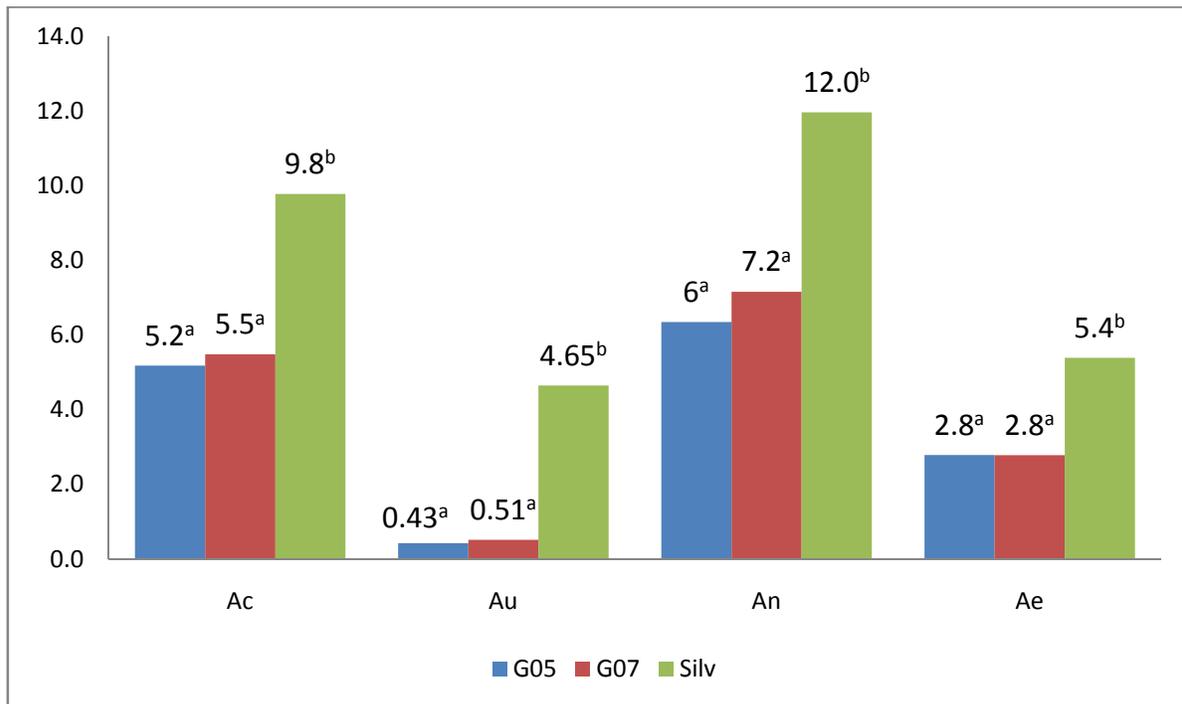


Figura 3. Resultados de diversidad alélica por población. Literales diferentes denotan diferencias significativas $P<0.05$. Ac: Alelos totales corregidos por el método de rarefacción. Au: Alelos únicos corregidos por el método de rarefacción. An: Alelos totales observados. Ae: Alelos efectivos.

Cuadro 6. Resultados de Diversidad Alélica por población, por loci y media a través de todos los loci.

	Generación 2005				Generación 2007				Silvestres			
	Rarefacción		A_n	A_e	Rarefacción		A_n	A_e	Rarefacción		A_n	A_e
	A_c	A_u			A_c	A_u			A_c	A_u		
CNM-MG 339	8.0	0.7	10	5.1	10.5	1.9	18	3.8	19.2	10.1	26	11.7
CNM-MG 356	5.1	0.9	6	1.9	5.6	1.1	9	2.2	6.0	2.0	7	2.5
CNM-MG 387	4.0	0.0	4	2.7	6.4	1.1	8	3.6	11.4	6.1	14	5.8
CNM-MG 412	2.9	0.0	3	1.4	4.4	0.7	7	1.6	9.8	5.6	13	3.3
CNM-MG 421	2.4	0.0	3	1.1	3.7	0.3	5	1.3	4.4	0.5	5	1.5
CNM-MG 479	7.8	0.0	9	3.2	9.2	0.7	13	4.2	13.5	3.9	15	9.4
CNM-MG 351	6.0	0.1	8	3.3	5.8	0.6	7	2.5	12.3	6.2	14	7.4
CNM-MG 364	3.5	0.0	4	3.1	3.3	0.0	4	2.9	7.7	4.1	9	3.8
CNM-MG 384	7.7	0.1	11	3.9	9.4	0.3	11	4.7	16.1	7.0	22	7.2
CNM-MG 386	2.0	0.0	2	1.3	2.0	0.0	2	1.2	3.9	1.9	5	1.9
CNM-MG 390	2.0	0.0	2	1.3	2.0	0.0	2	1.4	3.5	1.6	4	1.2
CNM-MG 369	7.2	0.5	9	4.1	7.4	1.3	10	2.6	9.5	3.9	12	6.2
CNM-MG 430	9.8	1.6	13	6.3	8.5	0.4	11	5.4	16.3	8.2	21	9.1
Lvan 07	6.2	0.2	7	3.2	7.2	1.0	8	3.8	13.8	7.6	18	8.5
CNM-MG 487	4.0	0.0	5	2.0	3.6	0.0	4	2.1	10.8	6.3	14	6.5
CNM-MG 496	3.3	0.1	4	2.2	4.3	0.7	6	2.3	5.2	1.1	6	2.2
CNM-MG 507	3.0	0.0	3	2.1	3.3	0.3	4	1.9	5.5	2.8	6	1.6
HLJN 030	5.6	1.7	7	2.4	4.9	0.5	7	1.5	7.7	3.9	9	2.0

CNM-MG 354	5.2	0.7	8	2.1	3.9	0.1	5	1.8	8.2	3.6	11	3.9
CNM-MG 362	8.2	1.7	11	4.2	7.5	0.9	11	3.6	13.3	6.3	17	8.7
CNM-MG 371	6.6	1.4	8	2.4	5.4	0.0	6	2.7	9.1	3.5	10	4.8
CNM-MG 380	5.9	1.2	7	2.9	5.1	0.3	6	2.9	8.3	4.3	10	5.2
CNM-MG 416	6.1	0.0	7	3.1	6.1	0.1	7	3.9	12.5	6.1	14	8.5
HLJN 004	2.0	0.0	2	1.4	2.3	0.3	3	2.0	3.3	1.3	4	2.0
Lvan 01	3.3	0.0	4	1.7	3.0	0.0	3	2.1	7.2	3.9	8	3.4
Pvan 1758	6.8	0.1	8	4.1	7.7	0.7	9	4.2	15.4	9.1	17	11.5
Media	5.2	0.4	6.3	2.8	5.5	0.5	7.2	2.8	9.8	4.6	12.0	5.4
d.s.	2.2	0.6	3.1	1.3	2.4	0.5	3.7	1.1	4.4	2.6	5.8	3.2

*ds: desviación estándar

Las comparaciones para A_c , fueron estadísticamente significativas ($P < 0.0001$). Los resultados para este índice fueron similares a los de H_e , la población Silv tuvo el mayor valor ($P < 0.05$) y no se observaron diferencias entre las poblaciones G05 y G07 ($P > 0.05$). La prueba de Kruskal-Wallis fue consistente con esos hallazgos mostrando diferencias entre las medianas de A_c entre las poblaciones silvestres y las de cultivo ($P < 0.05$), pero no entre las poblaciones G05 y G07 ($P > 0.05$).

Para el caso de A_n se observaron diferencias entre las medias de las poblaciones ($p < 0.0001$) a partir del ANDEVA. El valor de A_e de la población Silv fue superior a los de las poblaciones bajo selección ($p < 0.05$). No se observaron diferencias entre las poblaciones seleccionadas ($p > 0.05$). Nuevamente se aplicó el estadístico Kruskal-Wallis obteniendo valores que corroboraban las diferencias entre las medianas de las poblaciones ($P < 0.05$) (Figura 3).

Cuadro 7. Resultados de la prueba de cuello de botella de acuerdo a los diferentes modelos de mutación: IAM (Modelo de alelos infinitos), TPM (Modelo de dos pasos) y SMM (Modelo de mutación por pasos).

	Generación 2005	Generación 2007	Silvestres
IAM			
Número de loci esperados con exceso de Heterocigosis	14.38	14.66	15.52
Hd:He	6:20	9:17	9:17
P	0.01852	0.23396	0.35254
TPM			
Número de loci esperados con exceso de Heterocigosis	14.97	15.05	15.41
Hd:He	18:8	21:5	23:3
P	0.00510	0.00006	0.00000
SMM			
Número de loci esperados con exceso de Heterocigosis	14.98	14.99	15.31
Hd:He	21:5	22:4	24:2
P	0.00007	0.00001	0.00000

*He: Número de loci en equilibrio de heterocigosis. Hd: Número de loci en desequilibrio de heterocigosis. P: valor de probabilidad

Los análisis para comprobar la existencia de cuellos de botella bajo el supuesto de el modelo IAM la población G05 mostró evidencia de compatibilidad con un evento parecido ($P=0.019$), mientras que en las poblaciones G07 y Silv no fue así. Sin embargo, bajo los supuestos de los modelos tipo TPM y SMM todas las poblaciones presentaban evidencia de compatibilidad con un evento de cuello de botella ($P<0.01$) (Cuadro 7).

En el cuadro 8 se observan los resultados de estimación de los tamaños efectivos de población (N_e), los cuales fueron de 141.6 para la población G05 y 271.9 para la población silvestre. Para la población G07 no fue posible estimar de forma directa el N_e por lo cual se estimó una aproximación usando los datos de la población G05 y G07 dando un resultado de 128.1 para estas poblaciones en conjunto. El valor de asociación (R) producto del mismo análisis de N_e es un indicativo del número de familias usadas para formar cada una de las poblaciones, por lo que se observa que en la población Silv están presentes un número mayor de familias que en la población G05, la cual a su vez observó un número mayor de familias presentes que en la ponderación para la población G05 con la población G07.

Cuadro 8. Resultados de tamaño efectivo de población (N_e) por población.

Población	R*	Ne	Intervalo de Confianza	
			Límite inferior	Límite superior
Generación 2005	0.016	141.6	121.5	168.4
Generación 2005 y 2007	0.009	128.1	119.9	137.2
Silvestre	0.023	271.9	218.5	357.7

*R: Asociación

6.3 Distancias Genéticas

Se obtuvieron los resultados de F_{st} (Weir y Cockerham, 1984) y los resultados de R_{st} (Slatkin, 1995) (Cuadro 9). Los resultados de F_{st} mostraron que los organismos de las poblaciones G05 y G07 presentaban distancias menores entre ellas que cuando se comparaban contra la población Silv. Estos resultados fueron consistentes cuando se aplicó el estadístico R_{st} mostrando la misma tendencia ($P < 0.05$).

Cuadro 9. Resultados de distancias pareadas entre poblaciones (F_{st} bajo la diagonal y R_{st} sobre la diagonal).

	Generación 2005	Generación 2007	Silvestres
Generación 2005		0.01094*	0.0436*
Generación 2007	0.0182*		0.0298*
Silvestres	0.0857*	0.0800*	

* $P < 0.05$

6.4 Diferenciación Génica

Los resultados de diferenciación génica para todos los loci (Cuadro 10), mostraron que había una diferenciación génica estadísticamente significativa entre todos los pares de poblaciones ($p < 0.0001$).

Cuadro 10. Diferenciación Génica. Resultados de la prueba de Ji cuadrada para todos los loci.

	G05 vs G07	G05 vs Silv	G07 vs Silv
Valor de Ji cuadrada	Infinito	Infinito	Infinito
Grados de libertad	52	52	52
Valor de P	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$

*G05: Generación 2005; G07 Generación 2007; Silv: Silvestres.

Cuadro 11. Valores de probabilidad de diferenciación génica pareadas por locus.

Locus	G05 vs G07 Valor de P (ds)	G05 vs Silv Valor de P (ds)	G07 vs Silv Valor de P (ds)
CNM-MG 339	0.00087 (0.00021)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 356	0.00003 (0.00002)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 387	0.08222 (0.00206)	0.00000 (0.00000)	0.00001 (0.00001)
CNM-MG 412	0.03866 (0.00125)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 421	0.00066 (0.00007)	0.00003 (0.00001)	0.10877 (0.00126)
CNM-MG 479	0.01969 (0.00085)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 351	0.06696 (0.00172)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 364	0.70724 (0.00206)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 384	0.17488 (0.00313)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 386	0.47967 (0.00130)	0.00004 (0.00003)	0.00001 (0.00001)
CNM-MG 390	0.19107 (0.00129)	0.01035 (0.00036)	0.00084 (0.00010)
CNM-MG 369	0.00412 (0.00036)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 430	0.20028 (0.00370)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
Lvan 07	0.15953 (0.00277)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 487	0.02170 (0.00100)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 496	0.18848 (0.00297)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 507	0.60148 (0.00269)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
HLJN 030	0.00001 (0.00001)	0.00004 (0.00002)	0.00116 (0.00021)
CNM-MG 354	0.01709 (0.00096)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 362	0.10510 (0.00256)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 371	0.00006 (0.00002)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 380	0.04139 (0.00123)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNM-MG 416	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
HLJN 004	0.00000 (0.00000)	0.00065 (0.00011)	0.20169 (0.00262)
Lvan 01	0.00219 (0.00020)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
Pvan 1758	0.15336 (0.00269)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)

*G05: Generación 2005; G07 Generación 2007; Silv: Silvestres. ds: Desviación Estándar.

Al realizar el análisis por locus (Cuadro 11), se puede observar que no en todos los loci existe diferenciación entre las poblaciones. Así los loci CNM-MG 387, CNM-MG 351, CNM-MG 364, CNM-MG 384, CNM-MG 386, CNM-MG 390, CNM-MG 430, Lvan 07, CNM-MG 496, CNM-MG 507, CNM-MG 362 y Pvan 1758 no mostraron evidencias de diferenciación entre las poblaciones G05 y G07 ($p > 0.05$). Este mismo análisis comparando entre las poblaciones G07 y Silv mostró que los loci CNM-MG 421 y HLJN-004 no evidenciaron diferenciación entre la población

G07 y la población Silv; mientras que la comparación entre las poblaciones G07 y Silv mostró que todos los loci observaban diferenciación génica entre las poblaciones.

6.5 Diferenciación Genotípica

Los resultados de diferenciación genotípica para todos los loci (Cuadro 12), mostraron que había una diferencia estadísticamente significativa entre las poblaciones ($P < 0.0001$).

Cuadro 12. Diferenciación genotípica, resultados de la prueba de Ji cuadrada para todos los loci.

	G05 vs G07	G05 vs Silv	G07 vs Silv
Valor calculado de Ji cuadrada	163.69	Infinito	Infinito
Grados de libertad	52	52	52
Valor de P	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$

*G05: Generación 2005; G07 Generación 2007; Silv: Silvestres.

En los análisis por locus (Cuadro 13), se puede observar que en algunos casos no existe diferenciación entre las poblaciones. Entre las poblaciones bajo selección de las generaciones 2005 y 2007 no se observa diferenciación genotípica ($p > 0.05$) en los loci CNM-MG 387, CNM-MG 351, CNM-MG 364, CNM-MG 384, CNM-MG 386, CNM-MG 390, CNM-MG 430, Lvan 07, CNM-MG 496, CNM-MG 507, CNM-MG 354, CNM-MG 362, CNM-MG 380 y Pvan 1758. Mientras que en los loci CNM-MG 421 y HLJN-004 no se observó diferenciación genotípica entre la población G07 y la población Silv. Además entre la población G05 y la población Silv no existe ausencia de diferenciación en ninguno de los loci.

Cuadro 13. Valores de probabilidad de diferenciación genotípica pareadas por locus.

	G05vsG07 Valor de P (ds)	G05vsSilv Valor de P (ds)	G07vsSilv Valor de P (ds)
CNMMG339	0.00304 (0.00026)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNMMG356	0.00047 (0.00010)	0.00000 (0.00000)	0.00005 (0.00002)
CNMMG387	0.27428 (0.00274)	0.00011 (0.00004)	0.01509 (0.00057)
CNMMG412	0.04310 (0.00097)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNMMG421	0.01445 (0.00042)	0.00139 (0.0001)	0.38054 (0.00203)
CNMMG479	0.02824 (0.00092)	0.00000 (0.00000)	0.00001 (0.00001)
CNMMG351	0.44801 (0.00280)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNMMG364	0.72029 (0.00171)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNMMG384	0.15960 (0.00205)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNMMG386	0.50540 (0.00133)	0.00000 (0.00000)	0.00001 (0.00000)
CNMMG390	0.19179 (0.00145)	0.03428 (0.00070)	0.00178 (0.00014)
CNMMG369	0.03869 (0.00124)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNMMG430	0.22815 (0.00279)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
Lvan07	0.18589 (0.00219)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNMMG487	0.03427 (0.00083)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNMMG496	0.05462 (0.00079)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNMMG507	0.78971 (0.00130)	0.00010 (0.00003)	0.00048 (0.00008)
HLJN030	0.00013 (0.00003)	0.00016 (0.00004)	0.03881 (0.00089)
CNMMG354	0.12495 (0.00206)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNMMG362	0.37294 (0.00268)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNMMG371	0.04251 (0.00080)	0.00150 (0.00015)	0.00062 (0.0001)
CNMMG380	0.24282 (0.00235)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
CNMMG416	0.00293 (0.00018)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
HLJN004	0.00040 (0.00009)	0.01412 (0.00066)	0.33449 (0.00300)
Lvan01	0.00224 (0.00021)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)
Pvan1758	0.20821 (0.00239)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)

*G05: Generación 2005; G07 Generación 2007; Silv: Silvestres. ds: Desviación Estándar

6.6 Dendrogramas

Una vez elaborados los dendrogramas (Figuras 4 y 5) se observó que las poblaciones bajo un esquema de selección se agrupaban y se separaban de las poblaciones silvestres, denotando, al igual que en los análisis anteriores, diferenciación entre las poblaciones bajo selección y las silvestres. Además en la Figura 6 podemos observar que las poblaciones bajo cultivo de la generación 2005

y 2007 presentan una tendencia a agruparse separadas una de la otra, aunque esta agrupación no es completa y se intercalan conglomerados de una población con la otra.

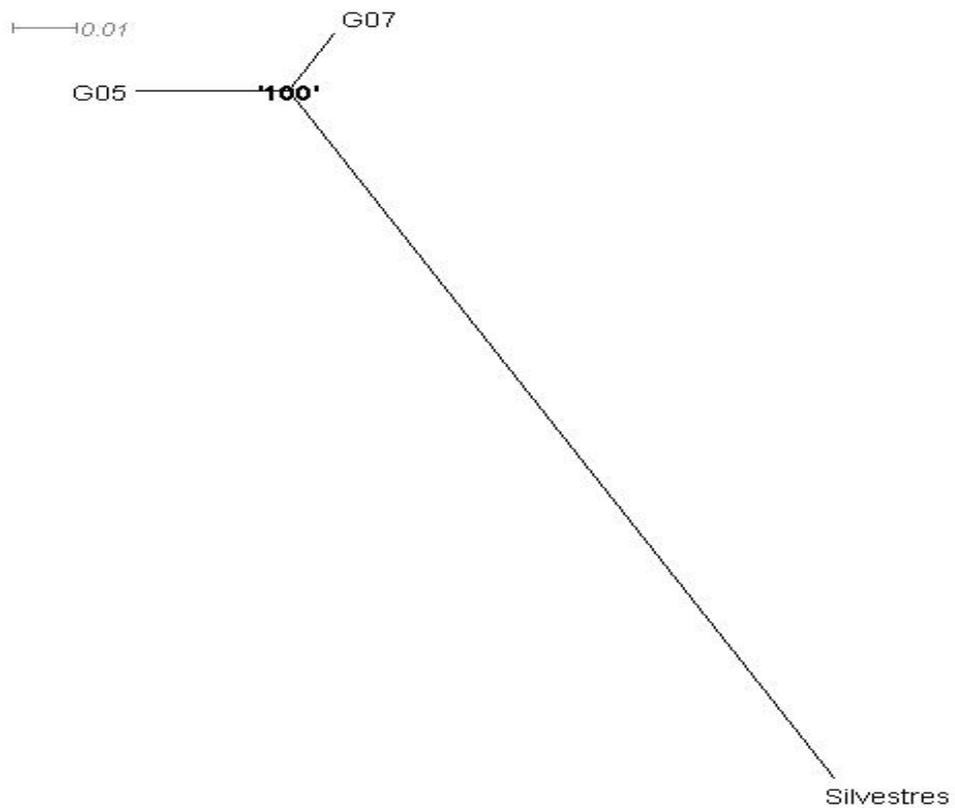


Figura 4. Dendrograma mostrando la distancia existente entre las poblaciones. G05: Generación 2005; G07 Generación 2007; Silv: Silvestres.

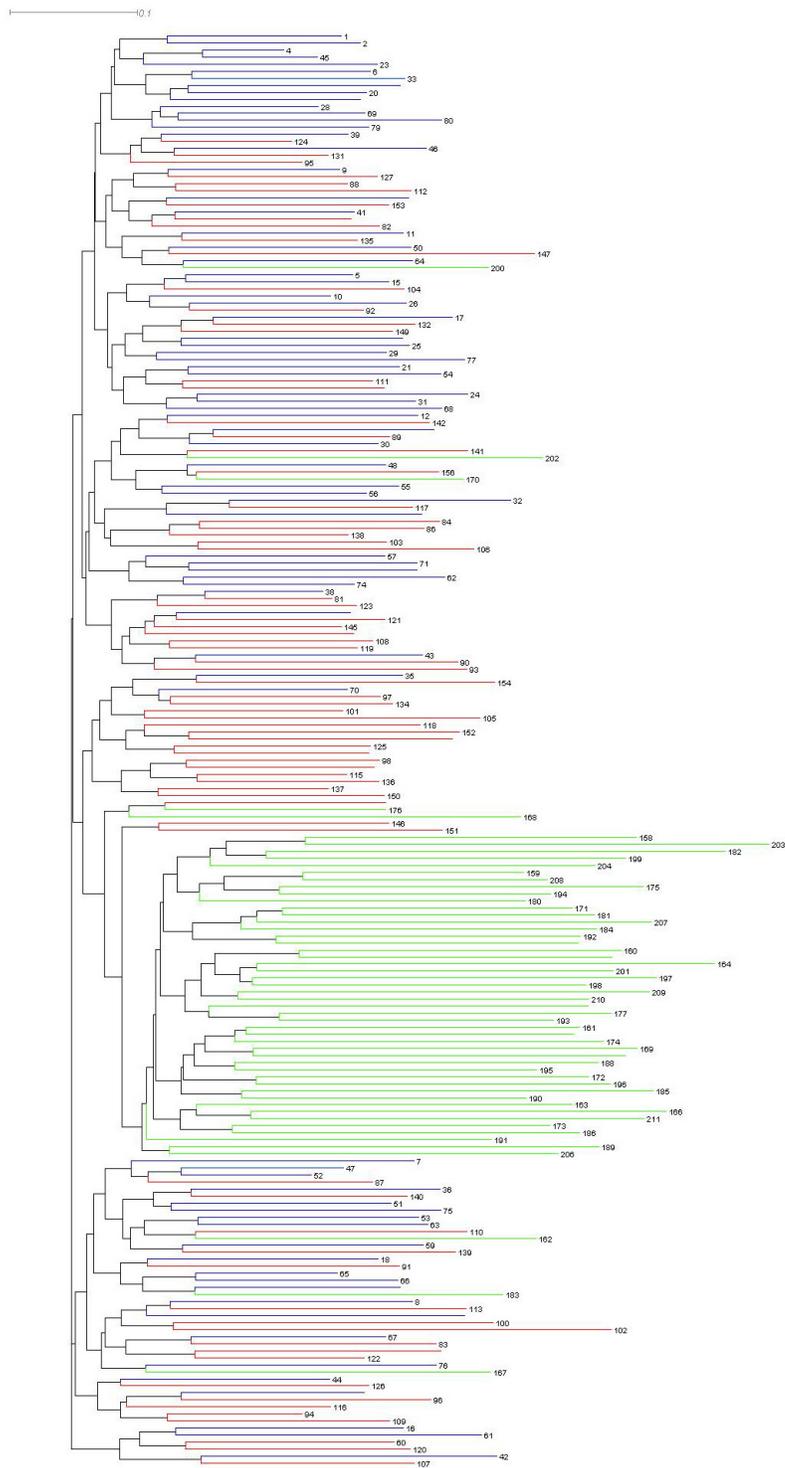


Figura 5. Dendrograma mostrando los individuos de acuerdo al resultado de los análisis de alelos compartidos. En rojo organismos de la generación 2005, en azul: generación 2007 y en verde Silvestre

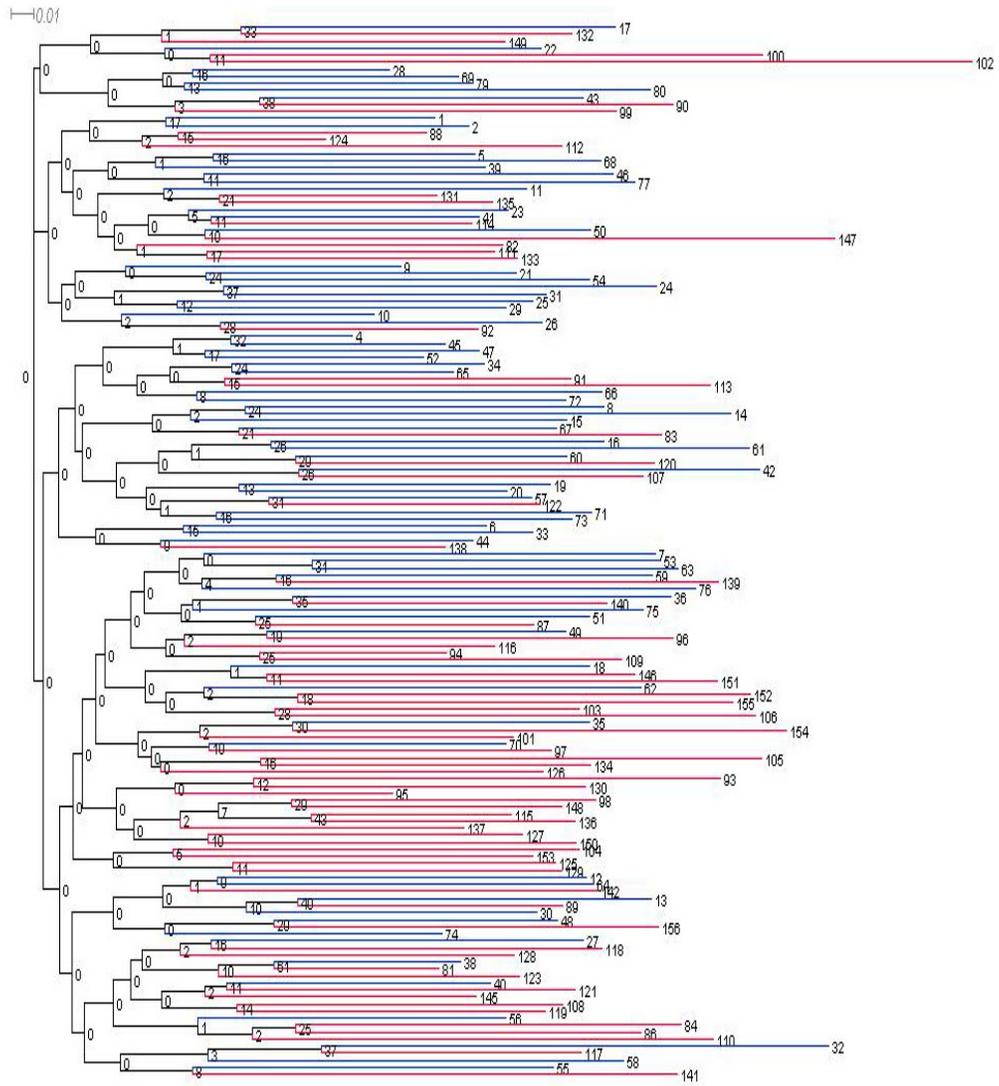


Figura 6. Dendrograma mostrando los individuos de las poblaciones de cultivo por el método de alelos compartidos. En rojo organismos de la generación 2005, en azul: generación 2007

7. Discusión

Algunos autores han observado usando microsatélites que la diversidad alélica en camarones cultivados es menor que en poblaciones silvestres (Bierne *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2004; Luan *et al.*, 2006; Dixon *et al.*, 2008), sin embargo, empleando isoenzimas se han encontrado diferencias tanto a nivel de H_e como de diversidad alélica (Arena *et al.*, 2003).

En este trabajo, los resultados tanto a nivel de H_e como de diversidad alélica no mostraron diferencias entre las poblaciones G05 y G07 coincidiendo con los resultados obtenidos por Luvesuto *et al.* (2007), y Souza de Lima *et al.* (2008) los cuales usando 4 y 3 loci respectivamente y al comparar en un rango generacional similar al estudiado en nuestro trabajo, no encontraron diferencias en la H_e y diversidad alélica de estas poblaciones. De igual manera Norris *et al.* (1999) en su estudio en salmón del Atlántico no pudieron encontrar diferencias entre los valores de H_e y diversidad alélica observada entre poblaciones de cultivo de esta especie usando microsatélites como marcadores genéticos.

Al contrario que en nuestro estudio, Luan *et al.* (2006) usando microsatélites para comparar la variabilidad genética de poblaciones cultivadas y silvestres de camarón Kuruma (*Marsopeneus japonicus*) no observaron diferencias entre los valores de H_e y diversidad alélica; de igual forma, en el trabajo de Norris *et al.* (1999) en salmón del Atlántico y los trabajos de Xu *et al.* (2001) y de Dixon *et al.* (2008) ambos en camarón Tigre (*Peneaus monodon*) no se encontraron diferencias en los valores de H_e entre las poblaciones cultivadas y silvestres, sin

embargo, usando medidas de A_e y A_n pudieron establecer diferencias entre poblaciones cultivadas y silvestres.

El hecho de que en nuestro estudio pudiéramos observar diferencias de H_e entre las poblaciones de cultivo y las silvestres a diferencia de Luan *et al.* (2006) en *M. japonicus*), Norris *et al.* (1999) en *S. salar* y Dixon *et al.* (2008) en *P. monodon* pueden deberse a que en dichos estudios se utilizaron 6, 15 y 12 microsatélites respectivamente, vs. 26 usados en nuestro trabajo, dado que el número de loci impacta en forma importante la potencia de las comparaciones. Además se ha comprobado haciendo uso de simulaciones un aumento del 75% en la estabilidad de distancias genéticas en índices basados en heterocigosidad esperada cuando se pasa de 6 a 17 loci (Koskinen, 2004), lo que representa un indicador claro de la influencia del número de loci en estudios de variabilidad genética de poblaciones, aunque no se pueden descartar diferencias causadas por la estructura en cada una de las poblaciones, su historia, tamaño efectivo de las poblaciones y diferencias entre los programas de mejora genética, además de las diferencias en especie.

Algunos autores han sugerido el uso de valores de diversidad alélica señalando que estas medidas son más sensibles para mostrar cambios en las estructuras de las poblaciones que valores de H_e , debido a que en muchas ocasiones no fue posible establecer diferencias entre las poblaciones para H_e , pero como ha sido evidente en este trabajo, en ciertos casos, el uso de un mayor número de loci, permite establecer diferencias entre poblaciones haciendo uso de medidas de H_e .

Al realizar los análisis de diferenciación génica en la comparación locus por locus entre las poblaciones G05 y G07 existían 12 loci que no mostraban evidencia de diferenciación génica entre las poblaciones, mientras que al realizar las comparaciones entre las poblaciones de organismos cultivados contra la población Silv sólo en la comparación de la población G07 contra la población Silv se observó que 2 loci no presentaban diferenciación entre las poblaciones; estos resultados nos dicen que a pesar de que existe diferenciación génica al comparar entre todos los pares de poblaciones haciendo uso de todos los loci, las poblaciones G05 y G07 presentan una menor diferenciación al compararse entre sí y que existe una mayor diferenciación génica cuando se realiza esta misma comparación entre las poblaciones G05 y G07 con respecto a la Silv. Estos resultados son consistentes al realizar los análisis de diferenciación genotípica donde la comparación locus por locus resultó en 14 loci donde no se observaba diferenciación genotípica al comparar la población G05 contra la población G07, mientras que al comparar la población G07 contra la población Silv sólo 2 loci no mostraron evidencia de diferenciación genotípica y ningún loci mostró evidencia de ausencia de diferenciación genotípica al comparar entre las poblaciones G05 y Silv.

Además en este trabajo, los resultados del análisis para posibles eventos de cuellos de botella mostraron que bajo los supuestos de un modelo IAM la información de la población G05 era compatible con este tipo de eventos, mientras que, bajo los supuestos de un modelo SMM y TPM todas las poblaciones eran compatibles con este tipo de eventos, Schlötterer *et al.* (2004) mencionan que

para el caso de los microsatélites el modelo de SMM es más adecuado que el modelo IAM y aun más, la variante TPM es más adecuada. Con ésto podemos pensar que durante la fundación de la población del núcleo genético se suscitó un evento de esta naturaleza, a pesar de que la población fue fundada a partir de un muestreo de varias poblaciones. Sin embargo, no podemos descartar que estos resultados sean debido al tipo de loci que fueron utilizados para el estudio, ya que algunos de ellos fueron generados a partir de ADN complementario o al método empleado (Balloux *et al.*, 2000; Balloux y Lugon-Moulin, 2002).

Debido a que tanto en las poblaciones G05, G07 y Silv encontramos loci con exceso de heterocigotos, el efecto de desviación del equilibrio H-W puede deberse a algún artefacto derivado del tipo de loci usados.

Los valores de F_{st} y R_{st} mostraron una moderada diferenciación genética entre las poblaciones Silv y la población G05 y la población Silv y G07, con lo cual se confirma el hecho de la clara diferenciación de la población Silv, mientras que la baja diferenciación entre la población G05 y G07 es una indicación de que pudieran existir diferencias entre estas poblaciones debido a la selección, lo cual a su vez puede verse reflejado en los resultados de N_e , donde existe una disminución en el número de familias entre la población G05 y el estimado en conjunto ponderado de las poblaciones G05 y G07 coincidiendo con los resultados obtenidos por Dixon *et al.* (2008) y que también pueden observarse en la figura 6, donde podemos observar agrupación de individuos de las poblaciones G05 y G07 en algunos conglomerados o clusters del dendrograma que se intercalan uno con otro mostrando un cierto grado de diferenciación pero sin ser completa, aunque

estos cambios no pudieron ser comprobados haciendo uso de H_e e índices de riqueza alélica.

En el dendrograma donde se agrupan a los individuos mediante el método de alelos compartidos (Figura 5) se observa que los organismos de la población Silv se agrupan juntos pero compartiendo una raíz común con organismos de las poblaciones G05 y G07, lo cual se esperaba, dado que la construcción del dendrograma con el método *neighbor joining* se hace a partir del número de alelos compartidos y siendo la población Silv la que mayor número de alelos contenía, los individuos de esta población serán los únicos en compartir alelos que no están presentes en el resto de las poblaciones evitando el traslape con individuos de otras poblaciones con excepción de algunos organismos, los cuales se agruparon separadamente del gran conjunto de individuos de la población Silv, traslapándose con individuos de las poblaciones G05 y G07. Ello también es indicativo de que algunos alelos presentes de las poblaciones en cautiverio están presentes también en la población silvestre.

El hecho de que los análisis para comprobar cuellos de botella hayan sido significativos para esta población sugieren que este evento tuvo influencia en la disminución de variabilidad genética. Ésto es debido a que un evento de cuello de botella provoca una disminución en el número de alelos y un mayor número de Heterocigotos en la población debido a la presencia de alelos en frecuencias pequeñas, causando desequilibrio de H-W debido a esta circunstancia (Cornuet y Luikart, 1996).

Aunque la población silvestre mostró poseer una variabilidad genética mayor que la de cultivo, es imposible con este estudio determinar qué porcentaje de esta diferencia en la variabilidad genética se perdió cuando la población del núcleo fue fundada y cuanta de ella se perdió por el efecto de selección en la misma a través de los años.

Es necesario realizar estudios que abarquen un mayor número de generaciones con el fin de observar cambios a largo plazo en las poblaciones debidos a la selección.

8. Conclusiones

La variabilidad genética de las poblaciones G05 y G07 medida como H_e e índices de riqueza alélica no presentó diferencias, por lo que podemos concluir que a corto plazo (2 ciclos de selección), el programa de mejora no afectó en forma significativa la variabilidad genética del núcleo genético. La variabilidad genética de los organismos silvestres es mayor que en los organismos de cultivo a pesar de que la segunda fue fundada a partir de muestras de individuos provenientes de varias poblaciones de diferente origen geográfico. Sin embargo, en las comparaciones de diferenciación genética si se observaron diferencias significativas entre las dos generaciones de la población en cautiverio.

Las poblaciones del núcleo genético tuvieron una clara diferenciación génica y genotípica de la población formada por organismos silvestres, esta diferenciación se debe al efecto fundador y a los efectos de la selección sobre la población del núcleo genético.

Los valores de F_{st} entre pares de poblaciones indican que puede existir una leve diferenciación entre la generación 2005 y 2007, diferenciación que podría deberse al efecto de selección en el núcleo genético o a otras causas como deriva.

El hecho de que en este estudio se pudieran establecer diferencias entre poblaciones usando valores H_e en comparación a trabajos previos, fue debido al número de loci utilizado, el cual fue superior comparado con estudios similares en *L. vannamei* y otras especies.

Los resultados de este estudio indican que la introducción de organismos silvestres puede ser beneficioso para conservar o incrementar la variabilidad genética en núcleos de selección.

9. Bibliografía

- Aggrey, S.E., Lin, C.Y., Cheng, K.M., 1995. Size of breeding populations required for selection programs. *Theoretical and Applied Genetics* 91, 553-556.
- Aranguren-Méndez, J.A., Román-Bravo, R., Isea1, W., Villasmil, Y., Jordana, J., 2005. Microsatellites (STR's), ADN molecular markers for excellency for conservation programs: a review. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal* 13, 30-42.
- Arena, L., Cuzon, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Soyey, C., Wormhoudt, A.V., Rosas1, C., 2003. Physiological and genetic variations in domesticated and wild populations of *Litopenaeus vannamei* feed with different carbohydrate levels. *Journal of Shellfish Research* 22, 269-279.
- Balloux, F., Brunner, H., Lugon-Moulin, N., Hausser, J., Goudet, J., 2000. Microsatellites can be misleading: an empirical and simulation study. *Evolution* 54, 1414-1422.
- Balloux, F., Lugon-Moulin, N., 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11, 155-165.
- Baumung, R., Sölkner, J., 2003. Pedigree and marker information requirements to monitor genetic variability. *Genetics Selection Evolution* 35, 369-383.

- Bierne, N., Beuzart, I., Vonau, V., Bonhomme, F., Bédier, E., AQUACOP, 2000. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 184, 203-219.
- Brown, R.C., 2004. Genetic management and selective breeding in farmed populations of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). University of Stirling, p. 197.
- Carvajal-Rodríguez, A., Rolán-Alvarez, E., Caballero, A., 2005. Quantitative variation as a tool for detecting human-induced impacts on genetic diversity. *Biological Conservation* 124, 1-13.
- CONAPESCA-SAGARPA, 2003. Anuario Estadístico de Pesca 2003. SAGARPA, México D.F.
- CONAPESCA-SAGARPA, 2004. Anuario Estadístico de Pesca 2004. SAGARPA, México D.F.
- Cornuet, J.M., Luikart, G., 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001-2014.
- Cruz, P., Ibarra, A.M., Mejía-Ruiz, H., Gaffney, P.M., Pérez-Enríquez, R., 2004. Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine Biotechnology* 6, 157-164.

- Cruz, P., Mejia-Ruiz, C.H., Perez-Enriquez, R., Ibarra, A.M., 2002. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific White Shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Molecular Ecology Notes* 2, 239-241.
- DeDonato, M., Manrique, R., Ramirez, R., Mayer, L., Howell, C., 2005. Mass selection and inbreeding effects on a cultivated strain of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in Venezuela. *Aquaculture* 247, 159-167.
- Diez-Tascon, C., Littlejohn, R.P., Almeida, P.A.R., Crawford, A.M., 2000. Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Animal Genetics* 31, 243-251.
- Dixon, T.J., Coman, G.J., Arnold, S.J., Sellars, M.J., Lyons, R.E., Dierens, L., Preston, N.P., Li, Y., 2008. Shifts in genetic diversity during domestication of Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*, monitored using two multiplexed microsatellite systems. *Aquaculture* 283, 1-6.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47-50.
- FAO, 2006. Departamento de pesca de la FAO perfiles de pesca por países: México, In: FAO (Ed.).
- FAO, NACA, UNEP, WB, WWF, 2006. International principles for responsible shrimp farming. network of aquaculture centres in Asia-Pacific (NACA), Bangkok, Thailand.

- Freitas, P.D., Calgaro, M.R., Galetti Jr, P.M., 2007a. Genetic diversity within and between broodstocks of the White Shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae) and its implication for the gene pool conservation. *Brazilian Journal of Biology* 67, 939-943.
- Freitas, P.D., Jesus, C.M., Galetti, P.M., 2007b. Isolation and characterization of new microsatellite loci in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and cross-species amplification in other penaeid species. *Molecular Ecology Notes* 7, 324-326.
- Freitas, P.D.d., Galetti Junior, P.M., 2002. PCR-based VNTR core sequence analysis for inferring genetic diversity in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Genetics and Molecular Biology* 25, 431-434.
- Freitas, P.D.d., Galetti Jr, P.M., 2005. Assessment of the genetic diversity in five generations of a commercial broodstock line of *Litopenaeus vannamei* shrimp. *African Journal of Biotechnology* 4, 1362-1367.
- Gautschi, B., Muller, J.P., Schmid, B., Shykoff, J.A., 2003. Effective number of breeders and maintenance of genetic diversity in the captive bearded vulture population. *Heredity* 91, 9-16.
- Gillespie, J.H., 2004. *Population genetics: a concise guide*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md.
- Gjedrem, T., 2005. *Selection and breeding programs in aquaculture*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

- Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L., Feldman, M.W., 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139, 463-471.
- Goldstein, D.B., Schlotterer, C., 1999. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, New York, NY.
- Gomez-Raya, L., Olsen, H.G., Lingaas, F., Klungland, H., Vage, D.I., Olsaker, I., Talle, S.B., Aasland, M., Lien, S., 2002. The use of genetic markers to measure genomic response to selection in livestock. *Genetics* 162, 1381-1388.
- Goodman, S.J., 1997. RST Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. *Molecular ecology* 6, 881-885.
- Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics. *J Hered* 86, 485-486.
- Goyard, E., Arnaud, S., Vonau, V., Bishoff, V., Mouchel, O., Pham, D., Wyban, J., Boudry, P., 2003. Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. *Aquatic Living Resources* 16, 501-508.
- Hartl, D.L., 1987. *A primer of population genetics*. Sinauer Associates, Sunderland.

- Hill, W.G., 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research* 38, 209-216.
- Hill, W.G., 2000. Maintenance of quantitative genetic variation in animal breeding programmes. *Livestock Production Science* 63, 99-109.
- Jin, L., Chakraborty, R., 1994. Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity from single-probe multilocus DNA fingerprinting data. *Molecular Biology and Evolution* 11, 120-127.
- Kalinowski, S.T., 2002. Evolutionary and statistical properties of three genetic distances. *Molecular ecology* 11, 1263-1273.
- Kalinowski, S.T., 2005a. Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances? *Heredity* 94, 33-36.
- Kalinowski, S.T., 2005b. hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes* 5, 187-189.
- Kaplinski, L., Andreson, R., Puurand, T., Remm, M., 2005. MultiPLX: automatic grouping and evaluation of PCR primers. *Bioinformatics* 21, 1701-1702.
- Kristensen, T.N., Sørensen, A.C., Sorensen, D., Pedersen, K.S., Sørensen, J.G., Loeschcke, V., 2005. A test of quantitative genetic theory using *Drosophila* – effects of inbreeding and rate of inbreeding on heritabilities and variance components. *J. Evol. Biol.* 18, 763-770.

- Leberg, P.L., 2002. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology* 11, 2445-2449.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1-37.
- Luan, S., Kong, J., Wang, Q.Y., 2006. Genetic variation of wild and cultured populations of the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Bate 1888) using microsatellites. *Aquaculture Research* 37, 785-792.
- Lundrigan, T.A., Reist, J.D., Ferguson, M.M., 2005. Microsatellite genetic variation within and among Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from aquaculture and natural populations in North America. *Aquaculture* 244, 63-75.
- Luvesuto, E., Freitas, P.D.d., Galetti Junior, P.M., 2007. Genetic variation in a closed line of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). *Genetics and Molecular Biology* 30, 1156-1160.
- Machado Tamayo, R.J., 2006. Assessment of genetic variability in two lots of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) introduced to Cuba, Department of Aquatic Biosciences, University of Tromsø, Norway, p. 42.
- Melon Barroso, R., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, H.L.M., Cabello, P.H., Traub-Cseko, Y.M., 2005. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. *Aquaculture* 247, 51-65.

- Koskinen, M. T., H.H.P.-A.L.C.R.P., 2004. The benefits of increasing the number of microsatellites utilized in genetic population studies: an empirical perspective. *Hereditas* 141, 61-67.
- Morera, L., Andrés, D.F.d., Barbancho, M., Garrido, J.J., Barba, C.J., 1999. Detección de Variabilidad Genética por Microsatélites en el Alano Español. *Arch. Zootec* 48, 63-70.
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 3321-3323.
- Nei, M., 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics* 41, 225-233.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press., Nueva York.
- Nei, M., Roychoudhury, A.K., 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76, 379-390.
- Norris, A.T., Bradley, D.G., Cunningham, E.P., 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture* 180, 247-264.
- Notter, D.R., 1999. The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *Journal of Animal Science*. 77, 61-69.

- Peel, D., Ovenden, J., Peel, S., 2004. NeEstimator: software for estimating effective population size, Version 1.3., Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries.
- Pérez, F., Ortiz, J., Zhinaula, M., Gonzabay, C., Calderón, J., Volckaert, F.A.M.J., 2005. Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus birdy*. *Marine Biotechnology* 7, 554-569.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *The Journal of Heredity* 86, 248-249.
- Rengmark, A.H., Slettan, A., Skaala, Ø., Lie, Ø., Lingaas, F., 2006. Genetic variability in wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) strains estimated by SNP and microsatellites. *Aquaculture* 253, 229-237.
- Ryman, N., Utter, F., 1987. Population genetics and fishery management. Washington Sea Grant Program: Distributed by University of Washington Press, Seattle.
- Schlötterer, C., Kauer, M., Dieringer, D., 2004. Allele excess at neutrally evolving microsatellites and the implications for tests of neutrality. *Proceedings of the Royal Society of London. B*, 869-874.
- Slatkin, M., 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139, 457-462.

- Souza de Lima, A.P., Santos, A.C.L.d., Dantas, H.L., Filho, M.A.G., Maggioni, R., Coimbra, M.R.M., 2008. Genetic monitoring of broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* in a closed rearing system in Pernambuco, Brazil. *Aquaculture Research* 39, 1461-1466.
- Toro, M., Fernández, J., Caballero, A., 2006. Scientific basis for policies in conservation of farm animal genetic resources, 8th World Congress On Genetics Applied To Livestock Production, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- Valles-Jimenez, R., Cruz, P., Perez-Enriquez, R., 2004. Population Genetic structure of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology* 6, 475-484.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.
- Wolfus, G.M., Garcia, D.K., Alcivar-Warren, A., 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture* 152, 35-70.
- Wright, S., 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. *The American Naturalist* 56, 330-338.
- Xu, Z., Primavera, J.H., Pena, L.D.d.I., Pettit, P., Belak, J., Alcivar-Warren, A., 2001. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* 199, 13-40.

Zhi-Ying, J.I.A., Xiao-Wen, S.U.N., Li-Qun, L., Da-Yu, L.I., Qing-Quan, L.E.I., 2006.
Isolation and characterization of microsatellite markers from Pacific White
Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Molecular Ecology Notes 6, 1282-1284.

Anexo A

Protocolo de precipitación por sales para extracción de ADN

1. En un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml añadir 400 µl de solución de lisis.
2. Añadir el tejido y macerar manualmente algunos segundos.
3. Añadir 20 µl de proteinasa K.
4. Incubar a 95° C por 15 minutos. Alternativamente se puede incubar a 55° C por toda la noche.
5. Añadir 200 µl de NaCl saturado y agitar vigorosamente varias veces.
6. Incubar en hielo 10 minutos.
7. Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 minutos.
8. Transferir el sobrenadante (aproximadamente 500 µl) a un tubo con 1 ml de etanol absoluto.
9. Invertir el tubo varias veces para precipitar el ADN. El ADN debe ser visible en etanol. Si el ADN no es visible se recomienda centrifugar a 13,000 o 14,000 rpm durante 10 minutos.
10. Tomar el ADN con la punta de la pipeta transferirlo a 100 µl de solución TE.
11. Incubar a temperatura ambiente hasta el día siguiente o de 30 a 60 minutos para disolver el ADN.

Solución de lisis

NaCl 5M	1 ml
Tris 1M, pH 8	2.5 ml
EDTA 0.5 M pH8	10 ml
SDS 10%	5ml

Aforar a 50 ml

NaCl 5M

NaCl	292g
H2O	Aforar a 1 L

EDTA 0.5M pH8.0

EDTA	186.1g
H2O	Aforar a 1 L

Ajustar pH a 8.0

Tris 1M

Tris Base	121g
H2O	Aforar hasta 1L

Ajustar pH a 8.0

Solución TE (Tris/EDTA)

Tris - HCl pH 7.4, 7.5 ó 8.0	10mM
EDTA pH 8.0	1mM

Solución NaCl saturada

H2O	500ml
NaCl	Hasta el punto de no disolución

Anexo B

Protocolos de PCR

Grupo LvMG1

Componente	Volumen X1	Volumen X8
H2O	5.5	44
Multiplex Master Mix	12.5	100
Sol Q	2.5	20
Primers	2.5	20
ADN	2	-

	Tiempo	Temperatura	
Activación Inicial	15min	95°	
Desnaturalización	30s	94°	X 30 ciclos
Alineación	90s	53.3°	
Extensión	60s	72°	
Extensión final	30min	60°	

Grupo LvMG2

Componente	Volumen X1	Volumen X8
H2O	8	64
Multiplex Master Mix	12.5	100
Primers	2.5	20
ADN	2	-

	Tiempo	Temperatura	
Activación Inicial	15min	95°	
Desnaturalización	30s	94°	X 30 ciclos
Alineación	90s	48.1°	
Extensión	60s	72°	
Extensión final	30min	60°	

Grupo LvMG3-1

Componente	Volumen X1	Volumen X8
H2O	5.5	44
Multiplex Master Mix	12.5	100
Sol Q	2.5	20
Primers	2.5	20
ADN	2	-

	Tiempo	Temperatura	
Activación Inicial	15min	95°	
Desnaturalización	30s	94°	X 30 ciclos
Alineación	90s	46.4°	
Extensión	60s	72°	
Extensión final	30min	60°	

Grupo LvMG3-2

Componente	Volumen X1	Volumen X8
H2O	5.5	44
Multiplex Master Mix	12.5	100
Sol Q	2.5	20
Primers	2.5	20
ADN	2	-

	Tiempo	Temperatura	
Activación Inicial	15min	95°	
Desnaturalización	30s	94°	X 30 ciclos
Alineación	90s	53.2°	
Extensión	60s	72°	
Extensión final	30min	60°	

Grupo LvMG4-1

Componente	Volumen X1	Volumen X8
H2O	8	64
Multiplex Master Mix	12.5	100
Sol Q	2.5	20
Primers	2.5	20
ADN	2	-

	Tiempo	Temperatura	
Activación Inicial	15min	95°	
Desnaturalización	30s	94°	X 28 ciclos
Alineación	90s	50.2°	
Extensión	60s	72°	
Extensión final	30min	60°	

Grupo LvMG4-2

Componente	Volumen X1	Volumen X8
H2O	5.5	44
Multiplex Master Mix	12.5	100
Sol Q	2.5	20
Primers	2.5	20
ADN	2	-

	Tiempo	Temperatura	
Activación Inicial	15min	95°	
Desnaturalización	30s	94°	X 28 ciclos
Alineación	90s	51.9°	
Extensión	60s	72°	
Extensión final	30min	60°	