



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**“Determinación de la estructura poblacional de
Litopenaeus vannamei mediante ISSRs a lo largo de la
costa ecuatoriana”**

Tesis de Grado
Previa a la obtención del título de:

MAGISTER EN CIENCIAS

Presentada por:
Adriana Fresneda Rodríguez

Guayaquil-Ecuador

2003

TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:



FUNDACIÓN CENAIM-ESPOL



COOPERACIÓN TÉCNICA BELGA



**UNIVERSIDAD DE GANTE
BELGICA**



**UNIVERSIDAD CATOLICA
DE LOBAINA – BELGICA**



FUNDACION PARA LA CIENCIA Y LA TECNOLOGIA

VITA

Adriana Fresneda Rodríguez, hija de Teresa Rodríguez y Jaime Fresneda, nació el 16 de marzo de 1970 en Santafé de Bogotá, Colombia. Recibió el título de Biólogo Marino de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano de Colombia en el año 1994. Trabajó como contratista en el Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, INPA 1995-1997. Fue Coinvestigadora en el Proyecto “Caracterización y Criopreservación de Semen de Especies Nativas Colombianas” 1998-1999. Centro de Investigaciones - Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano e Investigadora en el Proyecto “Criopreservación de Semen y Embriones de *Piaractus braquipomus*” 2000. Universidad de Antioquia. Fue aceptada en el programa de Maestría en Acuicultura Marina de la Escuela Superior Politécnica del Litoral en septiembre del año 2000, becada por la Cooperación Técnica Belga.

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL.”

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

Adriana Fresneda Rodríguez.

TRIBUNAL DE TESIS

Eduardo Cervantes Ing.
Presidente del Tribunal

Filip Volckaert, Ph.D.
Director de Tesis

Franklin Pérez, M.Sc.
Co-Director de Tesis
Miembro del Tribunal

Laurence Massaut, Ph.D.
Miembro del Tribunal

Julia Nieto, Ph.D.
Miembro del Tribunal

DEDICATORIA

*Dentro de ti hay la capacidad
de lograr tus metas
y convertir en realidad tus sueños.
No escuches a los demás
ni temas la competencia,
ni te preocupes si te equivocas.
De cada experiencia
se gana sabiduría.
Ten fe en ti
como la persona especial
que has sido destinada a ser.*

-Mary Hough Foote-

*A mis padres, Teresa y Jaime
A mis hermanos Ximena, Pedro Andrés y Angela
María
Gracias por creer en mí.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por el don de la vida.

A mis padres, Teresa y Jaime, y a mis hermanos Ximena, Pedro Andrés y Angela María, por sus sacrificios, comprensión y apoyo constante.

A la Doctora Laurence Massaut, por la oportunidad que me brindó de participar en el programa de maestría y su esfuerzo para que este trabajo se realizara.

A mi codirector Franklin Pérez, por su asesoría y orientación con el plan B

A una gran amiga Julie Nieto, por enseñarme porque somos seres únicos, además de lo aprendido con el plan A.

A unas madres increíbles Irma, Bertha y María de Lourdes, de las cuales aprendí que es la “Familia CENAIM”.

A Anita, por el tiempo, dedicación y enseñanzas que me brindó durante este tiempo.

A Karla Vanesa, amiga vinistes desde tan lejos para hacer geles, gracias

A Constanza, Iván, Jaime, Pilar, Martha, Miguel, Carmen, Rómulo, Víctor, Carmela, Maritza y Jhony, por los momentos compartidos (M2: No somos todos los que estamos ni estamos todos los que somos).

A Mervin, Mariel, Verónica, Vanesa, Yuri, Galo, Robin, Jordan, Francisco, quienes en algún momento colocaron su granito de arena para culminar este trabajo.

A la fundación CENAIM – ESPOL y las personas que en ella laboran, por su ayuda en el momento justo, Gracias

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 GENÉTICA DE POBLACIONES	5
2.2. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DE LA VARIBILIDAD	
GENÉTICA	7
2.2.1. Electroforesis de Proteínas- Isoenzimas:.....	8
2.2.2. ADN mitocondrial.....	8
2.2.3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism):.....	9
2.2.4. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA):.....	9
2.2.5. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism):.....	10
2.2.6. Microsatélites (Simple Sequences Repeats):	10
2.2.7. ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat):	11
2.2.8. Análisis de poblaciones en camarones	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	16
3.2. EXTRACCIÓN DE ADN.....	17

3.3. ISSRs	18
3.4. GEL DE POLIACRILAMIDA	19
3.5. TINCIÓN DE PLATA	19
3.6. FOTOGRAFÍA Y DOCUMENTACIÓN.....	20
3.7. EVALUACIÓN DE REPRODUCIBILIDAD DE ISSRs	20
3.8. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	21
3.8.1. Análisis Estadístico para variabilidad dentro de las poblaciones.....	22
3.8.2. Análisis Estadístico para diferenciación entre poblaciones.	23
4. RESULTADOS	25
4.1. VARIABILIDAD GENÉTICA DENTRO DE LAS POBLACIONES	25
4.2. VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE POBLACIONES	Error! Bookmark not defined.
5. DISCUSIÓN	Error! Bookmark not defined.
6. CONCLUSIONES	47
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Error! Bookmark not defined.
ANEXOS.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema generación ISSRs.....	12
Figura 2. Ubicación de las zonas de recolección a través de la costa ecuatoriana (1 Atacames; 2 Pedernales; 3 San Clemente; 4 Puerto de Cayo; 5 San Pablo; 6 Posorja y 7 Machala).....	16
Figura 3. Ubicación de la zona de recolección de la muestra en el Estero Salado, Nicaragua.....	16
Figura 4. Análisis de los perfiles generados a partir de réplicas (Mt: Marcador de talla, N: Nicaragua, M: Machala, Po: Posorja, S: San Pablo, C: Puerto de Cayo, Cl: Clemente, P: Pedernales, A: Atacames).....	22
Figura 5. Perfil de ISSRs analizando los ocho grupos de animales (Mt Marcador de talla, N: Nicaragua, M: Machala, Po: Posorja, S: San Pablo, C: Puerto de Cayo, Cl: Clemente, P: Pedernales, A: Atacames).....	25
Figura 6. Dendograma generado a partir de distancias genéticas modificadas de Nei (1978) bajo el primer 861.....	Error! Bookmark not defined.
Figura 7. Dendograma generado a partir de distancias genéticas modificadas de Nei (1978) bajo el primer 862.....	Error! Bookmark not defined.
Figura 8. Dendograma generado a partir de distancias genéticas modificadas de Nei (1978) al agrupar los primers 861 y 862.	Error! Bookmark not defined.
Figura 9. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los ISSRs generados con el primer 861 de las seis localidades en estudio.	32

- Figura 10. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los ISSRs generados con el primer 862 de las seis localidades en estudio.....33
- Figura 11. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los ISSRs generados al agrupar los primers 861 y 862 de las seis localidades en estudio.**Error! Bookmark not defined.**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Localización geográficas de las zonas de muestreo	17
Tabla 2. Reactivos utilizados en la obtención de ISSRs	18
Tabla 3. Composición de las soluciones para tinción de plata y tiempo requerido.....	20
Tabla 4. Secuencia de primers utilizados.....	21
Tabla 5. Heterocigosidad y polimorfismo promedios de los animales silvestres de las siete localidades escogidas con el primer 862.....	26
Tabla 6. Heterocigosidad y polimorfismo promedios de los animales silvestres de las siete localidades escogidas con el primer 861.....	27
Tabla 7. Heterocigosidad y polimorfismo promedios de los animales silvestres de las siete localidades escogidas con el agrupamiento de los primers 861 y 862.....	27
Tabla 8. Distancias genéticas de los animales silvestres de las localidades de Atacames (1), Puerto de Cayo (2), Machala (3), Posorja (4), San Clemente (5), Pedernales (6) y Nicaragua (7) obtenidas con el primer 861.	29
Tabla 9. Distancias genéticas de los animales silvestres de las localidades de Atacames (1), Puerto de Cayo (2), Machala (3), Posorja (4), San Clemente (5), Pedernales (6) y Nicaragua (7) obtenidas con el primer 862.	29
Tabla 10. Distancias genéticas de los animales silvestres de las localidades de Atacames (1), Puerto de Cayo (2), Machala (3), Posorja (4), San Clemente (5), Pedernales (6) y Nicaragua (7) obtenidas con el agrupamiento de los primers 861 y 862.....	29

- Tabla 11. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los ISSRs generados con el primer 861 de las seis localidades en estudio. **Error! Bookmark not defined**
- Tabla 12. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los ISSRs generados con el primer 862 de las seis localidades en estudio. 33
- Tabla 13. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los ISSRs generados al agrupar los primers 861 y 862 de las seis localidades en estudio. **Error! Book**

LISTA DE ABREVIATURAS

AMOVA	Analysis of Molecular Variance
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
CTAB	Cetyl-Trimetyl-Ammonium Bromide
dNTPs	dinucleotic triphosphate
EST	expressed sequence tags
Fst	Índice de fijación
Gst	Índice de diversidad genética de Nei
IHHNV	Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeat
PCR	polymerase chain reaction
PMCR	Programa de Recursos Costeros
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSR	Simple Sequences Repeats
STR	Short Tandem Repeats
TAE	solución amortiguadora de Tris base, Acido Acético, EDTA
TBE	solución amortiguadora de Tris base, Acido Bórico, EDTA
UPGMA	Unweighted Pair-Group Mean Analysis
ϕ st	homologo al índice de fijación, Fst

RESUMEN

Muestras de *Litopenaeus vannamei* fueron colectadas en siete localidades a lo largo de la costa ecuatoriana desde Esmeraldas hasta Machala. Se implementó la técnica de microsatélites no anclados ISSR, para estudiar la estructura poblacional de esta especie. Se observó una alta heterocigosidad (entre 0,14 y 0,28) y un polimorfismo entre el 50% y el 85,1% (p=95%). Los valores máximos de distancias genéticas generados a través del coeficiente de Nei (1978) para dos primers y su combinación fueron de 0,007, 0,006 y 0,022, respectivamente. Los valores de Fst entre 0,006 y 0,031 y el análisis de varianza molecular (AMOVA) en los que no se presentó diferencias significativas, indican que no existe una estructura poblacional entre los puntos de muestreo colectados a lo largo de la costa ecuatoriana. La población ecuatoriana correspondería a un grupo panmítico que se extiende en el rango estudiado. Debido a que la técnica de ISSR es un marcador dominante se deberán realizar estudios con marcadores codominantes tipo microsatélites para confirmar nuestros resultados.

ABSTRACT

Samples of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* were collected along the Ecuadorian seashore from the provinces of Esmeraldas to El Oro. For comparison a Nicaraguan sample was included. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers were implemented to determine the genetic structure. A high level of heterozygosity was observed - between 0.14 and 0.28 - whereas polymorphism (P95%) ranged from 50% to 85,1%. The maximum genetic distances determined by Nei's coefficient were 0.007, 0.006 and 0.022. The F_{ST} values ranged from 0.014 to 0.034 and an AMOVA showed no significant differences. We therefore conclude that there is no genetic structure within the groups sampled throughout the Ecuadorian seashore. The population is considered panmictic along the sampling area. Since ISSRs are dominant markers, further research must be done with codominant markers such as microsatellites to confirm the panmixia within this population.

1. INTRODUCCIÓN

El sector camaronero ha tenido un desarrollo alto durante los últimos 20 años a nivel mundial. Como resultado de esto, países como Tailandia, Indonesia, Vietnam, China, India, Ecuador, México, Colombia, Perú y Panamá han reforzado su producción camaronera tanto para consumo interno como para exportación.

Para el Ecuador, hasta antes de la llegada de la mancha blanca, el camarón fue el tercer producto de exportación después del petróleo y el banano. Este producto generó durante los años 1997 y 1998 ingresos que superaron los 800 millones de dólares anuales (Cámara Nacional de Acuicultura, 2001). *Litopenaeus vannamei* es la especie de camarón más importante en la economía del Ecuador.

Hartl y Clark (1997) definen la diversidad o variabilidad genética como “la variedad de diferentes genes en una población reproductiva, dentro de una especie o dentro de todas las especies encontradas en un área dada” y por ende, la capacidad a responder tanto a cambios de índole ambiental como a transformaciones dadas por algún tipo de selección, ya sea natural o generada con algún propósito. Al evaluar esta variabilidad a través de estudios de poblaciones silvestres se ha llegado a la caracterización e identificación de grupos base para especies que tienen una importancia comercial, determinando la presencia de stock de poblaciones con los cuales se pueden crear esquemas de manejo del recurso y mejorar a largo plazo la sostenibilidad (Philipp *et al.*, 1993).

Estos estudios de poblaciones de animales son una herramienta útil para los programas de conservación, que en los últimos años han tomado un gran auge. La importancia de la biodiversidad y su conservación quedó patente a partir de la cumbre de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo realizada en Río de Janeiro en 1992. La pérdida de diversidad genética merma nuestra capacidad para mantener y mejorar la producción pecuaria y reduce la aptitud para hacer frente a nuevas condiciones ambientales (FAO, <http://fao.org/dad-is>).

Adicionalmente, el monitoreo de la diversidad genética es esencial para poder mejorar los programas de selección con el fin de mostrar que tan bien las poblaciones domésticas representan las variaciones naturales de las especies. Los datos de diversidad genética pueden proveer información a cerca de alelos raros, decrecimiento de la heterocigosidad e incremento en los niveles de entrecruzamiento dentro de los programas de cría (Lester, 1983; Sunden y Davis, 1991).

En el Ecuador, las poblaciones silvestres de camarón han sido afectadas por la explotación pesquera, la actividad camaronera y eventos naturales. En el estudio realizado por el Programa de Recursos Costeros durante 1999 en la costa norte ecuatoriana se observó la disminución de la población de reproductores de camarón. Esta reducción fue rápida en los años 1954 y desde 1987 ha sido paulatina (Mosquera *et al.*, 1998). También se encontró que fenómenos como la Niña están relacionados con dicha disminución, desestabilizando las poblaciones naturales de camarón (PMRC, 1999). Lo anterior, unido a la incidencia de enfermedades en animales de cultivo (Lightner, 1993) conducen a la necesidad de

establecer una industria más estable desde el punto de vista productivo. Por lo cual se ha impulsado la implementación de programas de mejoramiento genético en camarón. Para lograr un programa genético con buenas probabilidades de éxito es necesario generar una estructura genética y una variabilidad amplia en las poblaciones base de selección. La implementación de programas adecuados permitiría desarrollar stocks domésticos libres de enfermedades o resistente a ellas (Wyban *et al.*, 1993; Carr *et al.*, 1996). Para ello es necesario tener poblaciones stock de animales silvestres cuya caracterización, en cuanto a variabilidad y estructura genética se ha conocida y así poder tener material disponible para aumentar variabilidad genética en el caso que se encuentre una disminución de ésta durante el programa de mejoramiento. Además, la caracterización y determinación de la estructura de los camarones silvestres apoyaría el sector pesquero al crear programas de optimización del recurso al identificar poblaciones y optimizar el recurso.

A nivel de programas de mejoramiento genético en camarones se ha demostrado el potencial de marcadores específicos para familias considerando su variabilidad, utilizando diferentes técnicas como RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic ADN) (García *et al.*, 1994), ADN mitocondrial (García-Machado *et al.*, 2001), y microsatélites o Short Sequence Repeats SSRs (García *et al.*, 1996) y RFLPs (García y Benzie, 1995). Se ha observado pérdida de variación genética a través de isoenzimas en camarones (Tam y Chu, 1993; Ball *et al.*, 1998), pero no es muy claro si esta pérdida de variación espacial en muchos estudios refleja una alta dispersión de las especies o una baja sensibilidad de la técnica (Hedgecock *et al.*, 1982; Benzie, 1998). Sin embargo, estudios con isoenzimas (Benzie *et al.*, 1992) y

ADN mitocondrial (Benzie *et al.*, 1993) han demostrado diferenciación genética a escalas de miles de kilómetros.

Una nueva fuente de marcador genético, los ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeat) sobrepasan algunas de las limitaciones encontradas con las técnicas de isoenzimas, RAPDs y RFLPs (Ratnapark *et al.*, 1998). Su alto grado de polimorfismo ha sido utilizado como método de “fingerprinting” en varias especies hortícolas y frutales de importancia económica. Igualmente, con este método se han encontrado niveles de variabilidad genética en algunas especies de gimnospermas.

El presente estudio pretende caracterizar la variabilidad genética y estructura de la población silvestre del camarón blanco *L. vannamei* a lo largo de la costa ecuatoriana utilizando la técnica de ISSRs no anclados. El cual serviría como base en los programas de mejoramiento que se vienen implementando en el Ecuador al tener material disponible para aumentar la variabilidad genética y poder evitar el entrecruzamiento.

2. ANTECEDENTES

2.1 GENÉTICA DE POBLACIONES

Una población puede definirse como el conjunto de individuos que pueden intercambiar libremente y entre todos ellos material genético a través del proceso reproductivo y generar una descendencia fértil (Vázquez, 1993). Muchos organismos forman naturalmente subpoblaciones como manadas, rebaños, colonias u otro tipo de agregación, los cuales se desarrollan en hábitats naturales en donde se presentan zonas favorables alternadas con áreas desfavorables. Estas áreas favorables pueden llegar a sufrir desarreglos en su organización debido a agentes naturales como fuegos, inundaciones y pueden producir diferencias y subdivisiones en las poblaciones (Hartl y Clark, 1997).

Los procesos evolutivos se presentan en las poblaciones, porque los cambios ocurren en el genomio de la especie, el cual está constituido por el material genético colectivo de toda la población. Los cambios evolutivos sólo se manifiestan después de ciertos periodos, ya que las variaciones de una generación a otra son pequeñas (Sturtevant, 2001). Se entiende por diferenciación genética a la adquisición de frecuencias alélicas que varían entre las subpoblaciones. Las diferencias genéticas pueden ser el resultado de la selección natural, favoreciendo diferentes fenotipos en diferentes subpoblaciones, pero también puede resultar de procesos aleatorios en la transmisión de alelos de una generación a la siguiente. Este fenómeno es conocido como deriva genética (Hartl y Clark, 1997).

La genética de poblaciones estudia la herencia en grupos de individuos, a través de los patrones de variación genética que pueden existir dentro de un grupo y como estos patrones cambian o evolucionan a través del tiempo. Las variaciones en una población son transmitidas a la siguiente generación a través de la reproducción cuando los gametos se unen para formar los cigotos. La frecuencia genética se predice de acuerdo a el enunciado de la Ley de Hardy-Weinberg (Sturtevant, 2001). Esta ley sostiene que las proporciones genotípicas permanecen constantes de una generación a la siguiente en una población que posee los siguientes criterios: apareamiento al azar, estar libre de mutaciones, tener un tamaño grande, con el cual cambios al azar en las frecuencias alélicas no son significativas, no tener migraciones y que en ella no ocurra la selección natural (Ryman, 1997). Si se produce una desviación en la frecuencia genómica se deberá a una presión selectiva en la población o a la existencia de procesos de migración, mutación o deriva genética (Sturtevant, 2001).

La cantidad de variación heredable dentro de una población es importante por varias razones. Es determinante para medir el potencial para que se realicen cambios evolutivos y adaptativos. A través de esta variación se puede llegar a identificar las fuerzas evolutivas y como afectan las poblaciones, incrementando o decreciendo dicha variación. Además, el surgimiento de nuevas especies dependerá de la cantidad de variación genética dentro de la población (Griffiths *et al.*, 1999).

2.2. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

El aspecto de un individuo (fenotipo), es la resultante de la interacción del componente genético (genotipo) con el ambiente. Si se estudia una población en el mismo ambiente, se puede asumir que las variaciones entre individuos se deben a diferencias en la constitución genética, por lo tanto estas diferencias serán heredables en mayor o menor grado.

Dentro de las técnicas de marcadores moleculares utilizados para medir la variabilidad genética se encuentran: isoenzimas, ADN mitocondrial, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), microsatélites (SSR) e Inter Simple Sequence Repeat (ISSR).

Un buen marcador es aquel que, en la misma localización genómica, tiene variación entre diversos animales dentro de la misma especie (Jiménez y Collada, 2000). Esto permite que se pueda seguir la diversidad genética entre las familias y las poblaciones, establecer las líneas de pedigrís centradas alrededor de la expresión deseada de ciertos rasgos y determinar linajes verticales y horizontales.

2.2.1. Electroforesis de Proteínas- Isoenzimas:

El estudio moderno de la variación a nivel de los genes comenzó en los años 60 con el desarrollo de una metodología para cuantificar la variación proteica en loci génicos únicos (Kreitman y Akashi, 1995). Recibe el nombre de electroforesis de isoenzimas, debido a que este método es utilizado para la examinación de variaciones de un locus particular. Las isoenzimas son las diferentes formas de una proteína codificadas para varios alelos de un locus. El proceso de electroforesis de isoenzimas comienza con la separación de estas en un campo eléctrico en un medio sólido, ya sea un gel de almidón, acetato de celulosa o acrilamida de acuerdo al tamaño y forma de las mismas. El revelado puede ser por tinción o generando una catálisis de la enzima al utilizar un sustrato específico (Hoelzel, 1998).

2.2.2. ADN mitocondrial

En los años 1980 se comenzó a analizar ADN mitocondrial para resolver las preguntas de evolución molecular y biología poblacional. En estos estudios se realizó la identificación y reconocimiento de especies y así, se obtuvo la documentación de los cambios genéticos en poblaciones que ocurren en períodos cortos de tiempo a través de la variación de los ácidos nucleicos (White, *et al.*, 1998). El procedimiento de esta técnica comienza con la obtención de sitios de restricción o análisis de fragmentos de ADN mitocondrial, secuenciación de regiones específicas del genoma mitocondrial y amplificación por PCR. Tradicionalmente, el ADN mitocondrial es aislado por lisis de la mitocondria, la cual previamente ha sido separada del núcleo y otros organelos por centrifugación diferencial. La separación de los

fragmentos de ADN se pueden llevar a cabo en geles de agarosa y poliacrilamida y el revelado bajo técnicas de tinción o radioactividad (White, *et al.*, 1998).

2.2.3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism):

Esta técnica consiste en someter al ADN en estudio a digestiones enzimáticas (Grodzicker *et al.*, 1974). Luego de digerir el ADN se procede a colocar el producto en un gel de agarosa, para ser sometido a la acción de corrientes eléctricas (electroforesis). Para poder visualizar el ADN, se trasladan los fragmentos a una membrana de nylon o de nitrocelulosa, a la que luego se le aplica una sonda (oligonucleótido complementario a una secuencia conocida) que se unirá a su secuencia complementaria, generando una marca que permite su visualización.

Por medio del estudio de la relación de las bandas polimórficas y monomórficas encontradas, se puede calcular valores que indican las relaciones familiares entre los individuos. De esta forma se pueden caracterizar familias, subpoblaciones, poblaciones, etc.

2.2.4. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA):

La técnica de RAPD, desarrollada paralelamente por Welsh y McClelland (1990) y Williams *et al.* (1990) tiene como base la reacción de polimerización en cadena o PCR (Polymerase Chain Reaction). Esta técnica involucra la utilización de oligonucleótidos arbitrarios cortos, que amplifican segmentos aleatorios dentro del genoma. La RAPD tiene la ventaja de que no es necesario tener información previa del genoma de los individuos a

estudiar. Sin embargo, tiene la tendencia de generar artefactos debido a su alta sensibilidad a las condiciones de PCR, por lo que su reproducibilidad no es muy consistente (Silva y Russo, 2000).

2.2.5. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism):

La técnica de AFLP (Vos *et al.*, 1995) combina los principios de los RFLP y los de la PCR. El ADN en estudio es sometido a la digestión de dos enzimas de restricción, luego se unen a los fragmentos "adaptadores", oligonucleótidos que tienen un extremo complementario a los cortes generados por las enzimas. Como se conocen las secuencias de los adaptadores, se elaboran primers específicos, a los cuales se les agregan 1, 2, o 3 bases en el extremo 3' con la finalidad de disminuir la cantidad de bandas amplificadas. Con el ADN digerido y los primers, se corre la PCR y el producto amplificado se visualiza en un gel de poliacrilamida donde se establece la relación de bandas monomórficas y polimórficas.

2.2.6. Microsatélites (Simple Sequences Repeats):

Los microsatélites (Litt y Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989) son secuencias de bases repetidas en el ADN, que en su mayoría corresponden a regiones no codificantes, es decir que no se traducen en proteínas.

El aislamiento de microsatélites es una actividad muy laboriosa que consta de varios pasos. Primero se digiere el ADN con enzimas de restricción para cortarlo en fragmentos pequeños, luego cada uno de estos fragmentos es incorporado a un vector, que puede ser un

plásmido o un phago, estos vectores son introducidos en bacterias que son sembradas en medios especiales. Con una sonda se identifican las colonias que llevan el vector que ha incorporado el fragmento correspondiente al microsatélite. Se realiza el reisolamiento del vector y se secuencia el fragmento incorporado. Con esta información se elaboran primers con la secuencia flanqueante del microsatélite. Estos primers sirven para amplificar un fragmento por PCR y se estudia la variabilidad que presenta el microsatélite en los diferentes individuos.

2.2.7. ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat):

El sistema de marcador llamado Inter-secuencias repetitivas simples (ISSR por sus siglas en inglés), ha sido recientemente desarrollado (Gupta *et al.*, 1994; Zietkiewicz *et al.*, 1994; Godwin *et al.*, 1997). Estos primeros estudios se enfocaron en la identificación de variaciones genotípicas de planta con importancia en agricultura.

Los ISSRs son marcadores semiarbitrarios que se caracterizan por repeticiones de di o tri nucleótidos, formados por 4 a 10 unidades. Se basa en la PCR y busca detectar secuencias simples repetitivas (SSR) sin que se conozca las secuencias únicas que flanquean cada una de las SSR (Bornet y Branchard, 2001). Los microsatélites son cortos, usualmente poseen de 10 a 20 pares de bases, son hipervariables por lo que pueden llegar a expresar variaciones dentro de poblaciones y entre diferentes especies. Estudios de heredabilidad de locus ISSR han demostrado tener una excelente aproximación a las proporciones mendelianas (Tsumura *et al.*, 1996).

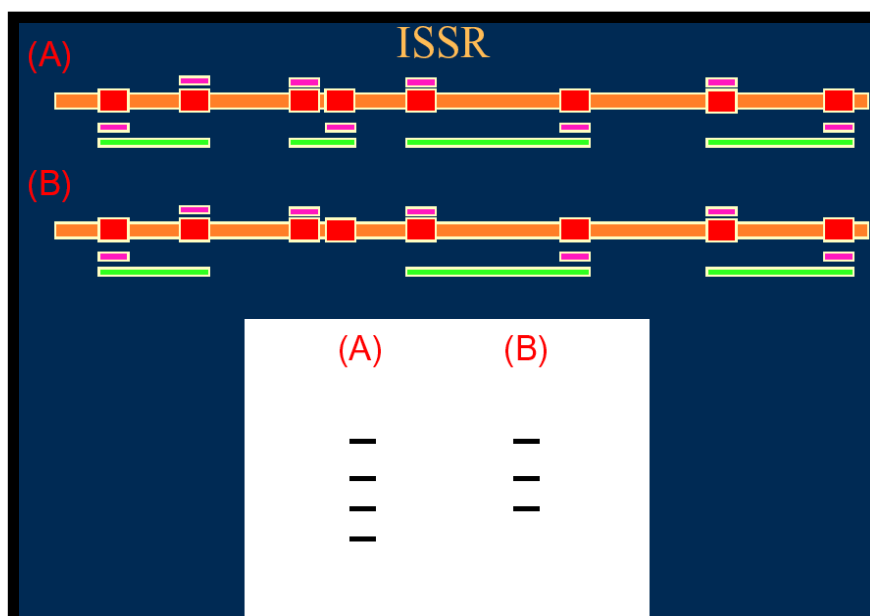


Figura 1. Esquema generación ISSRs.

Existen dos tipos de ISSRs, los no anclados y los anclados. Los primeros son llamados microsatellite-primer PCR o MP-PCR (Meyer *et al.*, 1993) y se caracterizan por no tener un ancla (secuencia conocida de nucleótidos) en el extremo 3' o 5'. Los anclados en cambio utilizan primers que presentan una adición de una secuencia no repetitiva en el extremo 3' o en el 5' con el fin de mejorar la especificidad de la reacción.

Esta técnica se basa en tres principios: (1) cualquier secuencia repetitiva se encuentra extensamente representada dentro del genoma, (2) las copias adyacentes de una repetición particular estarán en la orientación inversa a una distancia de amplificación por PCR (entre 2 y 3 Kb); y (3) el polimorfismo detectable resultará de inserciones o deleciones entre las repeticiones o la variación conservada de la secuencia en un sitio (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Los ISSRs presentan una alta variabilidad y una alta densidad de mapeo comparado con los RFLPs y los RAPDs, lo cual es ideal para producir mapas genéticos (Nagaoka y Ogiwara, 1997). Estas características, además de su gran robustez en experimentos repetitivos, su baja inclinación a cambios en el patrón de las bandas de acuerdo a concentración de ADN o cambios en sus constituyentes, su rapidez en la utilización y fácil manejo, hacen ha ésta técnica superior a otros marcadores en investigación de variación genética (Fang y Roose, 1997).

Los ISSRs son una herramienta adecuada para la documentación de la variabilidad genética en plantas gimnospermas (Tsumura *et al.*, 1996). También con esta técnica se pueden observar patrones de hibridización en poblaciones vegetales naturales (Wolfe *et al.*, 1998). Se ha llegado a estudiar la variación individual y poblacional de invertebrados marinos (Abbot, 2001). En camarones esta técnica ha sido utilizada para la detección de marcadores ligados a resistencia en IHHNV en *Litopenaeus stylirostris* (Hizer *et al.*, 2002) y para la identificación individual y correlación con el crecimiento en *L. vannamei* (Zhinaula, 2002).

2.2.8. Análisis de poblaciones en camarones

Los estudios realizados en poblaciones de camarón han mostrado resultados discrepantes en cuanto a variabilidad y diferenciación genética. Una buena cantidad de trabajos se basan en la técnica de isoenzimas en los cuales se ha observado en general bajos niveles de variación genética. Dentro de las especies estudiadas se encuentran: *Farfantepenaeus aztecus* (Lester, 1979; Ball *et al.*, 1998), *Fenneropenaeus chinensis* (Tam y Chu, 1993), *Farfantepenaeus*

duorarum (Lester, 1979, 1983; Ball *et al.*, 1998), *Penaeus monodon* (Muller y Latter, 1980; Benzie *et al.*, 1992, 1993; Tam y Chu, 1993; Benzie, 1999, 2000; Sugama *et al.*, 2002), *Fenneropenaeus merguensis* (Muller y Latter, 1980; Tam y Chun, 1993), *Litopenaeus schmitti* (Espinosa *et al.*, 2002), *L. vannamei* (Lester, 1983; Sunden y Davis, 1991; García *et al.*, 1994; De la Rosa-Vélez *et al.*, 1999, 2000), *Farfantepenaeus californiensis* (De la Rosa-Vélez *et al.*, 2000), *L. stylirostris* (Lester, 1983; De la Rosa-Vélez *et al.*, 2000).

En los estudios realizados con *P. monodon* se han observado diferencias en el grado de variabilidad genética de acuerdo a la técnica utilizada para el análisis. Benzie *et al.* (1992) encontraron una variabilidad genética con heterocigosidades entre 0,045 y 0,103 en poblaciones australianas de camarón a través de la técnica de isoenzimas. Por otro lado, se ha detectado diversidad genética (F_{st} 0,010, $p < 0,01$), de esta especie en grupos de Australia a través de microsatélites (Brooker *et al.*, 2000).

Por medio de la técnica de isoenzimas se ha detectado estructura de población en otras especies de camarón. En un estudio realizado en el Golfo de California con las especies *F. californiensis* y *L. stylirostris* se estableció una diferenciación entre las dos especies y dentro de las poblaciones de cada especie con valores de F_{st} de 0,182 y 0,372 respectivamente (De la Rosa-Vélez *et al.*, 2000).

En varias especies de Peneidos a través de RFLPs (García *et al.*, 1994), RAPDs (García *et al.*, 1994; García y Benzie, 1995; Aubert y Lightner, 2000;) y microsatélites (Lester, 1979; García *et al.*, 1996; Tassanakajon *et al.*, 1997; Ball *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2001; Cruz *et al.*,

2002; Espinosa, 2002; Tong *et al.*, 2002), se ha encontrado un alto polimorfismo, lo cual hace a estas técnicas útiles para la determinación de grados de parentesco entre individuos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Los camarones utilizados para el presente estudio fueron obtenidos a través de la compra de animales silvestres reproductores a nivel de playa en cuatro Provincias de la costa ecuatoriana y un grupo de juveniles del Estero Real en Nicaragua (Figuras 2 y 3). El número de animales recolectados en cada zona de muestreo estuvo comprendido entre 39 y 56 animales, con un peso promedio de $45,8 \text{ g} \pm 15,8 \text{ g}$ (Tabla 1).

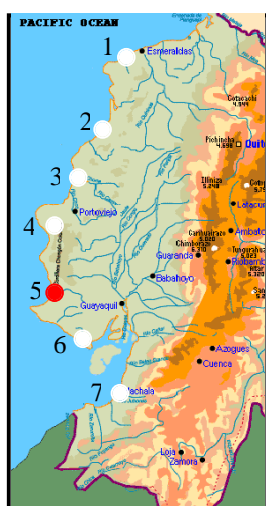


Figura 2. Ubicación de las zonas de recolección a través de la costa ecuatoriana (1 Atacames; 2 Pedernales; 3 San Clemente; 4 Puerto de Cayo; 5 San Pablo; 6 Posorja y 7 Machala).



Figura 3. Ubicación de la zona de recolección de la muestra en el Estero Salado, Nicaragua

Tabla 1. Localización geográficas de las zonas de muestreo

Localidad	Provincia	Coordenadas	Número animales	Peso promed. (g)
Atacames	Esmeraldas	79° 50' Longitud Oeste 0° 52' Latitud Norte	52	33,9 ± 6,9
Pedernales	Manabí	80° 02' Longitud Oeste 0° 04' Latitud Norte	39	39,5 ± 9,6
San Clemente	Manabí	80° 35' Longitud Oeste 0° 45' Latitud Sur	56	45,0 ± 8,5
Puerto de Cayo	Manabí	80° 50' Longitud Oeste 1° 20' Latitud Sur	50	45,0 ± 6,5
San Pablo	Guayas	80° 52' Longitud Oeste 2° 08' Latitud Sur	50	56,3 ± 12,3
Posorja	Guayas	80° 15' Longitud Oeste 2° 40' Latitud Sur	50	52,0 ± 13,8
Machala	El Oro	79° 55' Longitud Oeste 3° 12' Latitud Sur	52	44,2 ± 13,7
Estero Real	Nicaragua	87° 50' Longitud Oeste 13° Latitud Norte	50	----

Una vez recolectados los animales fueron colocados en alcohol absoluto para ser transportados al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) hasta la realización de las extracciones de ADN.

3.2. EXTRACCIÓN DE ADN

La toma de muestra para la extracción del ADN fue del músculo abdominal (0,2 g aproximadamente). Para la extracción se utilizó una modificación del método de CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) (Shahjahan *et al.*, 1995). Se colocó el tejido en una mezcla de 500 µL de buffer CTAB (0,1 M tris-base pH 8; 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA; 2% (w/v) CTAB) y 5 µL de proteinasa K (20 µg/mL). Las muestras se incubaron a 55 °C por 3 horas. La extracción se realizó con el método de fenol-cloroformo (1:1). El ADN fue precipitado con etanol 100% y luego lavado con etanol al 70%. Finalmente, se disolvió el

pellet en agua milliQ autoclavada y se procedió a determinar la concentración por espectrofotometría. Se realizó una dilución 1/20 para la lectura en el espectofotómetro (Gene Quant, PHARMACIA). De acuerdo a las lecturas obtenidas se procedió a realizar las correspondientes diluciones para tener una concentración aproximada de 20 ng/ μ L. Este material permaneció a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizado en las amplificaciones de los ISSRs.

3.3. ISSRs

Los ISSRs se obtuvieron mediante la siguiente metodología. Se realizó un master mix para un volumen final de reacción de 13 μ L con los siguientes componentes: Buffer PCR (Promega[®]), MgCl_2 (Promega[®]), dNTPs (Promega[®]), primers ISSR (elaborados en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Columbia Británica, Canadá) y Taq polimerasa (Promega[®]) (Tabla 2).

Tabla 2. Reactivos utilizados en la obtención de ISSRs.

Reactivo	Concentración original	Concentración final (μM)	Volumen (μL)
Agua			9,68
10 X PCR buffer	10 X	1X	1,36
MgCl_2	25 mM	2,5	1,36
dNTPs	10 mM	0,2	0,27
Primer ISSR	30 μM	0,6	0,22
TAQ	5 U / μL	5	0,11
DNA	20 ng/ μL		1,5

Se adicionó la muestra de ADN y se procedió con la amplificación en cualquiera de los siguientes termocicladores: PTC 200 MJ Research, Techne Genius y Ericom Delta Cycle I. El programa de amplificación utilizado fue: $92\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos, 34 ciclos con $92\text{ }^{\circ}\text{C}$ por

40 segundos, 55 °C por 40 segundos y 72 °C por 40 segundos. Finalmente se realizó una extensión a 72 °C por 5 minutos.

3.4. GEL DE POLIACRILAMIDA

Para la elaboración del gel de poliacrilamida no denaturante al 5% se utilizó acrilamida y bisacrilamida en una proporción 29:1; TAE 1X (40mM Tris base, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA), Persulfato de amonio (10%) y TEMED. Dicha mezcla se colocó entre dos vidrios con un espacio de 1 mm y se dejó polimerizar por 2 horas. Las muestras fueron mezcladas con tampón de carga 6X (0,25% de Azul de Bromofenol, 0,25% de Xileno cianol y 40% (w/v) de sucrosa en agua destilada) y fue depositado un volumen de 10 mL en el gel.

Dos secuenciadores manuales, modelo S2 (Life Technologies Gibco BRL) y modelo S3S (Owl) fueron utilizados para realizar las corridas. Los geles fueron precorridos a 1.000 voltios por media hora en presencia de tampón TAE 1X y 0,5 X y la corrida se realizó entre 600 y 800 voltios por seis horas.

3.5. TINCIÓN DE PLATA

La tinción de los geles se realizó de acuerdo a la metodología de Dinesh *et al.* (1995), siguiendo cinco pasos: fijación, impregnación, lavado, revelado y stop. Para cada uno de los pasos se preparó una solución (ver Tabla 3), con un volumen final de 1,5 L. Se

reutilizaron las soluciones dos veces. Una vez revelada las bandas se procedió al secado del gel a temperatura ambiente y preservación del material cubriendo el gel con una lamina de acetato.

Tabla 3. Composición de las soluciones para tinción de plata y tiempo requerido.

PASO	SOLUCION	TIEMPO (min)
Fijación	10 % Etanol + 5% Ácido Acético	15
Impregnación	0,011 M Nitrato de plata	25
Lavado	Agua desionizada	1
Revelado	0,75 M NaOH + 0,085 M Formaldehído	10-15
Stop	0,07 M Carbonato de Sodio	5

3.6. FOTOGRAFÍA Y DOCUMENTACIÓN

La fotografía de los geles se realizó sobre un caja de luz blanca, con una cámara Kodak DC120 y el programa EDAS (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120, Kodak®).

3.7. EVALUACIÓN DE REPRODUCIBILIDAD DE ISSRs

Se realizó una prueba con seis primer 834, 835, 841, 861, 862, 867 (Tabla 4) y se corrió el PCR a una temperatura de alineación de 55 °C. Se trabajaron muestras por duplicado de cada individuo y blancos (agua milliQ autoclavada). De acuerdo a los resultados obtenidos

se escogieron los primers 861 y 862. El criterio de selección se basó en la amplificación, reproducibilidad, número y definición de bandas.

Tabla 4. Secuencia de primers utilizados.

Primer	Secuencia
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC
861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC
862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC
867	GGC GGC GGC GGC GGC GGC

Una vez escogido los dos primers a utilizarse, se procedió a realizar ajustes en las condiciones de PCR, en cuanto a temperatura de alineación y concentración del primer. Se trabajó con tres temperaturas de alineación (50, 55 y 60 °C) y tres concentraciones del primer (0,4, 0,6 y 0,8 μM). Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 5%. Finalmente, se escogió una temperatura alineación de 55°C y una concentración del primer de 0,6 μM , como las óptimas para realizar el análisis.

3.8. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Los perfiles generados fueron analizados bajo el software 1D versión 3.0 1999 (Eastman Kodak Company, EE.UU). Para ello se localizaron las bandas manualmente para cada individuo teniendo en cuenta la comparación de la muestra original y su réplica, observando la presencia de los picos en ambas (Figura 4). El tamaño de las bandas se calculó tomando como referencia dos marcadores de talla de 1 Kb, en un rango entre 1500 bp y 400 bp. Los datos fueron exportados a una hoja de cálculo de Excel y ordenados de

acuerdo al tamaño de las bandas. Se consideró como una sola banda aquellos datos que presentaron una desviación estándar inferior a 10 unidades. Finalmente se creó una matriz binaria con los valores de 1 (presencia de banda) y 0 (ausencia de banda). Estas matrices fueron elaboradas para cada uno de los primers por separado y una en la cual se combinaron individuos que fueron analizados con los dos primers (ver anexos).

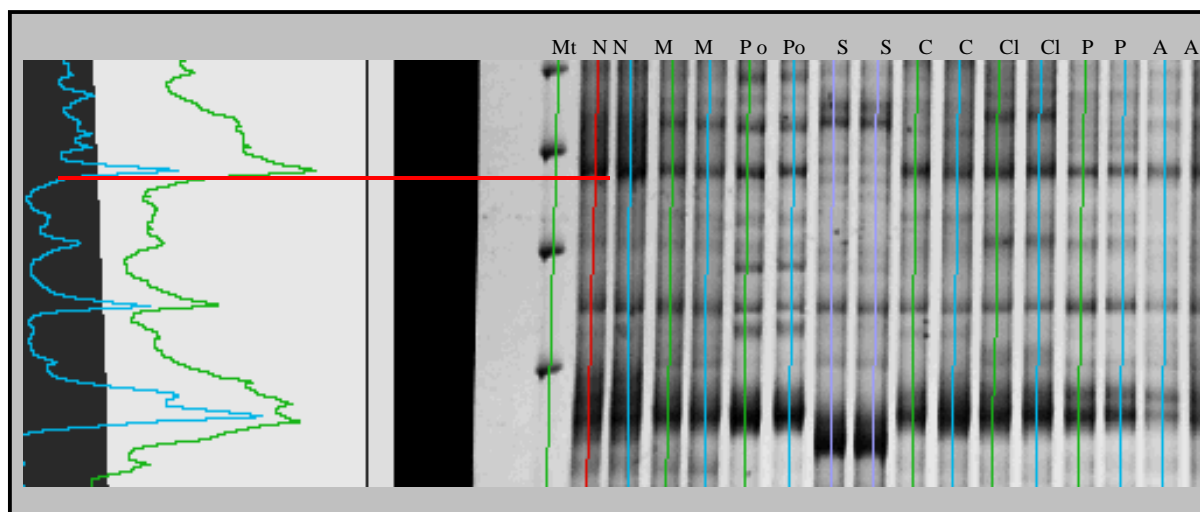


Figura 4. Análisis de los perfiles generados a partir de réplicas (Mt: Marcador de talla, N: Nicaragua, M: Machala, Po: Posorja, S: San Pablo, C: Puerto de Cayo, Cl: Clemente, P: Pedernales, A: Atacames).

3.8.1. Análisis Estadístico para variabilidad dentro de las poblaciones.

Usando el software POPGENE versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) se obtuvieron el Coeficiente de Diferenciación de Nei (G_{st}) y Gene Flow (N_m) para cada una de las matrices. Los valores de Heterocigosidad y Polimorfismos (95%) fueron obtenidos con el programa TFPGA (Tools for Population Genetic Analyses) versión 1.3 (Miller, 1997). El análisis de varianza molecular (AMOVA) bajo el método de Excoffier *et al.* (1992) fue generado a

través de la matriz de distancia genética modificada de Nei (1978), con un número de 5000 permutaciones en el programa GenAlEx V 5 (Peakall y Smouse, 2001). Para dicho análisis se tomaron en cuenta los grupos de las localidades de la costa ecuatoriana (6). Se analizaron diferencias entre poblaciones y entre individuos dentro de poblaciones.

3.8.2. Análisis Estadístico para diferenciación entre poblaciones.

Los índices utilizados para observar la variabilidad genética entre poblaciones y regiones fueron: la distancia genética modificada de Nei (1978), agrupamiento de pares con promedios aritméticos (Unweighted pair-group mean analysis, UPGM por sus siglas en inglés) con los respectivos dendogramas y el índice fijación F_{st} . Estos índices fueron computados bajo el programa TFPGA (Tools for Population Genetic Analyses) versión 1.3 (Miller, 1997).

La matriz generada de distancia genética fue utilizada para la elaboración de los dendogramas a través de UPGMA (Miller, 1997). Para ello se aplicó bootstrapping con 5000 permutaciones.

La identidad entre dos poblaciones se definió mediante la fórmula:
$$I_k = \frac{\sum a_i b_i}{(\sum a_i^2 b_i^2)^{0,5}}$$

Donde: I_k = identidad de diferentes loci para el gen “k”

a_i = frecuencia del alelo “i” en la primera población

b_i = frecuencia del alelo “i” en la segunda población

La distancia genética entre dos poblaciones se mide mediante la fórmula: $D = 1 - I$

Donde: D= distancia genética

I = identidad promedio

El índice de fijación fue calculado para los seis grupos de la costa ecuatoriana, con la

fórmula: $F_{st} = \frac{(H_t - H_s)}{H_t}$

Donde: F_{st} = índice de fijación

H_t = Heterocigosidad esperada con cruzamiento al azar en una metapoblación

H_s = Heterocigosidad esperada con cruzamiento al azar en una subpoblación

4. RESULTADOS

4.1. VARIABILIDAD GENÉTICA DENTRO DE LAS POBLACIONES

Al realizar las corridas con los dos primers por duplicado se pudo comprobar la reproducibilidad de la técnica en todas las muestras (Figura 5). Los perfiles obtenidos de las muestras recolectadas en San Pablo fueron diferentes al resto de los animales de las otras siete zonas. Se presume que eran animales de cultivo (observación de todos los espermátóforos vacíos), por lo que estos resultados no se tuvieron en cuenta en este estudio.

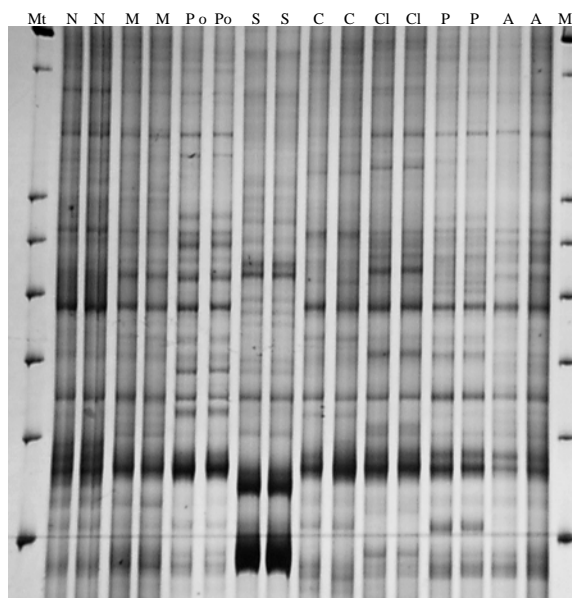


Figura 5. Perfil de ISSRs analizando los ocho grupos de animales (Mt Marcador de talla, N: Nicaragua, M: Machala, Po: Posorja, S: San Pablo, C: Puerto de Cayo, Cl: Clemente, P: Pedernales, A: Atacames).

Un total de 399 muestras de ADN fueron corridas en los geles de poliacrilamida, de estas 126 generaron 46 bandas polimórficas con la utilización del primer 861 y 222 generaron 54

bandas polimórficas con el primer 862. Bajo cada uno de los primers se presentaron siete bandas monomórficas.

Los valores de heterocigosidad y polimorfismo con los criterios del 95% se presentan en las Tablas 5, 6 y 7. Los rangos de heterocigosidad estuvieron entre 0,23 y 0,28 con el primer 862, valores correspondientes a los animales provenientes de Pedernales y Machala, respectivamente (Tabla 5). Con el primer 861, se observaron en general valores más bajos de heterocigosidad, siendo el valor más alto reportado para los animales provenientes de Nicaragua (0,21) y el más bajo corresponde a San Clemente (0,14) (Tabla 6).

Tabla 5. Heterocigosidad y polimorfismo promedios de los animales silvestres de las siete localidades escogidas con el primer 862.

Localidad	Heterocigosidad promedio	Polimorfismo 95%
Atacames	0,25	79,6
Pedernales	0,23	72,2
San Clemente	0,24	81,4
Puerto de Cayo	0,25	81,4
Posorja	0,24	79,6
Machala	0,28	85,1
Nicaragua	0,25	77,7

Tabla 6. Heterocigosidad y polimorfismo promedios de los animales silvestres de las siete localidades escogidas con el primer 861.

Localidad	Heterocigosidad promedio	Polimorfismo 95%
Atacames	0,15	56,5
Pedernales	0,16	60,8
San Clemente	0,14	54,3
Puerto de Cayo	0,17	69,5
Posorja	0,16	69,5
Machala	0,15	50,0
Nicaragua	0,21	71,7

Cuando se analizaron los dos primers agrupados se mantuvo una heterocigosidad alta entre 0,19 y 0,27. Los animales de Pedernales continúan mostrando una baja heterocigosidad, pero la heterocigosidad más alta se encontró en Atacames (Tabla 7).

Tabla 7. Heterocigosidad y polimorfismo promedios de los animales silvestres de las siete localidades escogidas con el agrupamiento de los primers 861 y 862.

Localidad	Heterocigosidad promedio	Polimorfismo 95%
Atacames	0,27	82
Pedernales	0,19	67
San Clemente	0,20	70
Puerto de Cayo	0,20	74
Posorja	0,20	67
Machala	0,24	77
Nicaragua	0,25	69

Al evaluar el polimorfismo en las siete localidades se observa el mismo patrón (Tablas 5, 6 y 7). Donde se presentan las mas altas heterocigosidades, se tiene el mayor porcentaje de

polimorfismo al 95% y viceversa. Se tuvo una excepción con los animales de Machala que presentaron el polimorfismo más bajo (50%) y el segundo valor más bajo de heterocigosidad (0,15) con el primer 861. Los porcentajes de polimorfismo promedio más altos (71,7%, 85,1% y 82%) fueron encontrados en los animales provenientes de Nicaragua, Machala y Atacames a través de los perfiles obtenidos con los primers 861, 862 y el agrupamiento, respectivamente.

El índice de diferenciación genética de Nei (G_{st}) fue de 0,04, 0,02 y 0,36 y la estimación del gene flow de 12,56, 20,15 y 88,7%, para los primers 861, 862 y el agrupamiento, respectivamente.

Los resultados de distancia genética para las siete zonas de muestreo bajo los dos primers y el agrupamiento se muestran en las Tablas 8, 9 y 10. Las distancias encontradas entre los siete grupos fueron mínimas. Los valores máximos fueron de 0,009 entre Nicaragua y Atacames bajo el primer 861 (Tabla 8), 0,005 entre Pedernales y Machala con el primer 862 (Tabla 9) y 0,028 entre Atacames y Nicaragua bajo el agrupamiento de los dos primers (Tabla 10).

Tabla 8. Distancias genéticas de los animales silvestres de las localidades de Atacames (1), Puerto de Cayo (2), Machala (3), Posorja (4), San Clemente (5), Pedernales (6) y Nicaragua (7) obtenidas con el primer 861.

Distancia No sesgada Nei (1978)						
Población	1	2	3	4	5	6
1	*****					
2	0,0014	*****				
3	0,0002	-,0008	*****			
4	0,0071	0,0048	0,0036	*****		
5	0,0006	0,0021	0,0012	0,0032	*****	
6	0,0039	-,0005	0,0008	-,0019	-,0008	*****
7	0,0094	0,0063	0,0051	0,0008	0,0080	0,0018

Tabla 9. Distancias genéticas de los animales silvestres de las localidades de Atacames (1), Puerto de Cayo (2), Machala (3), Posorja (4), San Clemente (5), Pedernales (6) y Nicaragua (7) obtenidas con el primer 862.

Distancia No sesgada Nei (1978)						
Población	1	2	3	4	5	6
1	*****					
2	-,0016	*****				
3	0,0016	0,0036	*****			
4	0,0042	0,0029	0,0019	*****		
5	0,0011	-,0003	0,0026	0,0010	*****	
6	0,0033	0,0030	0,0057	0,0009	-,0007	*****
7	0,0024	0,0020	0,0031	0,0022	0,0027	0,0033

Tabla 10. Distancias genéticas de los animales silvestres de las localidades de Atacames (1), Puerto de Cayo (2), Machala (3), Posorja (4), San Clemente (5), Pedernales (6) y Nicaragua (7) obtenidas con el agrupamiento de los primers 861 y 862.

Distancia No sesgada Nei (1978)						
Población	1	2	3	4	5	6
1	*****					
2	0,0160	*****				
3	0,0166	0,0017	*****			
4	0,0221	0,0045	0,0048	*****		
5	0,0196	0,0045	-,0013	0,0076	*****	
6	0,0203	0,0057	0,0030	0,0040	0,0051	*****
7	0,0289	0,0114	0,0092	0,0082	0,0185	0,0129

De acuerdo a las distancias de Nei modificadas (1978) obtenidas se generaron los respectivos dendogramas (Figuras 6, 7 y 8). Los agrupamientos generados fueron diferentes para las tres matrices. Solamente las localidades de Pedernales y San Clemente se agruparon en un nodo en los tres dendogramas con distancias mínimas.

El primer 861 generó un dendograma (Figura 6), en el cual los animales de Posorja y Machala, así como los de Pedernales y San Clemente se agrupan bajo una distancia mínima y los animales provenientes de Puerto de Cayo y Nicaragua forman el grupo mas separado.

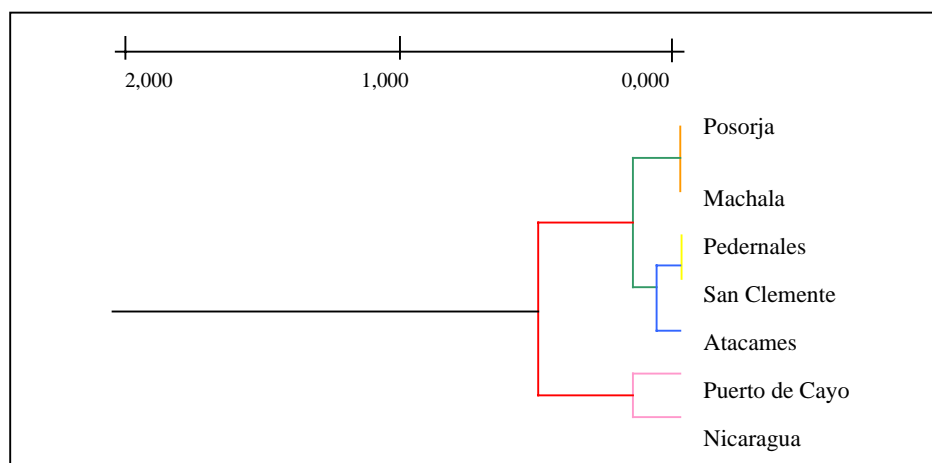


Figura 6. Dendograma generado a partir de distancias genéticas modificadas de Nei (1978) bajo el primer 861.

En la figura 7 se observa el agrupamiento generado con UPGMA para el primer 862. El grupo que esta mas alejado está conformado por los animales de Machala. Además se observaron nodos formados por San Clemente y Pedernales por una parte y Puerto de Cayo y Atacames con distancias genéticas mínimas.

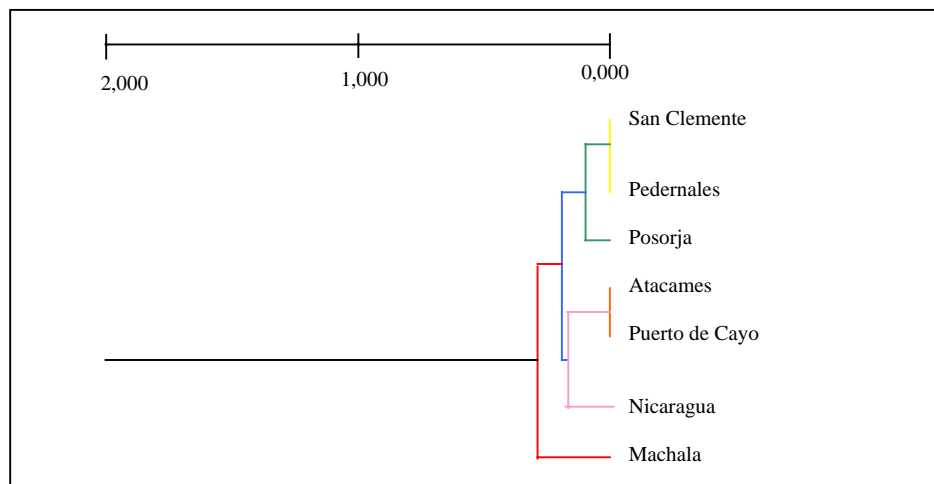


Figura 7. Dendrograma generado a partir de distancias genéticas modificadas de Nei (1978) bajo el primer 862.

Atacames y Nicaragua generaron las distancias más grandes al analizar el agrupamiento de los dos primeros, formando dos nodos separados del resto de los grupos (Figura 8). Los cuales se agruparon en un nodo conformado por Machala y Posorja y otro por Puerto de Cayo, San Clemente y Pedernales.

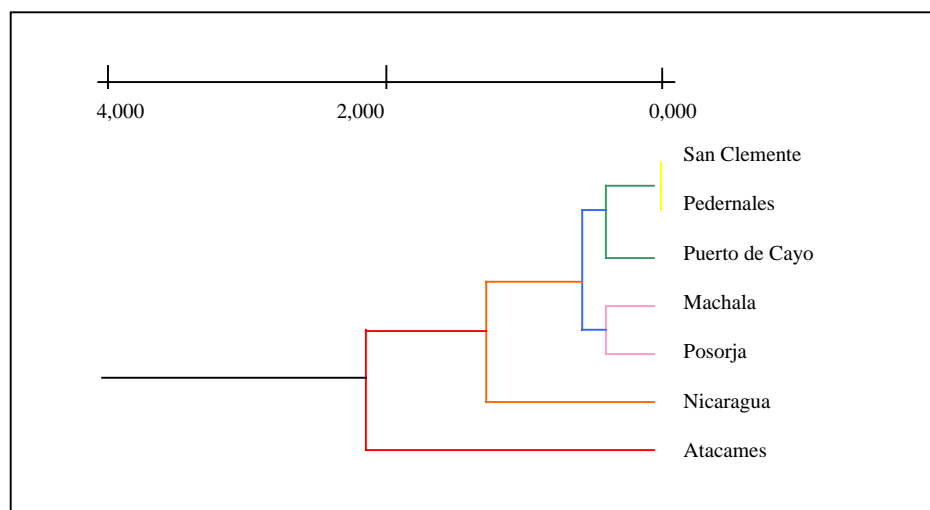


Figura 8. Dendrograma generado a partir de distancias genéticas modificadas de Nei (1978) al agrupar los primeros 861 y 862.

4.2. VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE POBLACIONES

El valor de F_{st} sobre todos los loci al analizar los seis grupos de la costa ecuatoriana fue de 0,009 utilizando 5000 replicas mediante bootstrapping y el límite de confianza al 95% estuvo entre 0,002 y 0,023 para el primer 861. El primer 862 generó un F_{st} de 0,006 y un intervalo de confianza al 95% entre 0,002 y 0,011. Al hacer el agrupamiento de los primers se presentó un F_{st} de 0,031 con un intervalo entre 0,013 y 0,051.

Los resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) mostraron una variación genética del 1% entre poblaciones a través de los primers 861 y 862 pero no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$), con un residuo de la variación del 99% dado para individuos dentro de cada uno de los seis grupos de la costa ecuatoriana para cada uno de los primers (Figuras 9 y 10, Tablas 11 y 12). Sin embargo, no se observó diferencia entre poblaciones bajo la combinación de los dos primers (Figura 11 y Tabla 13).

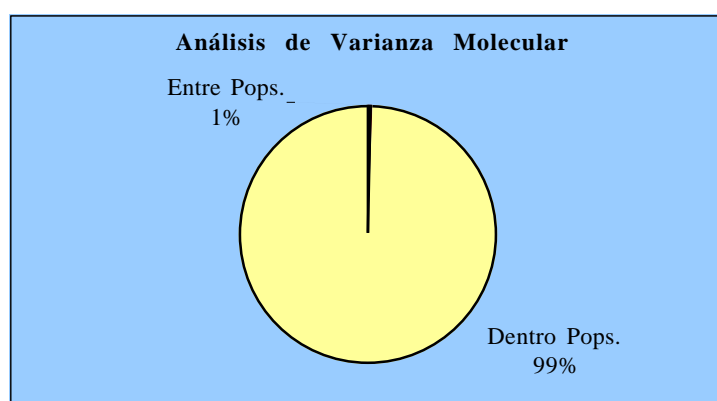


Figura 9. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los ISSRs generados con el primer 861 de las seis localidades en estudio.

Tabla 11. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los ISSRs generados con el primer 861 de las seis localidades en estudio.

Tabla Resumen							
Fuente	df	SS	MS	Est. Var.	Stat	Valor Prob	
Entre Pops.	5	29.896	5.979	0.033	PhiRT	0.009	0.231
Dentro Pops.	90	490.375	5.449	5.449	PhiPT	0.006	0.193

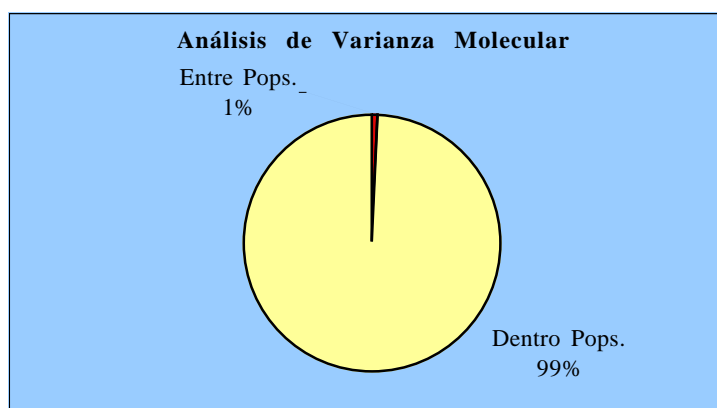


Figura 10. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los ISSRs generados con el primer 862 de las seis localidades en estudio.

Tabla 12. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los ISSRs generados con el primer 862 de las seis localidades en estudio.

Tabla Resumen							
Fuente	df	SS	MS	Est. Var.	Stat	Valor Prob	
Entre Pops.	5	53.097	10.619	0.068	PhiRT	0.010	0.345
Dentro Pops.	155	1364.866	8.806	8.806	PhiPT	0.008	0.055

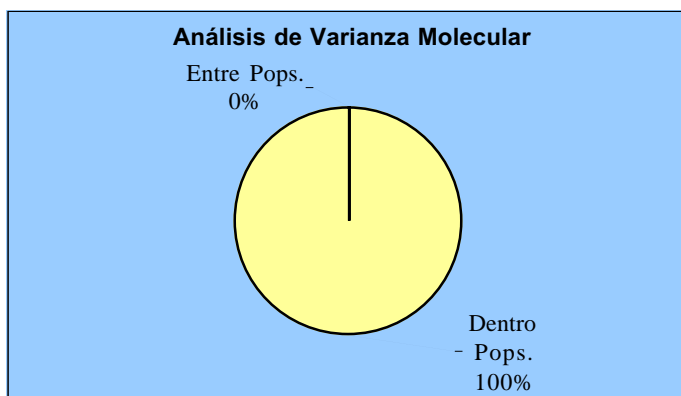


Figura 11. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los ISSRs generados al agrupar los primers 861 y 862 de las seis localidades en estudio.

Tabla 13. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los ISSRs generados al agrupar los primers 861 y 862 de las seis localidades en estudio.

Tabla Resumen							
Fuente	df	SS	MS	Est. Var.	Stat	Valor Prob	
Entre Pops.	5	69.874	13.975	0.000	PhiRT	0.000	0.875
Dentro Pops.	46	686.588	14.926	14.926	PhiPT	0.000	0.752

5. DISCUSIÓN

La diversidad genética se define como la variedad de diferentes genes en una población reproductiva, dentro de una especie o dentro de todas las especies encontradas en un área dada. Los reportes que se tienen sobre diversidad genética de camarones son muy variables. Muchas de estas variabilidades se deben al poder de detección de frecuencias alélicas generadas a través de marcadores genéticos e igualmente al tamaño de la muestra y el número de loci estudiados (número de individuos entre 1 y 200, mas común entre 20 y 60 por población y el número de loci de 1 a 40 el mas común entre 15 y 35) (Benzie, 2000).

En general, los trabajos con isoenzimas para estudios de poblaciones de camarón muestran una baja variabilidad genética. Por ejemplo, Lester (1979) reportó heterocigosidades entre 0,070 y 0,089 para las especies *F. aztecus*, *F. duorarum* y *L. setiferus* del Golfo de México. Similares resultados han sido confirmados en estudios posteriores. Muller y Latter (1980) reportan valores de heterocigosidad entre 0,006 y 0,033 en poblaciones de *Penaeus* de Australia (cuatro especies de *Metapenaeus* y seis de *Penaeus*), Richardson (1982) encontró un promedio de heterocigosidad de 0,028 en seis poblaciones de *Penaeus laticulatus* y Tam y Chu (1993) encontraron heterocigosidades entre 0,007 y 0,049 en algunas especies de *Penaeus* y *Metapenaeus*. De la Rosa-Vélez *et al.* (2000) observaron en *F. californiensis* y *L. stylirostris*, rangos de heterocigosidad entre $0,023 \pm 0,014$ y $0,037 \pm 0,012$ y entre $0,038 \pm 0,021$ y $0,086 \pm 0,027$, respectivamente.

La técnica de isoenzimas para el análisis de poblaciones presenta limitaciones en cuanto al número de loci analizados, ser evolucionariamente conservadora y tener un efecto de balance de selección que tiende a producir baja estimación sobre la variabilidad genética y como resultado se elaboran conclusiones de panmixia (existe apareamiento al azar y no hay diferenciación de poblaciones) en los grupos objeto de estudio (Clegg, 1989; Karl y Avise, 1992; Peakall *et al.*, 1995). Estas limitaciones fueron evidenciadas en el estudio realizado por Lester y Pante (1992) en camarones *L. stylirostris* del Ecuador y México y comparar las técnicas de isoenzimas con RFLPs. Ellos concluyen que características electroforéticas no llegan a demostrar diferenciación entre poblaciones naturales frente a técnicas más sensibles como los RFLPs al encontrar un nivel estructural.

El uso de otras técnicas para el estudio de poblaciones de camarón ha demostrado resultados diferentes en cuanto a variabilidad y se llega a observar una estructura de la población. Tal es el caso de ADN mitocondrial a nivel de microescala geográfica, en especies de *P. monodon* ($\chi^2 = 7.23$, $p < 0.05$) (Benzie *et al.*, 1993), *F. notialis* y *L. schmitti* (divergencia del 11%) (Machado *et al.*, 1993).

Con la utilización de la técnica de RAPDs se observan también grandes variaciones. Aubert y Lightner (2000) en sus estudios en *L. stylirostris* en el Golfo de California a través de RAPDs observaron un 15% de variación entre poblaciones, opuestos a estudios como los de Alcívar-Waren *et al.* (1994), García *et al.* (1994), Lynch y Milligan (1994), García y Benzie (1995), Tassanakajon *et al.* (1997) donde no se observan evidencias suficientes de una estructura poblacional. Esta diferencia es discutida por Aubert y Lightner (2000) al

concluir que interpretaciones cualitativas de RADPs son inapropiadas para evaluar variabilidad genética.

En este estudio utilizando la técnica de ISSR también se observó una baja variabilidad genética en *L. vannamei*, pero con unos valores altos de heterocigosidad y polimorfismo. La heterocigosidad es importante en poblaciones naturales, debido a su característica de aportar un gran espectro de genotipos para responder adaptativamente a cambios en las condiciones del medio. Adicionalmente individuos con mayores heterocigosidades, por lo general, son superiores en fertilidad y resistencia de enfermedades (Beardmore *et al.*, 1997). Los valores de heterocigosidad de este trabajo son altos comparados con trabajos en *L. vannamei* bajo la técnica de isoenzimas. Lester (1983) reportó heterocigosidades de 0,02 en poblaciones de Costa Rica. Sunden y Davis (1991) estudiaron poblaciones domesticadas de México, Panamá y Ecuador observando heterocigosidades de 0,0173, 0,0172 y 0,0208 respectivamente. García *et al.* (1994) reportan como valor inusual de heterocigosidad 0,064, al compararlo con el porcentaje de polimorfismo obtenido para una población de camarones del Ecuador bajo la técnica de RADPs (48%) y lo explican como una presión de selección de las isoenzimas. Dicha presión de selección puede estar presente en la técnica de ISSRs y expresar altas heterocigosidades. Rangos de heterocigosidad reportados por Espinosa *et al.* (2002) para isoenzimas (0,26 y 0,35) y para microsatélites (0,54 y 0,70) son valores altos. Sin embargo, hay que anotar que esos análisis fueron realizados solo tomando en cuenta los loci polimórficos en cuyo caso el valor de heterocigosidad no es verdadero por no tomar en cuenta los loci tanto polimórficos como los monomórficos para estimar frecuencias alélicas (Hartl y Clark, 1997).

Con el primer 861 los valores de heterocigosidad se ubicaron entre 0,14 y 0,21. Esos valores se acercan a los valores de 0,11 y 0,14 encontrados para animales silvestres de *L. vannamei* de la costa ecuatoriana a través de RADPs (Pérez, 1999). Ese estudio utilizó una técnica diferente de separación de bandas mediante geles de agarosa, en los la separación de los fragmentos de ADN de acuerdo a tamaños de pares de bases es mas amplia, por lo que la variabilidad evaluada pudo ser mucho más alta.

Los cambios observados en la heterocigosidad, valores altos (entre 0,23 y 0,28) con el primer 862 y bajos (entre 0,14 y 0,21) con el primer 861, pueden deberse a la naturaleza del primer como lo observan Jorde *et al.* (1997). Al evaluar poblaciones humanas a través de microsatélites consistentes de repeticiones de tri o tetranucleótidos (Short Tandem Repeats, STRs), ellos observaron que a pesar de obtener resultados cuantitativos similares con repeticiones de dinucleótidos (Repeticiones de Citosina-Adenina, CA) y STRs, los valores de F_{st} detectados con los STRs son mas bajos que con los CA y no alcanzan a detectar una estructura en la población (Jorde *et al.*,1997).

Se ha observado una correlación entre la heterocigosidad y el fitness (aptitud), la cual es entendida como la capacidad reproductiva de un genotipo en el caso de Peneidos (Bierne *et al.*, 2000). Si se presenta un carácter que favorezca un genotipo dado, que en nuestro caso es heterocigosidad, se esperarían valores altos, lo que se observó en este estudio.

Bajo la técnica de ISSR no se puede llegar más que a una estimación matemática de heterocigosidades debido a su carácter dominante (Wolfe y Liston, 1998). Igualmente los

ISSRs podrían amplificar zonas del genomio específicas y no en forma randómica como se asume para el caso de microsátélites (Collick y Jeffreys, 1990). Los valores de heterocigosidad de este estudio deberán ser confirmados a través de otras técnicas en las que se tenga en cuenta la codominancia.

El porcentaje de polimorfismo obtenido en este estudio entre 50 y 85,1% está dentro del rango de estudios realizados en *L. vannamei*, *P. monodom* y *L. schmitti*. García *et al.* (1994) bajo la utilización de RAPDs reportaron entre 39% y 77% de bandas polimórficas. Tassanakajon *et al.* (1997) reportaron 57.1% y Espinosa *et al.* (2002) reportan un 87,5% de polimorfismo. Si se comparan estos resultados de polimorfismo con estudios en los cuales se utilizaron isoenzimas (Lester, 1979; Muller y Latter, 1980; Harris *et al.*, 1990; Sunden y Davis, 1991; Benzie *et al.*, 1992; García *et al.*, 1994; De la Rosa-Vélez *et al.*, 2000; Sugama *et al.*, 2002) se observan porcentajes de polimorfismo superiores (mayores del 50%) en el caso de ISSRs. Las isoenzimas son marcadores presumiblemente sujetos a selección natural por lo cual su polimorfismo es más bajo que los ISSRs que son marcadores neutrales.

Las distancias genéticas encontradas al comparar los diferentes puntos de muestreo revelaron ser mínimas. Solo cuando se analizaron la combinación de los dos primers se presentaron las mayores distancias entre 0,016 y 0,028 con las cuales se separaron las localidades de Nicaragua y Atacames (Norte de la costa Ecuatoriana). Dichas distancias están dentro del rango de lo encontrado por Pérez (1999) para poblaciones del Guayas versus Esmeraldas (0,018) y Guayas versus Manabí (0,011). De la Rosa-Vélez *et al.* (2000)

al estudiar dos especies de *Penaeus* encontraron que existe una clara subdivisión entre *F. californiensis* y *L. stylirostris* dentro del Golfo de California al encontrar una variación considerable en las distancias genéticas para cada una de las especies. Reportan para *F. californiensis* distancias pequeñas entre 0,003 y 0,012 comparadas con 0,047 y 0,074 para *L. stylirostris*, atribuyendo la variabilidad de este último a su carácter costero frente al oceánico del primero, con lo cual no presenta las barreras que podrían impedir un flujo genético (De la Rosa-Vélez *et al.*, 2000). Se conoce que *L. vannamei* es una especie vágil que posee dos fases de dispersión: larval planctónica y adulta vagile (Lester, 1979). Esta característica favorece la similaridad entre grupos de individuos y puede explicar las distancias mínimas encontrados entre los animales de las diferentes localidades del estudio. *L. vannamei* es una especie costera (Dore y Frimodt, 1987) que se encuentra en aguas abiertas durante el apareamiento, sus larvas se ubican en los esteros y a nivel costero y en estado juvenil regresan al mar. Este tipo de ciclo de vida puede favorecer migraciones de individuos con lo que no se presentaría una alta diversidad genética, que es el caso observado en este estudio.

Los cluster (agrupamientos) aunque son indicativos de subdivisiones de la población, no representan demostraciones estadísticas de diferenciación entre grupos. Para ello es necesario el análisis de varianza molecular en la que se obtiene medidas de variación genética ϕ_{st} . Los dendogramas generados por cada uno de los primers presentaron un agrupamiento por nodos diferentes, lo cual hace suponer que los primers utilizados no aportaron la suficiente información para generar un nivel estructural para los grupos de animales estudiados como lo observan Jorde *et al.* (1997) al utilizar STRs en poblaciones

humanas. A partir del primer 862 no se presenta agrupamiento de acuerdo a la proximidad geográfica. Pudiéndose pensar que *L. vannamei* se encuentra dentro de especies que tienen un alto potencial de dispersión (Bert, 1986; Palumbi y Baker 1994) también indicado por los valores de flujo genético de 12,56 y 20,15 revelando que no hay una gran variabilidad entre poblaciones.

La estructura poblacional resulta de fuerzas evolutivas que actúan sobre las poblaciones aisladas, las cuales pueden ser barreras físicas, estructura dinámica o eventos biológicos (Ruzzante *et al.*, 1998). En este estudio no se pudo llegar a comprobar una estructura poblacional en *L. vannamei* tanto para los grupos que conforman el estudio en la costa ecuatoriana, al obtener valores bajos de F_{st} y no encontrar diferencias significativas bajo el análisis de varianza molecular (AMOVA). Los valores de F_{st} al analizar las seis localidades de la costa ecuatoriana de 0,009 , 0,006 y 0,031, para los primers 861, 862 y la combinación de los dos primers, respectivamente demuestran que no hay una diferenciación genética entre grupos de animales de las localidades estudiadas. Estos valores son bajos al compararlos con estudios en *F. californiensis* ($F_{st} = 0,182$), *L. stylirostris* ($F_{st} = 0,372$) (De la Rosa-Vélez *et al.*, 2000), y *F. notialis* ($F_{st} = 0,13$) (García-Machado *et al.*, 2001) y con los cuales se llegó a la conclusión de la existencia de una divergencia entre poblaciones de las especies mencionadas. En cambio en otras especies de Peneidos se han reportado baja o nula diferenciación poblacional. Espinosa *et al.* (2002) encontraron F_{st} entre 0,005 y 0,060 a través de isoenzimas y microsatélites en poblaciones de *L. schmitti* y Sévigny *et al.* (2000) en *Pandalus borealis* reportan F_{st} sobre todos los locus de 0,01.

En poblaciones silvestres de *L. vannamei* de la costa ecuatoriana se tiene un nivel de consanguinidad con un F_{st} de 0,08 a través de RADPs, con el que se concluye una incipiente estructura poblacional (Pérez, 1999). Dicho valor es superior a los valores encontrados en este estudio con ISSR y con los cuales no se puede revelar una estructura poblacional en *L. vannamei*.

En *P. monodon* se ha reportado una estructura poblacional al estudiar grupos de individuos a nivel de macroescala (> 1000 km) bajo la técnica de microsatélites y obteniendo unos valores de F_{st} de 0,031 ($p < 0,05$) y 0,010 ($p < 0,01$) (Benzie *et al.*, 1992; Brooker *et al.*, 2000). Aunque también se encuentran estudios con isoenzimas en los que no se detectan diferencia genética en poblaciones de camarón separadas por miles de kilómetros (Lester, 1979; Muller y Latter, 1980) y en los que se concluye que las especies son panmícticas. Esta diferencia se puede atribuir a las características reproductivas y ciclo de vida de las diferentes especies estudiadas.

En este trabajo se evaluaron muestras colectadas a lo largo de la costa ecuatoriana en puntos separados por una distancia máxima de 600 km. Los valores del AMOVA indican un valor de diferenciación del 1% para los primers 861 y 862 y resultados combinados para ambos primers muestran 0% de diferenciación entre las zonas de estudio. Este tipo de diferencias en valores de AMOVA han sido reportados por Maguire *et al.* (2002) en datos colectados con RAPDs y AFLPs en *Avicennia marina*. Ellos obtuvieron el 9% con la primera técnica y un 19% con la segunda y concluyeron diferenciación poblacional. Igualmente, Peakall *et al.* (1995) reportan una tendencia similar para isoenzimas y RAPDs

al estudiar la especie *Buffalograss*. Existe un patrón en el cual el marcador con mayor variabilidad (AFLPs y microsatélites), demuestra mayor estructura poblacional. Los resultados de AMOVA en nuestro trabajo demuestran la no existencia de una estructura poblacional en camarón blanco.

Mientras los resultados de De la Rosa-Vélez *et al.* (2000) con isoenzimas muestran evidencia de divergencia poblacional en *F. californiensis* y *L. stylirostris* colectados a lo largo del Golfo de California. Los valores máximos de distancia mediante el coeficiente de Nei (1978) en ese estudio fueron de 0,01 para *F. californiensis* y 0,07 para *L. stylirostris* (De la Rosa-Vélez *et al.*, 2000). En nuestro estudio se encontraron valores máximos de 0,007, 0,006 y 0,022 para los primers 861, 862 y la combinación de ambos respectivamente. En el estudio con isoenzimas se trabajó con marcadores no neutrales y evolucionariamente conservadores, mientras que los ISSRs corresponden a marcadores neutrales. Por tanto estos marcadores, no sujetos a selección natural, deberían dar una mayor diferenciación al compararlos con isoenzimas, lo cual no fue nuestro caso. Esto confirma los resultados discutidos en el párrafo anterior de no estructura poblacional a nivel de la costa ecuatoriana. Resultados similares han sido encontrados en un estudio de animales silvestres ecuatorianos realizado en EE.UU. (Alcivar-Warren, Tufts University, comunicación personal).

En el presente estudio se utilizaron marcadores moleculares tipo ISSRs que tienen un carácter dominante y amplifican múltiples bandas por reacción. Este tipo de marcadores, junto con otros como RAPDs y AFLPs han sido ampliamente utilizados para estudios de

genética de poblaciones debido a la facilidad de implementación, bajo costo y eficiencia de amplificación (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990; Vos *et al.*, 1995). Sin embargo, al compararlos con marcadores codominantes tipo microsatélites, RFLPs o ESTs, los marcadores dominantes presentan problemas debido a que no es posible identificar genotipos homocigotos de heterocigotos. Esto merma el poder de detección de estructura poblacional y diferenciación genética. Maguire *et al.* (2002) comparan los resultados de AMOVA generados mediante AFLPs (dominantes) y microsatélites (codominantes) en *Avicennia marina*. Sus resultados demuestran que los microsatélites son mucho más efectivos en determinación de estructura poblacional y diferenciación genética que los AFLPs al encontrar que el porcentaje de variación entre poblaciones es de 9 versus 19%, respectivamente, para cada tipo de marcador. Adicionalmente los AFLPs muestran que el 80% de la variación corresponde a individuos, mientras los microsatélites asignan 46% a esa misma fuente (Maguire *et al.*, 2002). Si extendemos esos resultados a nuestro trabajo, vemos que el 99% de la variación en nuestro estudio corresponde a diferencias individuales. Existe por tanto la posibilidad que la poca diferenciación poblacional existente en las muestras estudiadas haya pasado no detectada por la naturaleza del marcador utilizado. Estudios con microsatélites en *L. vannamei* deberán mostrar a futuro si este fue el caso.

Los valores de diversidad genética de Nei (G_{st}) de 0,36, gene flow del 88,7% y F_{st} de 0,034 fueron superiores al realizar el análisis con el agrupamiento de los dos primers que cuando se analizaron por separado. Al realizar el agrupamiento de los dos primers se aumento el número de loci analizados a 100 pero el número de individuos analizados fue

menor. En total la matriz estuvo compuesta de 60 individuos. Sugama *et al.* (2002) reportaron un aumento en la variabilidad de frecuencias genéticas al aumentar el número de loci estudiados, lo que podría explicar el aumento en la variabilidad genética obtenida al realizar el agrupamiento. El porcentaje del gene flow por encima del 50% nos sigue indicando que no existe una diferenciación entre grupos de animales de las siete zonas de muestreo (Slatkin, 1985).

En resumen, nuestros resultados indican que no existe estructura poblacional entre los puntos de muestreo colectados a lo largo de la costa ecuatoriana. La población ecuatoriana correspondería a un grupo panmítico que se extiende en el rango estudiado.

La técnica de ISSR utilizada en este estudio fue útil para realizar una descripción general de la especie *L. vannamei*. Este tipo de marcador no ha sido reportado para investigaciones en genética de poblaciones de animales y de acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se puede postular como herramienta para estudios de poblaciones en especies marinas.

Una de las características importantes que debe tener un marcador molecular es su reproducibilidad. La cual se puede observar en los patrones obtenidos de las muestras por duplicado analizadas en el presente estudio (80 y 85%), dado la metodología utilizada la que permite que se trabaje a una temperatura de alineación estricta, con primers de longitudes grandes y así disminuir la tasa de error en el apareamiento de pares de bases (Wolfe *et al.*, 1998). Hasta el momento no existen reportes en la literatura científica sobre

la caracterización de bandas generadas por ISSRs. La asignación de bandas se realizó de manera manual y se presentaron diferencias en el número de bandas detectadas con los dos primers (54 con el primer 862 y 46 con el primer 861). Se conoce que la técnica de RADPs bandas que migran a la misma velocidad pueden presentar secuencias diferentes (Quiros *et al.*, 1991). En el caso de los ISSRs se podría producir el mismo fenómeno, lo que correspondería a una incorrecta asignación de las bandas y la asignación de una característica de igualdad cuando existe una diferencia en secuencia.

La caracterización de los 100 loci a través de los ISSRs generados con los primers 861 y 862 se realizó bajo diferente número de animales para cada primer (126 para el primer 861 y 222 para el primer 862). La razón por la cual no se amplificaron igual número de individuos fue que se tuvieron que desechar geles en los que no se podían definir con certeza las bandas presentes, comprometiendo el análisis de la presencia de la banda. Esta inconsistencia se puede deber a una mala calidad del ADN sumado a una baja efectividad del primer. Al realizar las amplificaciones con el primer 861 se observó que no se tenía una buena eficiencia de la reacción y como resultado las bandas reveladas en el gel eran muy tenues. En nuestra investigación el número de bandas analizadas es pequeño, no así el número de individuos analizados, el cual es representativo (Gregorius, 1980; Benzie, 2000) y evita fluctuaciones estadísticas. En *L. stylirostris* se evaluaron alrededor de 324 bandas con un número promedio de 8 individuos por sitio de colección (Aubert y Lightner, 2000). El alto número de bandas permitió compensar el pequeño número de muestras por sitio. En nuestro caso el número de individuos fue mayor pero con menor número de bandas.

6. CONCLUSIONES

Utilizando la técnica de ISSR fue posible realizar la caracterización genética de *L. vannamei* del Ecuador y Nicaragua. Este marcador molecular posee una metodología que requiere bajos costos y fácil implementación, teniendo un gran potencial como una herramienta en estudios de genética de poblacionales de especies marinas.

A través de los ISSRs se observó una alta diversidad genética, con heterocigosidad y polimorfismo altos para *L. vannamei*, pero no se llegó a presentar variabilidad genética entre los siete grupos de animales estudiados al obtenerse mínimas distancias genéticas.

Bajo la técnica de ISSR, los valores de F_{st} y AMOVA no detectaron una estructura poblacional de la especie *L. vannamei* a lo largo de los puntos de muestreo analizados desde Esmeraldas hasta Machala. Por lo que se concluye que esta especie corresponde a un grupo panmítico donde se presenta un apareamiento al azar entre individuos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbot, P. 2001. Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science* 1-3.
- Alcivar-Warren, A., D.K. Garcia, M.A. Faggart, y C. Rich. 1994. Evaluation of genetic diversity of *Penaeus vannamei* shrimp using molecular genetic techniques. USMSFP 10th Anniversary Review, GCRL Special Publication 1:27-34.
- Aubert, H., y D.V. Lightner. 2000. Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. *Marine Biology* 137:875-885.
- Ball, A., S. Leonard, y W.R. Chapman. 1998. Characterization of (GT)_n microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Molecular Ecology* 7:1251-1253.
- Beardmore, J.A., G.C. Mair, y R.I. Lewis. 1997. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquaculture Research* 28:829-839.
- Benzie, J.A.H. 1998. Genetic improvement of prawns. Proceeding of 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 11- 16 January, 1998, Armidale, Australia.
- Benzie, J.A.H. 1999. Genetic structure of coral reef organisms- ghosts of dispersal past. *American Zoologist* 39:131-145.
- Benzie, J.A.H. 2000. Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquaculture Research* 31:95-119.

- Benzie, J.A.H., S. Frusher, y E. Ballment. 1992. Geographical variation in allozyme frequencies of *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda) populations in Australia. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 43:715-725.
- Benzie, J.A.H., E. Ballment, y S. Frusher. 1993. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. *Aquaculture* 111: 89-93.
- Bert, T. M. 1986. Speciation in western Atlantic stone crabs (genus *Minippe*): the role of geological process and climate events in the formation and distribution of species. *Marine Biology* 93:157-170.
- Bierne, N., I. Beuzart, V. Vonau, F. Bonhomme, y B. Bedier. 2000. Microsatellite-associated in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 184:203-219.
- Bornet, B., y M. Branchard. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) marker: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:209-215.
- Brooker, A.L., J.A.H. Benzie, D. Baliry, y J.J. Versini. 2000. Population structure of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in Australian waters, determined using microsatellite markers. *Marine Biology* 136:149-157.
- Cámara Nacional de Acuicultura. 2001. La Crisis en Cifras. *Acuicultura del Ecuador* 45:3-4.
- Carr, W., K. Fjalestad, D. Godin, J. Swingle, J. Sweeney, y T. Gjedrem. 1996. Genetic variation in weight and survival in a population of specific pathogen-free shrimp. *World Aquaculture* 1996, Bangkok, Febrero 29 a Marzo 2, World Aquaculture Society, Baton Rouge, EE.UU.

- Clegg, C.C. 1989. Molecular diversity in plant populations. Páginas 98-115. *In*: H.D.Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahleer y B.S. Weir (editores), Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland, Massachusetts, EE.UU.
- Collick, A., y Jeffreys, A.J. 1990. Detection of a novel minisatellite-specific DNA-binding protein. *Nucleic Acids Research* 18:625-629.
- Cruz, P.C., H. Mejía-Ruiz, R. Pérez-Enriquez, y A.M. Ibarra. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Molecular Ecology* 2:239-241.
- De la Rosa-Vélez, J., R. Escobar-Fernández, F. Correa, y E. Félix. 1999. High allozyme variation and genetic similarity of two populations of commercial penaeids, *Penaeus brevirostris* (Kingsley) and *P. vannamei* (Boone), from the Gulf of California. *Aquaculture Research* 30:459-463.
- De la Rosa-Vélez, J., R. Escobar-Fernández, F. Correa, M. Maqueda-Cornejo, y J. De la Torre-Cueto. 2000. Genetic structure of two commercial penaeids (*Penaeus californiensis* and *P. stylirostris*) from the Gulf of California, as revealed by allozyme variation. *Fishery Bulletin* 98(4):674- 683.
- Dinesh, K., W. Chan, T. Lim, y V. Phang. 1995. RAPD markers in fishes: an evaluation of resolution and reproducibility. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 3(2):112-118.
- Dore, I, y C. Frimodt. 1987. *An Illustrated Guide to Shrimp of the World*. Van Nostrand Reinhd, Huntington, EE.UU.

- Espinosa, G., U. Bécquer, Y. Borrell, J. Romo, R. Díaz, J. Azanza, y R. de Dios. 2002. Variación genética y morfológica en poblaciones naturales y cautivas de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en Cuba. Páginas 778-784. *In*: I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, I. De Blas (Editor), Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España
- Excoffier, L., P.E. Smouse, y J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Fang, D.Q., y M.R. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with Inter-Simple Sequence Repeat Markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95:408-417.
- FAO, <http://fao.org/dad-is>.
- García, D.K., y J.A.H. Benzie. 1995. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture* 130:137-144.
- García, D.K., A.K. Dhar y A. Alcivar-Warren. 1996. Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals presence of two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5: 71-83.
- García, D.K., M.A. Faggart, J.A. Wyban, W.H. Carr, J.N. Sweeney, y K.M. Ebert. 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3 (5): 270-280.

- García-Machado, E., A. Robainas, G. Espinosa, M. Oliva, J. Páez, N. Verdecia, y M. Monnerot. 2001. Allozyme and mitochondrial DNA variation in Cuban populations of the shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biology* 138 (4):701-707.
- Godwin, I.D., E.A.B. Aiken, y L.W. Smith. 1997. Application of Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18:1524-1528.
- Gregorius, H.R. 1980. The probability of losing an allele when diploid genotypes are sampled. *Biometrics* 36:643-652.
- Griffiths, A.J., W.M. Gelbart, J.H. Miller, y R.C. Lewontin. 1999. *Modern Genetic Analysis*. W. H. Freeman and Company, New York, EE.UU.
- Grodzicker, T., J. Williams, P. Sharp, y J. Sambrook. 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Biology* 39:439-446.
- Gupta, M., Y.S. Chyi, J. Romero-Severson, y J.L. Owen. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeat. *Theoretical and Applied Genetics* 89:998-1006.
- Harris , S.E.G., R.T. Dillion, P.A. Sandifer, y L.J. Lester. 1990. Electrophoresis of isozymes in cultured *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 85:330-332.
- Hartl, D.L., y A.G. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*. Third edition. Sinauer Associates, Massachusetts, EE.UU.
- Hedgecock, D., R.A. Shleser, y I.C. Nelson. 1982. Genetics. Páginas 283-403 *In*: D.E., Bliss. (Editor). *The Biology of Crustacea, Embryology, Morphology and Genetics*, Academic Press, New York, EE.UU.

- Hizer, S.E., A.K. Dhar, K. R. Klimpel, y D. K. Garcia. 2002. RAPD markers as predictors of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) resistance in shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Genome* 45:1-7.
- Hoelzel, A.R. 1998. *Molecular Genetic Analysis of Populations, a Practical Approach*. 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford, EE.UU.
- Jiménez, P., y C. Collada. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Investigaciones Agrícolas-Sistema de Recursos Forestales* 2:237-247.
- Jorde, L.B., A.R. Rogers, M. Bamshad, W.S. Watkins, P. Krakowiak, y S. Sung. 1997. Microsatellite diversity and the demographic history of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 3100-3103.
- Karl, S.A., y J.C. Avise. 1992. Balancing selection at allozyme loci in oyster: implications for nuclear RFLPs. *Science* 256:100-102.
- Koski, V. 2000. A Note in genetic diversity in natural populations and cultivated stands of scoots pine (*Pinus silvestre*). *Investigaciones Agrícolas-Sistema de Recursos Forestales* 1:89-94.
- Kreitman, M., y H. Akahi. 1995. Molecular evidence fir natural selection. *Annual Review of Ecology Systematic* 26:403-422.
- Lester, L.J. 1979. Population genetics of penaeid shrimp from the Gulf of Mexico. *Journal of Heredity* 70(3):175-180.
- Lester, L.J. 1983. Developing a selective breeding program for penaeid shrimp mariculture. *Aquaculture* 33:44-50

- Lester, L.J., y M.J. Pante. 1992. Genetics of *Penaeus* species. Páginas 29-52. *In*: A.W. Fast y L.J. Lester (editores), *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holanda.
- Lightner, D.V. 1993. Diseases of penaeid shrimp, Páginas 393–486. *In*: J.P. McVey, (editor) *Handbook of Mariculture, Crustacean Aquaculture*, CRC Press, Boca Ratón, Florida, EE.UU.
- Litt, M., y J.A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetic* 44:397-401.
- Lynch, M., y B.G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3:91-100.
- Machado, E.G., N. Dennebouy, M.O. Suarez, J.C. Mounolou, y M. Monnerot. 1993. Mitochondrial 16S-rRNA gene of two species of shrimps. Sequence variability and secondary structure. *Crustaceana* 65:279-286.
- Maguire, T.L., R. Peakall, y P. Saenger. 2002. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Fork.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *Theoretical and Applied Genetics* 104:388-398.
- Meyer, W., T.G. Michell, E.Z. Freedman, y R. Vilgalys. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in polymerase chain reaction to distinguish strain of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Biology* 31:2274-2280.

- Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) V 1.3 A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. University Northern, Arizona, EE.UU.
- Mosquera, G.M., M. Burgos, M. Santos, y W. Mendívez. 1998. Aspectos Técnicos que Sustentan la Implementación de la Veda al Recurso Camarón Durante 1998-1999. División de Biología y Evaluación del Recurso Pesquero, INP Guayaquil, Ecuador.
- Muller, J.C, y B.D. Latter. 1980. Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid prawns. *Evolution* 34:904-916.
- Nagaoka, T., y Y. Ogihara. 1997. Applicability of Inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94:597-602.
- Nei, M. 1978. Estimation of heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetic* 89:583-590.
- Palumbi, S.R., y C.S. Baker. 1994. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology Evolution* 11:426-435.
- Peakall, R., P.E. Smouse, y D.R. Huff. 1995. Evolutionary implications of allozyme and RADP variation in diploid populations of Buffalograss (*Buchlōe dactyloides* Nutt. Engelm). *Molecular Ecology* 4:135-147.
- Peakall, R., y P. Smouse. 2001. GenAlEx V5: Genetic analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research, Australian National University, Canberra, Australia.

- Pérez, F. 1999. Generación y manipulación de la diversidad genómica en *Penaeus vannamei* para la acuicultura del Ecuador. Informe BID-FUNDACYT 210, FUNDACYT, Ecuador.
- Philipp, D.P., J.M. Epifania, y M.J. Jennings. 1993. Point/counterpoint: conservation genetics and current stocking practices- are they compatible? Aquatic Fisheries Sciences 18 (12):15-16.
- PMCR. 1999. Principios y Criterios Técnicos para el Desarrollo Sustentable de la Pesquería de Reproductores de Camarón- ZEM- Atacames-Súa-Muisne. Programa de Manejo de Recursos Costeros, Guayaquil, Ecuador.
- Quiros, C.F., J. Hu, P. This, A.M. Chevre, y M. Delseny. 1991. Development and chromosomal location of genome-specific markers by polymerase chain reaction in Brassica. Theoretical and Applied Genetics 82:627-632.
- Ratnapark, M.B., M. Tekeoglu, y F. Muehlbauer. 1998. Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. Theoretical and Applied Genetics 97:515-519.
- Richardson, B.J. 1982. Geographical distribution of electrophoretically detected protein variation in the Australian commercial fishes. III. Western king prawn, *Penaeus latisulcatus* Kishinouye. Australian Journal of Marine and Freshwater Research 33:933-937.
- Ryman, N. 1997. Genetic Population Structure. Páginas 1-10 In: W. S. Grant (editor). 1997. Genetic Effects of Straying of Non-Native Fish Hatchery Fish Into Natural Populations, Proceedings of the Workshop of the U.S. Department. Commer NOAA, Technical Memo. NMFS-NWFSC-30, Sweden, EE.UU.

- Ruzzante, D.E., C.T. Taggart, y D. Cook. 1998. A nuclear DNA basis for shelf and bank scale population structure in northwest Atlantic cod (*Gadus morhua*). Labrador to Georges Bank. *Molecular Ecology* 7:1663-1680.
- Sévigny, J.M., L. Savard, y D.G. Parsons. 2000. Genetic characterization of the northern shrimp, *Pandalus borealis*, in the northwest Atlantic using electrophoresis of enzymes. *Journal of Northwest Fisheries Sciences* 27:161-175.
- Shahjahan, R.M., K.J. Hughes, R.A. Leopold, y J.D. Devault. 1995. Lower incubation temperature increases yield of insect genomic DNA isolated by the CTAB method. *BioTechniques* 19:333-334.
- Silva, E.P., y C.A. Russo. 2000. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. *Hidrobiología* 420:119-135.
- Slatkin, M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39:53-65.
- Sturtevant, A.H.A. 2001. *History of Genetic*. Cold Spring Harba Laboratory Press, California, EE.UU.
- Sugama, K., J.A.H. Benzie, y E. Ballmer. 2002. Genetic variation and population structure of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Indonesia. *Aquaculture* 205:37-48.
- Sunden, S.L.F., y S. K. Davis. 1991. Evaluation of genetic variation in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. *Aquaculture* 97:131-142.
- Tam, Y.K, y K.H. Chu. 1993. Electrophoretic study on the phylogenetic relationships of some species of *Penaeus* and *Metapenaeus* (Decapoda: Penaeidae) from the South China Sea. *Journal Crustacea Biology* 13(4):697-705.

- Tassanakajon A., P. Jarayabhand, y V. Boonsaeng. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 6(2):110-115.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17:6463-6471.
- Tong, J., S.A. Lehnert, K. Byrne, H.S. Kwan, y K.H. Chu. 2002. Development of polymorphic EST markers in *Penaeus monodon*: applications in penaeid genetics. *Aquaculture* 208:69-79.
- Tsumura, Y., K. , S.H. Strauss. 1996. Diversity and inheritance of Inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-for (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics* 92:40-45.
- Vázquez, A. (1993). *Ecología y Formación Ambiental*. McGraw Hill, México.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, y M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21):4407-4414.
- Weber, J.L., y P.E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetic* 44:388-396.
- Welsh, J., y M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18:7213-7218.

- White, P.S., L.T. Owatha, T. Hakan, y D.D. Llewellyn. 1998. Páginas 65-101. *In*: Hoelzel, A.R. 1998. *Molecular Genetic Analysis of Populations, a Practical Approach*. 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford.
- Williams, J., A. Kubelik, K. Livak, J. Rafalski, y S. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.
- Wolfe, A.D., y A. Liston. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematic and evolutionary biology. Páginas 43-86. *In*: D.E. Soltis, P.S. Soltis y J.J. Doyle (editores), *Molecular Systematic of Plant: DNA Sequencing*. New York, EE.UU.
- Wolfe, A.D., Q.Y. Xiang ,y S.R. Kephart. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. *Molecular Ecology* 7:1107-1125.
- Wyban, J.A., J.S. Swingle, J.N. Sweeney, y G.D. Pruder. 1993. Specific pathogen-free *Penaeus vannamei*. *World Aquaculture* 24 (1):39-45.
- Xu, Z., J.H. Primavera, L.D. de la Pena, P. Pettit, J. Belak, y A. Alcivar-Warren. 2001. Genetic diversity of wild and culture black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* 199:13-40.
- Yeh, F.C., R. Yang, y T. Boyle. 1999. Popgene V1.31, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Edmonton Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canadá.
- Zhinaula, M.J. 2002. Correlación de Crecimiento en *Litopenaeus vannamei* Utilizando ISSRs, Como Método de Identificación Individual. Tesis para optar al título de Ingeniero Acuacultor, Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.

Zietkiewicz E., A. Rafalski, y D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.

Anexo II Matriz de presencia de bandas generadas bajo el primer 862

Individuo	Banda																																																													
ATAC 1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0																			
ATAC 6	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0																
ATAC 7	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0															
ATAC 8	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0															
ATAC 10	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0														
ATAC 13	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0													
ATAC 14	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0												
ATAC 15	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0									
ATAC 16	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0											
ATAC 18	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0										
ATAC 19	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0									
ATAC 20	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0									
ATAC 21	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0								
ATAC 22	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1									
ATAC 23	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0							
ATAC 25	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0							
ATAC 26	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0									
ATAC 27	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0									
ATAC 28	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0								
ATAC 29	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0								
ATAC 30	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0									
ATAC 31	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1							
ATAC 33	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0					
ATAC 34	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0				
ATAC 35	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0					
ATAC 36	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1			
ATAC 40	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0					
ATAC 41	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1			
ATAC 46	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1		
ATAC 47	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0			
ATAC 49	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
ATAC 50	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
CAYO 1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0		
CAYO 5	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0		
CAYO 6	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0		
CAYO 7	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1								

ANEXO III Matriz de presencia de bandas generadas bajo la agrupación de los primer 861 y 862

Individuo	Bandas																																																							
	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9	a10	a11	a12	a13	a14	a15	a16	a17	a18	a19	a20	a21	a22	a23	a24	a25	a26	a27	a28	a29	a30	a31	a32	a33	a34	a35	a36	a37	a38	a39	a40	a41	a42	a43	a44	a45	a46	a47	a48	a49	a50	a51	a52	a53	a54		
ATAC 13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0			
ATAC 15	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0		
ATAC 18	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	
ATAC 19	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0		
ATAC 25	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0			
ATAC 27	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
ATAC 30	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
CAYO 1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0		
CAYO 6	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0			
CAYO 13	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0		
CAYO 15	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0		
CAYO 18	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
CAYO 19	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0		
CAYO 23	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1		
CAYO 25	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0		
CAYO 38	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0		
CLEM 1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0		
CLEM 13	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	
CLEM 15	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0			
CLEM 18	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0			
CLEM 19	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0			
CLEM 23	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1		
CLEM 25	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
CLEM 27	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0		
CLEM 30	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
MACH 1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
MACH 13	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0		
MACH 14	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	
MACH 18	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0			
MACH 19	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1		
MACH 23	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	
MACH 27	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	
MACH 30	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
MACH 38	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
PEDE 1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1					

Continuación.....

Individuo	Bandas																																																	
	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12	b13	b14	b15	b16	b17	b18	b19	b20	b21	b22	b23	b24	b25	b26	b27	b28	b29	b30	b31	b32	b33	b34	b35	b36	b37	b38	b39	b40	b41	b42	b43	b44	b45	b46				
ATAC 13	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
ATAC 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	
ATAC 18	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	
ATAC 19	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
ATAC 25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
ATAC 27	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	
ATAC 30	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	
CAYO 1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	
CAYO 6	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	
CAYO 13	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
CAYO 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	
CAYO 18	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	
CAYO 19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
CAYO 23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0
CAYO 25	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	
CAYO 38	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0
CLEM 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	
CLEM 13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	
CLEM 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
CLEM 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
CLEM 19	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
CLEM 23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
CLEM 25	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	
CLEM 27	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	
CLEM 30	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
MACH 1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	
MACH 13	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
MACH 14	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
MACH 18	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	
MACH 19	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	
MACH 23	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	
MACH 25	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	
MACH 27	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	
MACH 30	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
MACH 38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	
PEDE 1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	
PEDE 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	

Continuación.....

Individuo	Bandas																																																							
	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9	a10	a11	a12	a13	a14	a15	a16	a17	a18	a19	a20	a21	a22	a23	a24	a25	a26	a27	a28	a29	a30	a31	a32	a33	a34	a35	a36	a37	a38	a39	a40	a41	a42	a43	a44	a45	a46	a47	a48	a49	a50	a51	a52	a53	a54		
PEDE 14	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0		
PEDE 19	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0		
PEDE 25	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0			
PEDE 27	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
PEDE 30	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0		
PEDE 38	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0		
POSO 1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0		
POSO 13	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
POSO-14	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
POSO 15	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0		
POSO 18	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	
POSO 19	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
POSO 23	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1
POSO 25	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0		
POSO 27	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0			
NICA 1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0		
NICA 13	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	
NICA 15	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0		
NICA 19	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0				
NICA 23	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0		
NICA 27	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0			
NICA 38	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0			

Continuación.....

Individuo	Bandas																																																					
	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12	b13	b14	b15	b16	b17	b18	b19	b20	b21	b22	b23	b24	b25	b26	b27	b28	b29	b30	b31	b32	b33	b34	b35	b36	b37	b38	b39	b40	b41	b42	b43	b44	b45	b46								
PEDE 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0			
PEDE 19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0				
PEDE 25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1			
PEDE 27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0			
PEDE 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0			
PEDE 38	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0			
POSO 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0			
POSO 13	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
POSO-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
POSO 15	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0		
POSO 18	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
POSO 19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0		
POSO 23	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	
POSO 25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
POSO 27	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	
NICA 1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0		
NICA 13	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
NICA 15	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
NICA 19	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
NICA 23	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
NICA 27	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	
NICA 38	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	