UNIVERSIDAD DE MACHALA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE ACUACULTURA

TESIS SOMETIDA A LA CONSIDERACIÓN DEL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS COMO REQUISITO PREVIO PARA OPTAR AL GRADO DE:

INGENIERO ACUACULTOR

CORRELACIÓN DE CRECIMIENTO EN *Litopenaeus vannamei* UTILIZANDO ISSRs COMO MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL

MARIUXI JEANINA ZHINAULA SARMIENTO

2002

Esta tesis ha sido aceptada en la forma presente por el tribunal de grado nominado por el Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Machala, como requisito parcial para optar al grado de:

INGENIERO ACUACULTOR

Ing. Guillermo Baños Cruz, Director Presidente

Ing. Eudaldo Jadán Veriñaz, Profesor Miembro

Ing. Colón Velásquez López, Profesor Miembro

DEDICATORIA

A mi madre Leisker, con mucho amor:

Mamá este trabajo esta únicamente dedicado a ti. Gracias a tu esfuerzo, sacrificio y comprensión he podido cumplir esta meta. Llegar a ser un profesional no sólo es un logro mío, es nuestro, porque siempre estuviste conmigo compartiendo mis triunfos y fracasos, porque en los momentos más difíciles fuiste el soporte que me mantuvo en pie, porque a pesar de estar separadas por una gran distancia siempre estas conmigo, porque fuiste mi inspiración para culminar este compromiso. Te quiero.

Yo te he nombrado mi reina.
Hay más altas que tú, más altas.
Hay más puras que tú, más puras.
Hay más bellas que tú, hay más bellas.
Pero tú eres mi reina.

Mariuxi.

AGRADECIMIENTOS.

A la Fundación CENAIM-ESPOL, por el aporte financiero-técnico y científico proporcionado para el desarrollo de este trabajo de investigación. Y a su Director el Dr. Jorge Calderón, por permitirme realizar esta investigación en tan prestigiosa institución.

Un agradecimiento especial al M.Sc. Franklin Pérez, investigador de la Fundación CENAIM-ESPOL y promotor de esta investigación, por su apoyo constante, amistad y confianza brindada y por colaborar de manera desinteresada siendo la guía fundamental en la realización de este trabajo de investigación.

Al personal docente y administrativo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Machala, especialmente a todos los que fueron mis maestros, porque sin egoísmo compartieron sus conocimientos durante mis años universitarios.

De manera especial al Blgo. Guillermo Baños, Director de tesis, al Ing. Colón Velásquez y al Ing. Eudaldo Jadán, colaboradores de la misma, por su participación en la revisión y evaluación de esta investigación.

A todo el personal técnico, operario y administrativo de la Fundación CENAIM-ESPOL, en especial al Acuic. José Melena, la Acuic. Mariuxi Sotomayor, Ocean. Irma Betancourt, Blgo. Fabricio Echeverria y a Rosa Malavé, a todos ustedes gracias por su colaboración y amistad desinteresada.

A la Ing. Elizabeth Honores, al Acuic. Xavier Médina, al Blgo. Jaime Cruz, la Blga. Pilar Bonilla y al Ing. René Izquierdo, amigos incondicionales que siempre estuvieron conmigo brindándome su apoyo en los momentos más difíciles. Los quiero mucho.

A ti mi amor, gracias por acariciarme el alma.

A todos, gracias.

ÍNDICE.

ÍNDICE DE CUADROS.

ÍNDICE DE FIGURAS.

1. INTRODUCCIÓN.

En la década de los noventa el Ecuador era el mayor productor de camarón en América Latina y el cuarto productor más grande del mundo (Weidner *et al*, 1992). Actualmente, los niveles de producción han disminuido fuertemente debido al brote de varios patógenos vírales, como el síndrome de Taura (TSV) y de la Mancha Blanca (WSSV) (CNA, 2000).

A pesar de los esfuerzos que han realizado la Cámara Nacional de Acuacultura, La Fundación CENAIM-ESPOL y el Centro de Servicios para la Acuicultura (CSA), en el control y prevención de enfermedades, el panorama no ha cambiado (CNA, 2000). Esto hace que los productores requieran nuevas herramientas y conceptos tecnológicos que ayuden a enfrentar la actual situación. Lo cual se lograría a través de metodologías y procedimientos costo-efectivos dirigidos hacia el desarrollo y sostenibilidad de la industria camaronera ecuatoriana.

El mejoramiento genético a través de la cría selectiva de animales domesticados, es la nueva herramienta de trabajo que han adoptado varios países productores de camarón, teniendo como referencia los avances obtenidos en el sector agropecuario. Estos programas utilizan para su desarrollo diferentes criterios de selección basados en características de importancia económica. Una de las principales características a mejorar es la tasa de crecimiento de los animales hasta su comercialización. Sin embargo, seleccionar para una característica puede afectar indirectamente otras características.

Las correlaciones entre fenotipos proporcionan un indicativo acerca del potencial indirecto de selección, si las características son altamente correlacionadas, seleccionar una característica afectara la otra característica (Tave, 1993). De esta manera las correlaciones entre edades proporcionan la información necesaria para determinar el momento en que la selección de una característica deseada debe tomar lugar. No obstante, existe poca información disponible sobre las correlaciones entre edades en camarones *L. vannamei*.

Los programas de mejoramiento genético también han integrado herramientas moleculares que permiten conocer algunas características del genoma de un individuo, utilizando esta información para hacer más eficientes los programas de selección. Entre las técnicas de biología molecular los ISSRs serían una alternativa para el estudio de las características genéticas de los camarones *L. vannamei*, la cual entre otras aplicaciones permitiría la identificación individual de animales.

El objetivo general de esta investigación fue establecer la correlación entre el peso a una edad temprana y el peso a tamaño comercial en *L. vannamei* para definir la posibilidad de seleccionar camarones en un período temprano de crecimiento y no cuando han alcanzado el peso comercial. Para este propósito fue necesario monitorear el crecimiento individual de los animales, resultando indispensable emplear un sistema de identificación. En este trabajo se utilizo la técnica de ISSRs y elastómeros para identificar individualmente a los camarones.

Para lograr el objetivo general de esta investigación fue necesario cumplir los siguientes objetivos específicos:

- Implementar la técnica de ISSRs en camarones *L. vannamei*.
- Utilizar la información generada mediante perfiles genéticos de ISSRs, para identificar individualmente camarones *L. vannamei*.
- Evaluar la correlación del crecimiento de *L. vannamei*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1. *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931).

El camarón *L. vannamei* es una especie nativa de las Costas del Pacífico de América Central y Sur América (desde México a Perú). Y es la especie preferida para la mayoría de los cultivadores de camarón en Ecuador y en América Latina.

De todas las especies nativas de América Latina, *L. vannamei* es el que mejor se adapta a las condiciones de cultivo. Cuando estas condiciones son óptimas éste puede crecer de post-larva a 20 g. en aproximadamente 4 meses. Idealmente, la media de peso dentro de las piscinas de engorde sería óptima cuando se obtuviera un gramo por semana (Brown, 1991).

2.1.1. CRECIMIENTO.

Desde el punto de vista biológico, el crecimiento de los crustáceos se produce a intervalos a través de la muda (renovación del exoesqueleto o ecdisis) a lo largo de la vida del animal. El índice de crecimiento es una función de la frecuencia de la muda y del incremento de tamaño en cada muda. En el proceso de la muda el animal expulsa su caparazón y en este estadío es envuelto por una delgada cubierta, durante este período el animal absorbe agua y crece rápidamente, después de expandirse el caparazón se endurece por la acumulación de sales de calcio y en unas cuantas horas el animal ha recuperado su forma pero es más grande.

La frecuencia de muda varía entre especies, con el tamaño y la edad (Lee y Wickins, 1997). A medida que los camarones crecen su tasa de

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1. *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931).

El camarón *L. vannamei* es una especie nativa de las Costas del Pacífico de América Central y Sur América (desde México a Perú). Y es la especie preferida para la mayoría de los cultivadores de camarón en Ecuador y en América Latina.

De todas las especies nativas de América Latina, *L. vannamei* es el que mejor se adapta a las condiciones de cultivo. Cuando estas condiciones son óptimas éste puede crecer de post-larva a 20 g. en aproximadamente 4 meses. Idealmente, la media de peso dentro de las piscinas de engorde sería óptima cuando se obtuviera un gramo por semana (Brown, 1991).

2.1.1. CRECIMIENTO.

Desde el punto de vista biológico, el crecimiento de los crustáceos se produce a intervalos a través de la muda (renovación del exoesqueleto o ecdisis) a lo largo de la vida del animal. El índice de crecimiento es una función de la frecuencia de la muda y del incremento de tamaño en cada muda. En el proceso de la muda el animal expulsa su caparazón y en este estadío es envuelto por una delgada cubierta, durante este período el animal absorbe agua y crece rápidamente, después de expandirse el caparazón se endurece por la acumulación de sales de calcio y en unas cuantas horas el animal ha recuperado su forma pero es más grande.

La frecuencia de muda varía entre especies, con el tamaño y la edad (Lee y Wickins, 1997). A medida que los camarones crecen su tasa de crecimiento disminuye considerablemente, sin embargo como los camarones de cultivo son cosechados antes de alcanzar este estadío, esto no tiene importancia en producción (Swift, 1985).

Las condiciones medioambientales influyen de manera determinante en el crecimiento de los camarones. La mineralización del nuevo caparazón durante el proceso de la muda se ve afectado por la disponibilidad de algunas sales de los iones (calcio, bicarbonatos y el pH) en el agua. Los cambios en la composición del agua durante el cultivo intensivo y particularmente en sistemas de recirculación pueden tener un efecto importante sobre la mineralización y sobre la capacidad del animal para controlar el pH sanguíneo (Lee y Wickins, 1997).

La temperatura es un factor ambiental que limita el crecimiento, se ha notado que en temperaturas bajas se reduce la incidencia de la muda en poblaciones naturales, esto se debe a que el índice de su actividad metabólica también se reduce. Según Swift (1985) la temperatura óptima para obtener un buen crecimiento en esta especie esta en un rango de 25-30°C.

La salinidad no es un factor que limite el crecimiento de los camarones, ya que *L. vannamei* presenta una amplia tolerancia a las variaciones de salinidad, sin embargo su tasa de crecimiento disminuye cuando la salinidad excede los 35‰ o es inferior a 20‰ (Cun, 1982). Otro factor importante en el crecimiento de esta especie es el nivel de oxígeno disuelto, Brown (1991) sugiere que los niveles de oxígeno deben estar alrededor de 3 ppm.

2.1.2. GENÉTICA.

Los sistemas genéticos de un organismo tienen como funciones principales transmitir la información genética de padres a hijos y de célula a célula, y la ejecución o expresión de esa información para dar lugar al conjunto de células y tejidos que conforman al ser vivo. La manipulación genética se puede realizar, hoy en día, de formas muy diferentes como consecuencia del alto grado de desarrollo que ha alcanzado la genética. La actuación sobre los sistemas genéticos se puede efectuar a través de diferentes metodologías que se pueden agrupar en tres grandes categorías: la mejora genética tradicional, la manipulación cromosómica y la ingeniería genética (Alvarez Jurado, 1987).

Desde el punto de vista de la genética el atributo más importante de una población es su variabilidad genética. La importancia de la variabilidad genética radica en que constituye el material de partida sobre el que actúan los agentes que producen los cambios de la estructura genética de las poblaciones. La valoración de este parámetro dentro de una población y el grado y clase de distancia genética entre poblaciones, es un requerimiento básico para cualquier estudio de mejora genética explotable comercialmente. Por lo tanto, la conservación de un stock heterogéneo es fundamental para el desarrollo de estos programas genéticos (Bautista, 1994).

En varias especies de Peneidos se han realizado diversos estudios sobre la variabilidad de algunos caracteres morfométricos, con el fin de seleccionar stocks de descendencia que presenten un mejor desarrollo de estos caracteres para experiencias de mejora genética u otros caracteres que ofrezcan posibilidades en acuicultura (Bautista, 1994).

2.2. DOMESTICACIÓN Y MEJORAMIENTO GENÉTICO.

La domesticación es un proceso de adaptación de una especie al manejo artificial bajo condiciones de cultivo (Ibarra, 2000). Desde tiempos remotos el hombre viene practicando el mejoramiento de las especies de vegetales y animales (De la Loma, 1963). Uno de los recursos más significativos para el desarrollo y perfeccionamiento de la agricultura moderna ha sido el establecimiento de programas de mejoramiento genético y cría selectiva.

Para que un proceso de domesticación sea efectivo se deben controlar todos los aspectos biológicos, incluyendo la genética de las especies que se utilizan en acuacultura (Newkirk, 1980). De tal manera que llevar adelante un programa de mejoramiento genético requiere conocer varios parámetros genéticos que indiquen las características que se pueden mejorar y el momento adecuado para hacerlo (Jory, 2000).

Existe una elevada posibilidad de obtener ganancias genéticas con programas de selección en animales acuáticos, mayor que en el caso de animales y plantas terrestres (Pillay, 1997). Una gran cantidad de experimentos de selección y programas de crianza han sido realizados para mejorar la tasa de crecimiento en animales de acuacultura (Gjedrem, 1997). Gjedrem (1999) reporta en el Salmón Noruego un incremento del 10-12% y en Tilapia el 13% de ganancia genética en la tasa de crecimiento por generación.

La domesticación y el mejoramiento genético en el cultivo de camarón han sido lentos comparados con otras especies de interés en acuacultura, debido a la fácil disponibilidad de reproductores y post-larvas silvestres (Crocos, Preston y Lehnert, 1999).

El Instituto Oceánico de Hawaii ha desarrollado poblaciones libres de patógenos específicos denominadas SPF en *Penaeus vannamei* a partir de las cuales se inicia la selección. Esta se basa en la tasa de crecimiento y resistencia al síndrome de Taura (TSV). Con una ganancia genética de 4.4% para peso de cosecha y de 12.4% para supervivencia después de pruebas de desafío en la 1^{era} generación (Moss, Argue y Arce, 1999).

CENIACUA/AKVAFORSK (1999) llevan a cabo un programa de mejoramiento en *Penaeus vannamei*, cuyos propósitos son mejorar la tasa de crecimiento, resistencia al síndrome de Taura e investigan una posible resistencia y/o tolerancia al síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).

Es razonable asumir que menos del 10% de la producción proveniente de la acuacultura de hoy, esta basada en animales genéticamente mejorados (Gjedrem, 2002). La cría animal y la selección deberían ser tomados mas seriamente por la industria de la acuacultura, ya que esto puede contribuir significativamente a resolver muchos factores que actualmente limitan la expansión de esta industria. El cuadro 1 presenta un resumen de las respuestas de selección reportadas para la tasa de crecimiento en varias especies de acuacultura.

Cuadro 1. Ganancia genética de la tasa de crecimiento en especies de acuacultura (Gjedrem, 2002).

Especies	Ganancia genética por generación (%)	Número de reportes	Número de generaciones seleccionadas
Coho	10,1	1	4
Trucha Arco iris	11,5	2	3; 2
Salmón Atlántico	13,6	3	1; 1; 6
Bagre de Canal	17,5	2	1; 1
Tilapia	13,5	2	2; 12
Carpa Rohu	17,0	1	2
Camarón	9,7	2	1: 1
Ostras	14,3	4	1; 2; 1; 1
Almejas	9,0	1	1
Scallops	17,0	2	1; 1

2.2.1. CORRELACIONES GENÉTICAS.

Ibarra (1998) menciona la importancia de estimar las correlaciones genéticas al momento de seleccionar los caracteres de interés específico. Se dice que hay correlación entre dos caracteres cualesquiera de una especie animal o vegetal, cuando uno de ellos varía a medida que lo hace el otro, en el mismo o en diferente sentido (De la Loma, 1963), lo que indicaría qué tanto de la selección en un carácter, producirá una respuesta correlacionada en otro carácter.

Las características pueden ser genéticamente correlacionadas entre una u otra, cada una positiva o negativamente. Si una característica primaria responde para selección, las características secundarias responderán cada una de una manera beneficiosa o perjudicial o permanecerán sin cambio dependiendo de la naturaleza de la correlación entre las características primarias y secundarias. En este sentido, el efecto de una selección debe proyectarse en características económicamente importantes y relacionarlas genéticamente.

Los estudios realizados para medir las correlaciones genéticas entre caracteres específicos han demostrado la importancia de este parámetro dentro de un programa de selección. Sin embargo, no se ha mencionado la importancia de las correlaciones fenotípicas entre diferentes edades de una especie. Goyard *et al* (1999) mencionan la importancia de las correlaciones entre edades para determinar el mejor momento en que la selección para crecimiento debe tomar lugar.

En especies de acuacultura se han realizado varios estudios acerca de las correlaciones fenotípicas entre diferentes edades de un mismo animal. Por ejemplo, la correlación de peso entre clases de edades en catfish *Ictalurus punctatus* es generalmente alta (r= 0,46-0,92). Los criadores de catfish pueden indirectamente seleccionar para peso de 24 o 36 semanas desde los datos de peso tomados tempranamente a 4 semanas de edad (r= 0,72) (El-Ibiary *et al*, 1979).

Aunque han sido realizados varios estudios para medir este parámetro en animales de acuacultura, existe poca información disponible en especies de camarones. Argue, Arce y Moss (2000), midieron la correlación entre el peso comercial (21-25 g) y el peso a reproductores (>35 g), en 120 camarones *Litopenaeus vannamei*. Ellos encontraron una relación significativa entre el peso comercial y el peso a reproductor (P<0,001) pero no observaron una alta correlación (r= 0,42). De los 20 reproductores más grandes en esa población, sólo 7 (35%) estuvieron entre los 20 más grandes a peso comercial, indicando que al seleccionar los reproductores más grandes no precisamente estamos seleccionando los camarones que fueron más grandes a peso comercial, y viceversa. Por lo tanto, sugieren mejorar la tasa de crecimiento seleccionando individualmente *L. vannamei* a peso comercial antes que como reproductores.

2.2.2. MARCADORES MOLECULARES.

Los marcadores moleculares tienen muchas aplicaciones en los programas de selección del camarón, incluyendo la identificación individual de animales, el rastreo del parentesco o consanguinidad, la determinación de la diversidad genética y ayudan en la selección de características de importancia económica tales como el crecimiento y la resistencia a enfermedades (Lai, 1999). Con la selección asistida por marcadores genéticos, ésta puede ser acelerada, debido a que se podría seleccionar organismos a una edad temprana, sin la necesidad de pruebas basadas en el fenotipo. Esto puede incrementar la intensidad de selección y reducir los costos de un programa de selección (Stern y Galli, 1999). Existen muchas técnicas de biología molecular adecuadas para encontrar estos marcadores, la selección de una técnica molecular para generar marcadores depende del objetivo específico, el poder analítico (resolución entre muestras) requiere además conocimiento, tiempo y dinero (Ranamukhaarachchi *et al*, 2000).

2.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN GENÉTICA.

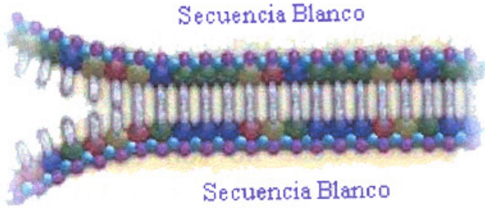
En los pasados diez años, las herramientas genéticas a menudo han complementado los programas de selección de plantas y animales (Lai, 1999). Estas herramientas permiten conocer algunas características del genoma de un individuo, pudiéndose utilizar esta información para hacer más eficientes los programas de selección. Estas técnicas se basan en buscar marcadores genéticos que puedan ser correlacionados con características de interés (crecimiento, resistencia a enfermedades, etc.). Para encontrar estos marcadores hay diferentes técnicas, teniendo todas en común el estudio del ADN (Galli, 1999).

2.3.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

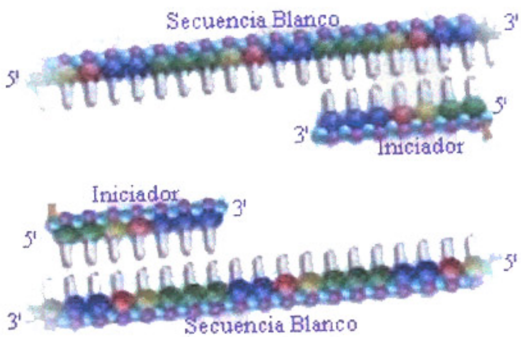
La reacción en cadena de la polimerasa es una nueva herramienta de biología molecular, muy útil en el estudio de las características genéticas de los individuos, esta técnica fue desarrollada en 1985 por Kary Mullis. La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ácidos nucleicos, altamente sensitiva, por el cual una simple molécula de ADN puede ser específicamente replicada (Saiki, 1990).

Una típica reacción de amplificación comprende; una muestra de ADN genómico (procedente de los cromosomas) o cDNA (ADN sintetizado a partir de mRNA); ADN polimeraza, enzima que va a ser la encargada de realizar la síntesis de las nuevas moléculas de ADN; dos iniciadores o *primers* de oligonucleótidos complementarios a la secuencia de ácidos nucleótidos que flanqueen la región que queremos amplificar; desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) en proporciones similares que serán los "bloques de construcción" de las moléculas de ADN que están siendo sintetizadas; un estabilizador de la reacción; Magnesio y otros aditivos adicionales. Los componentes de la reacción son mezclados y esta mezcla es colocada en un termociclador, el cual es un instrumento automatizado que da lugar a la reacción utilizando diferentes temperaturas con tiempos variados. Esta serie de ajustes en la temperatura y el tiempo están referidos a un ciclo de amplificación, cada ciclo teóricamente duplica el número de moléculas de ADN y consta de un número de pasos:

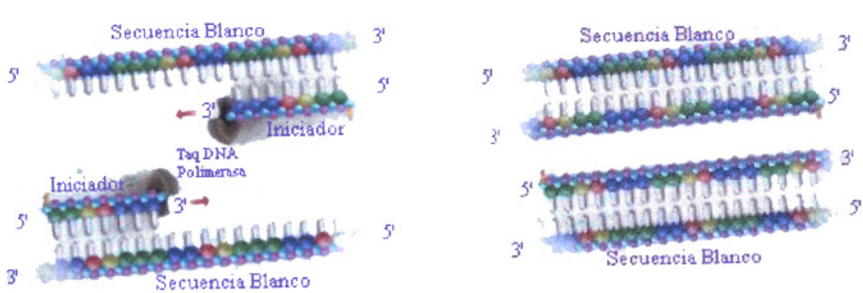
Brevemente, la PCR consiste en la desnaturalización de la cadena de ADN por calentamiento a 95 °C por 1 minuto, en el proceso de desnaturalización las cadenas de ADN se separan una de la otra. En el siguiente paso del ciclo se reduce la temperatura a aproximadamente 40-60 °C, a esta temperatura los iniciadores forman asociaciones estables con la cadena de ADN separada y sirven como iniciadores para la síntesis de ADN de la secuencia que queremos amplificar. Este paso dura entre 30 y 60 segundos y se lo denomina alineación o hibridación. Finalmente, la síntesis de la nueva cadena comienza cuando la temperatura de la reacción es óptima para el ADN polimerasa, entonces es elevada a aproximadamente 74°C, la extensión del iniciador por el ADN polimerasa dura aproximadamente de 1-2 minutos. Este paso completa un ciclo, y el siguiente ciclo comienza nuevamente con la desnaturalización a 95°C. Después de 20-40 ciclos existirá suficiente cantidad de ADN para ser analizado en diversos requerimientos (Innis y Gelfand, 1990).



Paso 1. Desnaturalización.



Paso 2. Hibridación.



Paso 3. Extensión.

Fig. 1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

2.3.2. SECUENCIAS SIMPLES REPETIDAS (SSRs).

Dentro del genoma de todos los organismos hay secciones donde se repiten secuencias cortas, llamadas "Microsatélites" (Lai, Jones y Boeing, 1999). Es una nueva técnica de biología molecular que promete ser conveniente para programas de mejoramiento (Beckmann y Soller, 1990; Crawford *et al*, 1994; Garcia de León *et al*, 1995).

Los microsatélites o Simples Secuencias Repetidas (SSRs), son cortas secuencias repetitivas de ADN, usualmente con menos de siete nucleótidos, con variaciones en el número de unidades repetidas. Estas secuencias de oligonucleótidos no son codificantes, es decir, no corresponden a genes (Stern y Galli, 1999). Los microsatélites están dispersos a través de la mayoría de los genomas eucarióticos, y son altamente polimórficos (Weber y May, 1989).

Los microsatélites se encuentran localizados en el mismo sitio dentro del genoma de diferentes animales de la misma especie y hasta en animales de especies estrechamente relacionadas. Dentro de estos microsatélites los componentes del ADN (llamados alelos) tienen variaciones que pueden ser usadas para determinar diferencias entre animales, familias o poblaciones de la misma especie (Lai, Jones y Boeing, 1999).

La variación de los microsatélites puede ser detectada por PCR. Se utilizan iniciadores que flanqueen las secuencias repetidas del ADN. Hay dos formas para detectar loci de microsatélites, uno de los métodos es buscando a través de la base de datos de la secuencia de ADN para secuencias que contengan repeticiones simples, los iniciadores son directamente diseñados de los datos de la secuencia. El segundo método es digiriendo el ADN y clonando los fragmentos dentro de un vector, el clon correcto es identificado usando una sonda molecular, los fragmentos de ADN son re-aislados del clon para ser secuenciados. Los iniciadores son diseñados y la muestra de ADN es sometida a la PCR, donde se obtienen fragmentos de diferente longitud que pueden ser visualizados por electroforesis. Es la diferencia en longitud (y peso) la que genera patrones característicos de cada individuo (Stern y Galli, 1999).

Los microsatélites han sido usados como marcadores genéticos en Róbalo (Garcia de Leon *et al*, 1995), Salmón (Slettan, Olsaker y Lie, 1993), en camarones (Wolfus, García y Alcívar-Warren, 1997; Goyard *et al*, 1999; Moore *et al*, 1999; CENIACUA, 2000) y en otras especies acuáticas.

Los microsatélites de *L. vannamei* pueden ser usados como marcadores para identificar y distinguir individualmente a un camarón sin importar su procedencia u origen. Esencialmente un animal puede tener su código de identificación (Lai, Jones y Boeing, 1999).

2.3.3. SECUENCIAS ENTRE SECUENCIAS SIMPLES REPETIDAS (ISSRs).

Los marcadores ISSRs son fragmentos de ADN (100-3000 pb) localizados entre microsatélites adyacentes, con orientación opuesta, representan secuencias aleatorias en el genoma (secuencias codificantes o no codificantes). Es una técnica relativamente nueva, los primeros estudios que emplearon marcadores ISSRs fueron publicados en 1994, los cuales estuvieron enfocados a identificar las variantes genotípicas de plantas importantes para la agricultura (Zietkiewicz, Rafalski y Labuda, 1994; Gupta *et al*, 1994).

Un estudio significativo fue la evaluación de su utilidad como un sistema de marcador genético en trigo, en este trabajo los ISSRs son comparados con otras técnicas como los RFLPs y RAPDs. Los autores de este trabajo concluyen que los marcadores ISSRs son más fáciles de manejar, más confiables una vez optimizados, son altamente polimórficos y son útiles marcadores no solo para caracterizar líneas de trigo sino que también pueden ser aplicados en cualquier otro grupo de plantas. De esta manera los ISSRs del ADN fueron planteados como una nueva fuente de marcador genético que supera muchas de las limitaciones de RFLP y RAPD (Nagaoka y Ogihara, 1997).

Los ISSRs son generados usando un solo iniciador en una reacción de PCR, este iniciador es diseñado de regiones de microsatélites con uno o tres nucleótidos extras en su extremo 3'. El nucleótido extra permitirá la amplificación, sólo si el iniciador se híbrida al extremo 5' de un microsatélite, y se combina con el primer nucleótido fuera del microsatélite. Estos nucleótidos extras aseguran que la amplificación siempre inicie desde el extremo 5' del microsatélite. El producto de amplificación es separado en un gel por electroforesis y el análisis se realiza en base a la ausencia o presencia de fragmentos de tamaño particular (Zietkiewicz, Rafalski y Labuda, 1994).

Con el uso de esta técnica se pueden obtener entre 10-60 fragmentos en una reacción (Zietkiewicz, Rafalski y Labuda, 1994). La obtención de los marcadores ISSRs depende de la frecuencia y variedad de los microsatélites, los cuales cambian con la especie y las secuencias SSRs que son sitiadas (Morgante y Olivieri, 1993; citado por Blair, Panaud y McCouch, 1999). Los ISSRs son adecuados para detectar polimorfismos, y pueden ser aplicados en estudios de identidad genética, parentesco e identificación de líneas, adicionalmente, los ISSRs también se consideran útiles para estudios de mapeo genético (Zietkiewicz, Rafalski y Labuda, 1994).

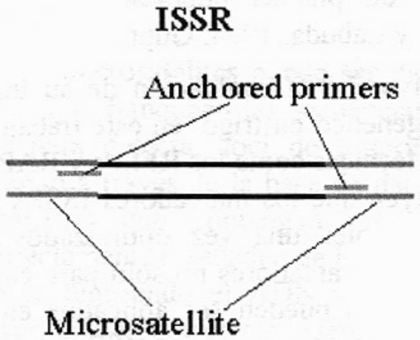


Fig. 2. Secuencias entre Secuencias Simples Repetidas (ISSRs).

No existe mucha información acerca del uso de esta técnica en camarones, el único reporte encontrado lo publica Denise García (www.csusm.edu/dgarcia/#top) quien propone, entre otras técnicas, el uso de los ISSRs para identificar marcadores genéticos de resistencia a IHHNV (Infectious Hematopoyetic Hipodermic Necrosis Virus, por sus siglas en inglés) en camarones *L. stylirostris*. Además señala la utilidad de esta técnica en los programas de selección de camarones, ya que estos marcadores también pueden ser usados para producir camarones más grandes y resistentes a enfermedades a un costo razonable por ser una técnica rápida y económica.

Si los ISSRs solo han sido utilizados en especies vegetales ¿Por qué creer que funcionaran en camarones? Gupta *et al* (1994) y Goodwin *et al* (1997) concuerdan con el principio fundamental de esta teoría, ya que ellos manifiestan que esta técnica puede ser empleada para cualquier especie que contenga un número suficiente y una distribución de secuencias SSR, sin la necesidad de conocer previamente la secuencia del genoma.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

3.1.1. LEVANTAMIENTO DE POST-LARVAS HASTA 1g.

Se utilizaron 2200 post-larvas 13 *Litopenaeus vannamei* procedentes de larvicultura comercial. Las post-larvas fueron sembrados en un tanque de fibra de vidrio de 4,18 m^2 y un volumen de 3,16 m^3, en el cual se instaló una línea de aquamats® de 3 m de longitud y se adicionó 50 L de algas bentónicas (*Amphora sp.*) y 100 mL/m^3 de fertilizante (medio Guillard). El alimento utilizado para este levantamiento fue CENAIM 40 al 10% de la biomasa, la rutina de alimentación consistía en 4 dosis diarias (08h00, 14h00, 18h00, 00h00). Este cultivo fue mantenido sin recambio de agua, con aireación suplementaria y tuvo una duración de 6 semanas.

Los animales del grupo E15 fueron donados como pre-juveniles por PROMOGEN Cia. Ltda. Estos animales provenían de larvicultura comercial y fueron cultivados desde post-larvas en las instalaciones experimentales de CENAIM.

3.1.2. LEVANTAMIENTO DE JUVENILES *L. vannamei.*

Cuando las post-larvas alcanzaron un peso promedio de 1 g fueron tomados al azar 800 camarones y distribuidos en dos grupos con 400 animales cada uno. Cada grupo fue cultivado en un tanque de fibra de vidrio de 4,18 m^2 y un volumen de 3,16 m^3 y mantenidos con aireación suplementaria durante todo el periodo de cultivo. En estas unidades experimentales, a las que llamaremos por cuestiones técnicas como E13 y E14, se utilizó una línea de Aquamats® de 3 m de longitud, con el propósito de proporcionar una superficie biofiltradora (denitrificación, reducción de los niveles de amonio) mediante la actividad de las comunidades de microorganismos que se adhieren a esta superficie (Bratvold y Browdy, 2001).

El alimento utilizado en este levantamiento fue CENAIM 40, la rutina de alimentación consistía en 4 dosis diarias (08h00, 14h00, 18h00 y 00h00). Inicialmente los camarones fueron alimentados con el 7% de su biomasa, después de la quinta semana de cultivo y debido al sobrante de alimento el porcentaje de alimentación fue disminuido al 5%. La cantidad de alimento suministrado se ajustaba semanalmente con cada muestreo.

El crecimiento en peso de los camarones fue evaluado mediante muestreos semanales. Se capturaban 30 individuos de cada tanque, se los secaba y pesaba individualmente. Finalizado el muestreo, los animales eran devueltos a sus respectivos tanques.

3.1.2.1. Grupo Experimental E13.

Se sembraron 400 camarones juveniles con un peso promedio inicial de 1,1±0,1 g, a una densidad de 100 individuos/m^2 aproximadamente. Al inicio de este cultivo se inocularon en el tanque experimental 50 L de algas bentónicas (*Amphora sp.*) y 100 mL/m^3. de fertilizante (medio Guillard). El sistema de cultivo se mantenía prácticamente sin recambio de agua, sólo la cantidad de agua eliminada con la limpieza diaria del tanque era recuperada (aproximadamente 200 L).

Los animales de este grupo fueron utilizados para obtener los perfiles de ISSRs cuando éstos presentaron un peso promedio de 4,8±1,0 g y 11,9±1,7 g. Estos perfiles se usaron para identificar a cada camarón y obtener sus datos de peso en las dos clases de tamaño mencionadas, y finalmente realizar una correlación entre estas dos clases de peso (usando los datos de cada individuo de la población).

Para obtener ADN de camarón sin sacrificar el animal, el tejido utilizado para este propósito fue un pleópodo de cada individuo en cada toma de datos.

- **Extracción de pleópodos.**

Cuando los animales presentaron un peso promedio de 4,8±1,0 g, fue realizada la primera extracción de pleópodos. Los camarones fueron cosechados y colocados en un tanque de menor capacidad (500 L). Para capturar los animales fue necesario retirar gran parte del agua del tanque trasladándola momentáneamente a un pequeño reservorio para luego ser devuelta. El agua no fue eliminada debido a los microorganismos contenidos en ella, los cuales representan un fecundo recurso de alimento (proteínas, vitaminas y minerales) para el camarón (Tacon, 2000).

Antes de pesar a cada camarón se eliminaba el exceso de agua que contenía, el peso fue medido utilizando una balanza Scout OHAUS®. Se tomaba el dato de peso del animal y seguidamente se procedía a extraerle un pleópodo, este procedimiento se repetía con todos los individuos de la población. Terminado este proceso los animales eran devueltos al tanque de cultivo original.

Cuando los animales alcanzaron un peso promedio de 11,9±1,7 g, se procedió a tomar los últimos datos de peso y muestras de tejido (pleópodos). Las muestras fueron colocadas individualmente en tubos de 1,5 mL con 300 µL de etanol 99,9% y mantenidas en refrigeración hasta el momento en que fueron procesadas.

3.1.2.2. Grupo Experimental E14.

En este cultivo se utilizaron 400 camarones juveniles con un peso promedio inicial de 1,0±0,4 g. Los animales fueron sembrados a una densidad de 100 individuos/m^2 aproximadamente. El sistema de manejo utilizado para este cultivo fue similar al cultivo descrito anteriormente, con la diferencia de que al momento de inocular algas no se adicionó fertilizante.

Otro método para diferenciar individualmente a los camarones que son mantenidos bajo las mismas condiciones ambientales es mediante el uso de unas marcas a base de pinturas fluorescentes llamadas elastómeros, los que se inyectan en los segmentos abdominales del animal. Los camarones de este grupo fueron marcados con elastómeros para su posterior identificación.

- **Marcaje de camarones con elastómeros.**

Los animales fueron cosechados y colocados en un segundo tanque de menor volumen (500 L), provisto con agua procedente del tanque principal. Durante la cosecha el agua fue trasladada momentáneamente a otro tanque para ser reutilizada. Antes de marcar los animales, estos fueron secados y pesados individualmente.

Para marcar los animales se utilizaron siete colores de elastómeros, los cuales fueron inyectados en el cuarto, quinto y sexto segmento abdominal (Fig. 3) de acuerdo a un código previamente elaborado basado en estos colores. Para la inyección de elastómeros se utilizaron jeringuillas desechables de 300 µL e inyectores manuales. Finalizado el proceso de marcaje los animales fueron devueltos al tanque de cultivo.

En el grupo E14 trescientos veinte camarones fueron marcados en un peso promedio de 6,5±1,4 g. Cuando los animales presentaron un peso promedio de 11,4±1,3 g fueron cosechados y pesados individualmente, se anotaron los datos del peso y el respectivo código de cada animal.

Fig. 3. Camarón *L. vannamei* marcado con elastómeros.

3.1.3. GRUPO EXPERIMENTAL E15.

Concluido el levantamiento de los grupos experimentales E13 y E14 se realizó otro cultivo de 400 camarones juveniles, con el propósito de obtener correlaciones entre tres diferentes clases de peso y confirmar la correlación obtenida en el grupo E14. Los camarones fueron sembrados en un peso promedio inicial de 1,8±0,5 g, a una densidad de 100 individuos/m^2 aproximadamente. Este levantamiento se realizó empleando el mismo sistema de manejo de los cultivos anteriores.

En este cultivo también se utilizaron elastómeros como sistema de identificación individual de los camarones. Trescientos cuarenta y tres animales fueron marcados en el momento de la siembra (1,8±0,5 g), cuando mostraron un peso promedio de 6,6±1,2 g y 11,7±2,0 g fueron pesados individualmente, registrándose su respectivo código.

3.2. OBTENCIÓN DE PERFILES GENÉTICOS.

Para obtener los perfiles genéticos de cada camarón fue necesario extraer su ADN, someterlo a un proceso de amplificación por PCR y a una electroforesis usando geles de poliacrilamida.

3.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN DE CAMARÓN.

El tejido utilizado para extraer ADN de camarón fue un pleópodo. Las muestras fueron preservadas individualmente. El ADN fue extraído por el método de Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) tomando como referencia el protocolo descrito por Garcia *et al* (1994), al cual se le hicieron algunas modificaciones.

Para el proceso de extracción las muestras fueron colocadas en tubos de 1,5 mL y tratadas con Proteinasa K (100 µg/mL) y CTAB 2% (0,1 M tris-base pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA; 2% (w/v) CTAB). Las muestras fueron incubadas a 66 °C por 8 horas, luego el ADN fue extraído una vez con fenol/cloroformo (1:1) y nuevamente con un volumen igual de cloroformo. El ADN fue precipitado con 1,6 volumen de etanol 100% helado a –20 °C por 1 hora y después centrifugado, lavado con etanol 70% helado y nuevamente centrifugado, secado y resuspendido en buffer TE 1x (Tris-EDTA) (10x: 10 mM tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA).

3.2.1.1. Determinación de la concentración de ADN.

La concentración de ADN de las muestra fue determinada por absorbancia a 260 nm, utilizando una dilución 1/20 para la lectura en el espectrofotómetro (Gene Quant, PHARMACIA®). Las muestras de ADN fueron estandarizadas a una concentración de 15 ng/µL y conservadas a –20 °C.

3.2.2. AMPLIFICACIÓN DE ISSRs POR PCR.

Se evaluaron 100 iniciadores SSRs correspondientes al set Nº9 del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de British Columbia (UBCBL). El criterio para la selección de los iniciadores estuvo basado en la amplificación, reproducibilidad, número y definición de bandas.

3.2.2.1. Pruebas de amplificación.

La amplificación fue realizada en 15 µL de reacción (PCR buffer 1x; 2,5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM dNTPs; 0,8 µM de iniciador; taq ADN polimerasa (GIBCO BRL®) 1,0 U/25 µL de reacción y 30 ng de ADN genómico de camarón) bajo las condiciones descritas en el cuadro 2. La reacción de PCR fue realizada en un termociclador PTC-200 MJ Research, y el producto de esta amplificación fue sometido a electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Después de amplificar todos los iniciadores bajo las condiciones descritas, se seleccionaron los que presentaron una mayor amplificación. Con estos iniciadores se corrió otra prueba en la cual fue reducida la concentración del iniciador a 0,4 µM, este parámetro fue probado conjuntamente con la temperatura de hibridación del iniciador, las temperaturas que se ensayaron fueron: 45, 50 y 55 °C.

Finalmente se realizaron pruebas de reproducibilidad con los iniciadores que mostraron la amplificación mas adecuada, para este propósito se utilizó para cada iniciador, ADN de músculo y un pleópodo proveniente de un mismo camarón. El producto de amplificación fue separado en geles de poliacrilamida al 5%.

Cuadro 2. Condiciones de temperatura para PCR: Programa de prueba.

Etapa	Temperatura	Tiempo
1= Pre-desnaturalización	94 °C	3:00
2= Desnaturalización	94 °C	0:40
3= Hibridación	55 °C	0:40
4= Polimerización	72 °C	0:40
5= Regresar a etapa 2 y repetir 34 veces		
6= Culminación de polimerización	72 °C	5:00
7= Conservación	10 °C	5:00:00

3.2.3. ELECTROFÓRESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Los productos de amplificación fueron separados en geles del 5% de acrilamida/bis acrilamida (29:1), 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acetico,1 mM EDTA), Persulfato de amonio al 10% y 35 µL TEMED/100 mL de solución. Previo a la electroforésis la muestra fue mezclada con tampón de depósito 6x (0,25 % de Bromofenol azul, 0,25 % de xileno cianol y 40 % (w/v) de sucrosa en agua destilada). El tampón fue diluido en la muestra a una concentración 1x.

Los geles fueron sometidos a electrofóresis en presencia de tampón TAE 1x aplicando una corriente de 100 V durante 12 horas. Después de la migración del ADN los geles fueron teñidos con SYRB™ Gold 1x durante 15 min, los perfiles obtenidos fueron observados en un transiluminador UV (LIFE TECHNOLOGIES™ TFX-35M). El tamaño de los fragmentos fue determinado por comparación usando un marcador de peso molecular de 100 pb DNA ladder (GIBCO BRL®).

3.3. ANÁLISIS DE DATOS.

3.3.1. ANÁLISIS DE GELES.

Los geles fueron fotografiados individualmente con el programa 1D de Kodak en presencia de luz ultravioleta y las fotografías fueron almacenadas en un computador Macintosh 7300/180. Las imágenes fueron analizadas con el programa Diversity Database™ 2,2 de BIO-RAD para Mac.

Para iniciar con el análisis de los perfiles genéticos fue necesario crear un set de bandas. Este set fue creado usando Diversity Database™, pero también fue necesario ubicar manualmente algunas bandas que el programa no detectó. El set de bandas fue aplicado a todos los perfiles genéticos de la población y su función era comparar y localizar las bandas (de acuerdo al tamaño) que presentaba cada perfil genético.

Las bandas obtenidas de los ISSRs fueron analizadas cualitativamente por presencia (1) o ausencia (0) en cada individuo, la asociación genética fue evaluada calculando el coeficiente de similitud de Jaccard (comparando pares), basándose en la proporción de bandas compartidas producidas por el iniciador seleccionado. Los coeficientes de similitud fueron usados para un cluster análisis y construir un dendrograma, usando el método de agrupamiento de pares con promedios aritméticos (Unweighted pair-group method whith arithmetic average, UPGMA por sus siglas en inglés).

3.3.2 CORRELACIÓN DE PESO.

El análisis de correlación (momento de Pearson) se realizo con los individuos que fueron marcados con elastómeros, para este análisis se utilizo programa Data Desk 6,1.

4. RESULTADOS.

4.1. CULTIVO DE JUVENILES *Litopenaeus vannamei.*

4.1.1. GRUPOS EXPERIMENTALES E13 Y E14.

En el cuadro 3 se resumen los datos obtenidos durante el ciclo de cultivo de los grupos experimentales E13 y E14. Se observa un buen rendimiento en cuanto al crecimiento, lográndose una tasa de crecimiento semanal de 1,1 y 1,0 g hasta alcanzar un peso promedio final de 11,9±1,7 g para el grupo E13 y 11,4±1,3 g para el grupo E14 en 72 y 71 días respectivamente.

Cuadro 3. Datos del cultivo de los grupos experimentales E13 y E14.

Variables	Grupo experimental	
	E13	**E14**
Peso promedio inicial (g)	1,1 ±0,1	1,0 ±0,4
Peso promedio final(g)	11,9 ±1,7	11,4 ±1,3
Tasa de crecimiento (g/sem)	1,1	1,0
Supervivencia (%)	65	42
Animales cosechados	261	169
Tiempo de cultivo (días	72	71

La temperatura del agua en ambos tanques experimentales estuvo dentro de los límites establecidos para la especie, registrándose valores entre 27 °C y 30 °C durante el período experimental. Estos valores de la temperatura explicarían claramente el mejor crecimiento obtenido en este cultivo comparado con el crecimiento del grupo E15.

En la figura 4 se grafican las curvas de crecimiento en peso alcanzado durante el período experimental.

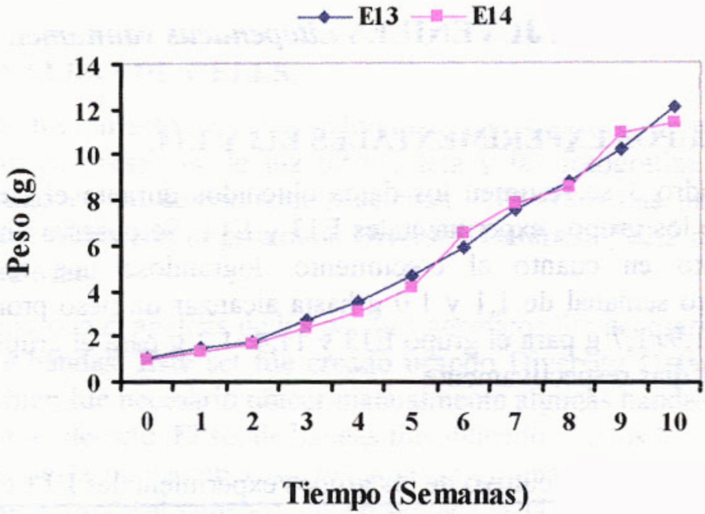


Fig. 4. Crecimiento de *L. vannamei* cultivado en tanques experimentales (Grupo E13 y E14).

4.1.2. GRUPO EXPERIMENTAL E15.

Ciento ochenta y cinco camarones fueron cosechados de este cultivo con un peso promedio de 11,7±2,0 g y una supervivencia del 48%. La tasa de crecimiento obtenida fue relativamente menor a la de los cultivos anteriores, alcanzándose 0,6 g/semana durante 16 semanas de cultivo. El cultivo de este grupo se realizo en época fría registrándose durante el período experimental una temperatura promedio de 24,5±1,4 °C, lo que explicaría el lento crecimiento de los camarones. La figura 5 muestra la curva del crecimiento en peso obtenido durante el ciclo de cultivo.

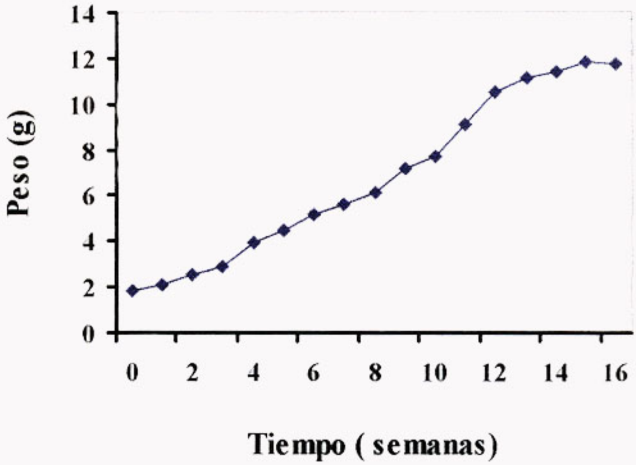


Fig. 5. Crecimiento de *L. vannamei* (grupo E15).

4.2. IDENTIFICACIÓN GENOTIPICA DE CAMARONES *L. vannamei.*

Dieciséis iniciadores fueron seleccionados (cuadro 4) en la primera prueba de amplificación. De estos iniciadores, sólo ocho (834, 835, 841, 861, 862, 864, 867, 880) presentaron un buen resultado en la amplificación con 0,4 µM y con una temperatura de hibridación de 55 °C. Sin embargo, dos fueron los iniciadores que presentaron la amplificación mas adecuada, el iniciador 864 (5' ATG ATG ATG ATG ATG ATG 3') y el iniciador 835 (5' AGA GAG AGA GAG AGA G(CT)C 3').

Cuadro 4. Iniciadores seleccionados después de la prueba de amplificación con 0,8 μM de *primer*.

Iniciador	Secuencia
807	5' AGA GAG AGA GAG AGA GT 3'
808	5' AGA GAG AGA GAG AGA GC 3'
811	5' GAG AGA GAG AGA GAG AC 3'
834	5' AGA GAG AGA GAG AGA G(CT)T 3'
835	5' AGA GAG AGA GAG AGA G(CT)C 3'
841	5' GAG AGA GAG AGA GAG A(CT)C 3'
844	5' CTC TCT CTC TCT CTC T(AG)C 3'
845	5' CTC TCT CTC TCT CTC T(AG)G 3'
859	5' TGT GTG TGT GTG TGT G(AG)C 3'
861	5' ACC ACC ACC ACC ACC ACC 3'
862	5' AGC AGC AGC AGC AGC AGC 3'
864	5' ATG ATG ATG ATG ATG ATG 3'
867	5' GGC GGC GGC GGC GGC GGC 3'
876	5' GAT AGA TAG ACA GAC A 3'
880	5' GGA GAG GAG AGG AGA 3'
881	5' GGG TGG GGT GGG GTG 3'

4.2.1. PRUEBA DE REPRODUCIBILIDAD.

Después de obtener las condiciones óptimas de amplificación (cuadro 5), los iniciadores 835 (5' AGA GAG AGA GAG AGA G(CT)C 3') y 864 (5' ATG ATG ATG ATG ATG ATG 3') fueron sometidos a pruebas de reproducibilidad. Con el iniciador 864 se obtuvo mayor número de fragmentos de ADN amplificados y mejor definición de los mismos (Fig. 6).

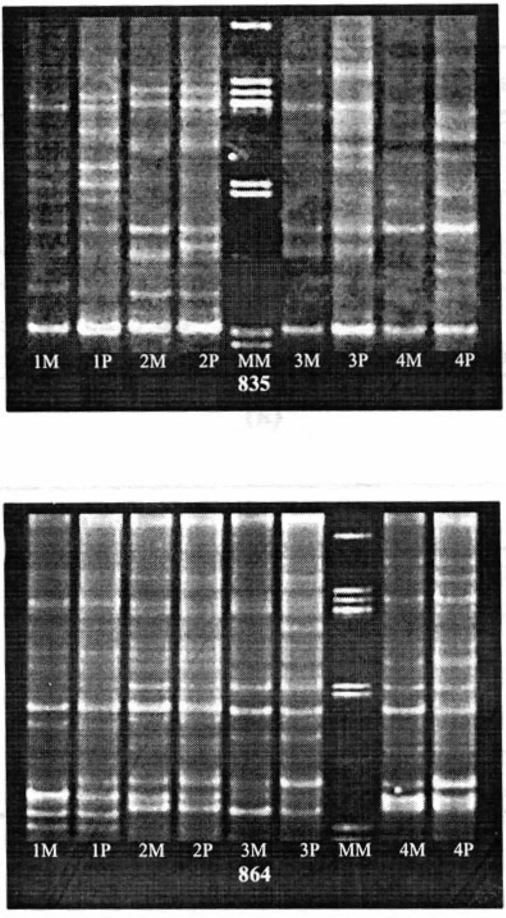


Fig. 6. Reproducibilidad de los perfiles de ISSRs con músculo y pleópodos de camarones usando los iniciadores 835 y 864.

Cuadro 5. Condiciones de amplificación. a) Concentración de reactivos en la mezcla de reacción. b) Condiciones de amplificación para ISSRs

Reactivos	Concentración de la mezcla
Agua grado PCR	Volumen necesario para 13 µL
Buffer 10X	1X
$MgCl_2$ 25 mM	2,5 mM
dNTPs 10 mM	0,2 mM
Iniciador SSR 30 µM	0,4 µM
Taq 5U/µL	1,0 U/25 µL de reacción
ADN genómico 15 ng/µL	30 ng/reacción

(a)

Etapa	Temperatura	Tiempo
1= Pre-desnaturalización	94 °C	3:00
2= Desnaturalización	94 °C	0:40
3= Hibridación	55 °C	0:40
4= Polimerización	72 °C	0:40
5= Regresar a etapa 2 y repetir 34 veces		
6= Culminación de polimerización	72 °C	5:00
7= Conservación	10 °C	5:00:00

(b)

4.2.2. ANÁLISIS DE PERFILES ISSRs.

Se obtuvieron perfiles genéticos de un total de 561 individuos, de los cuales 303 pertenecen a la primera extracción y 258 a la segunda extracción de pleópodos. El tamaño de los fragmentos amplificados por el iniciador 864 (5' ATG ATG ATG ATG ATG ATG 3') estuvo entre 100 pb y 1500 pb, pero el mayor número de bandas se concentró

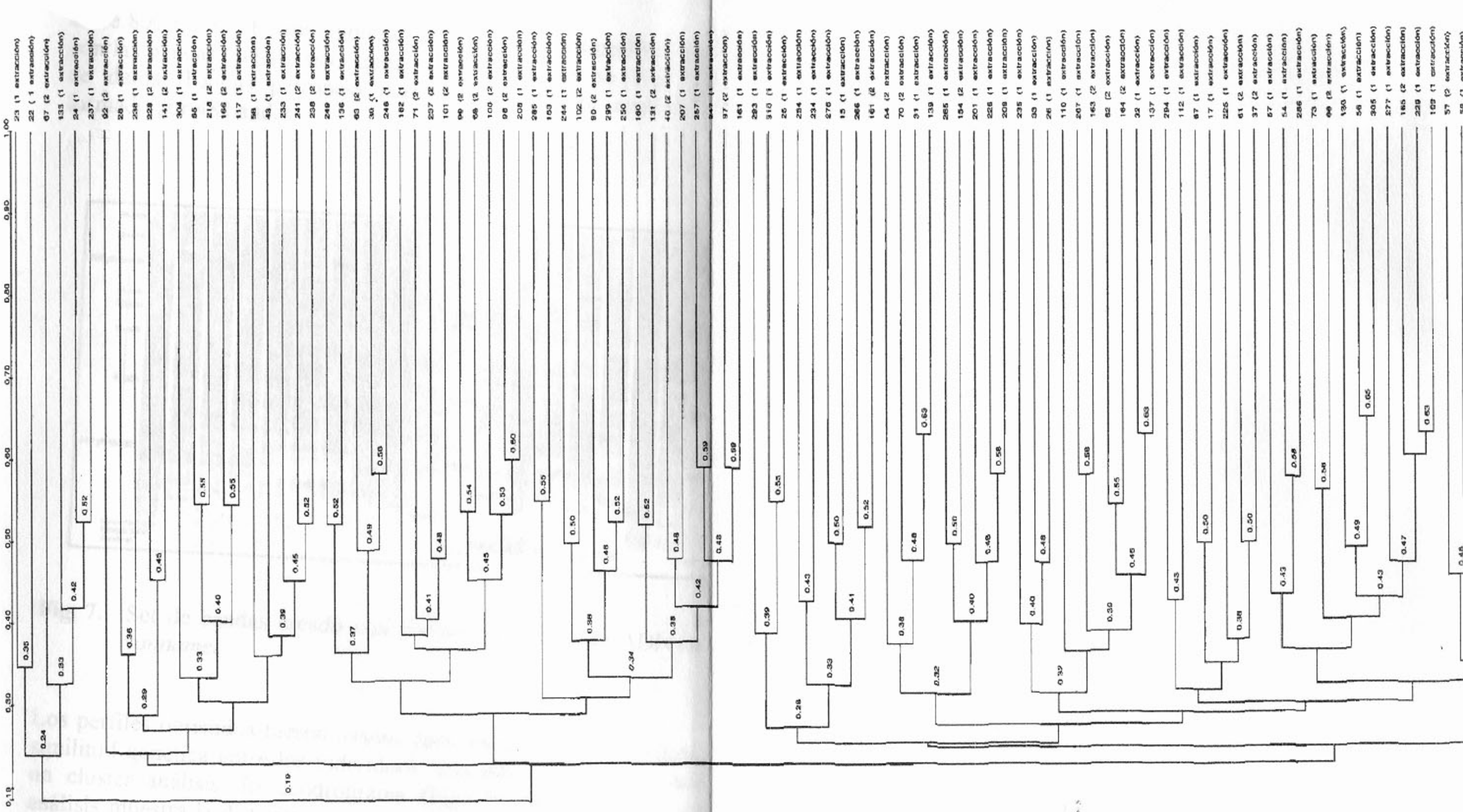
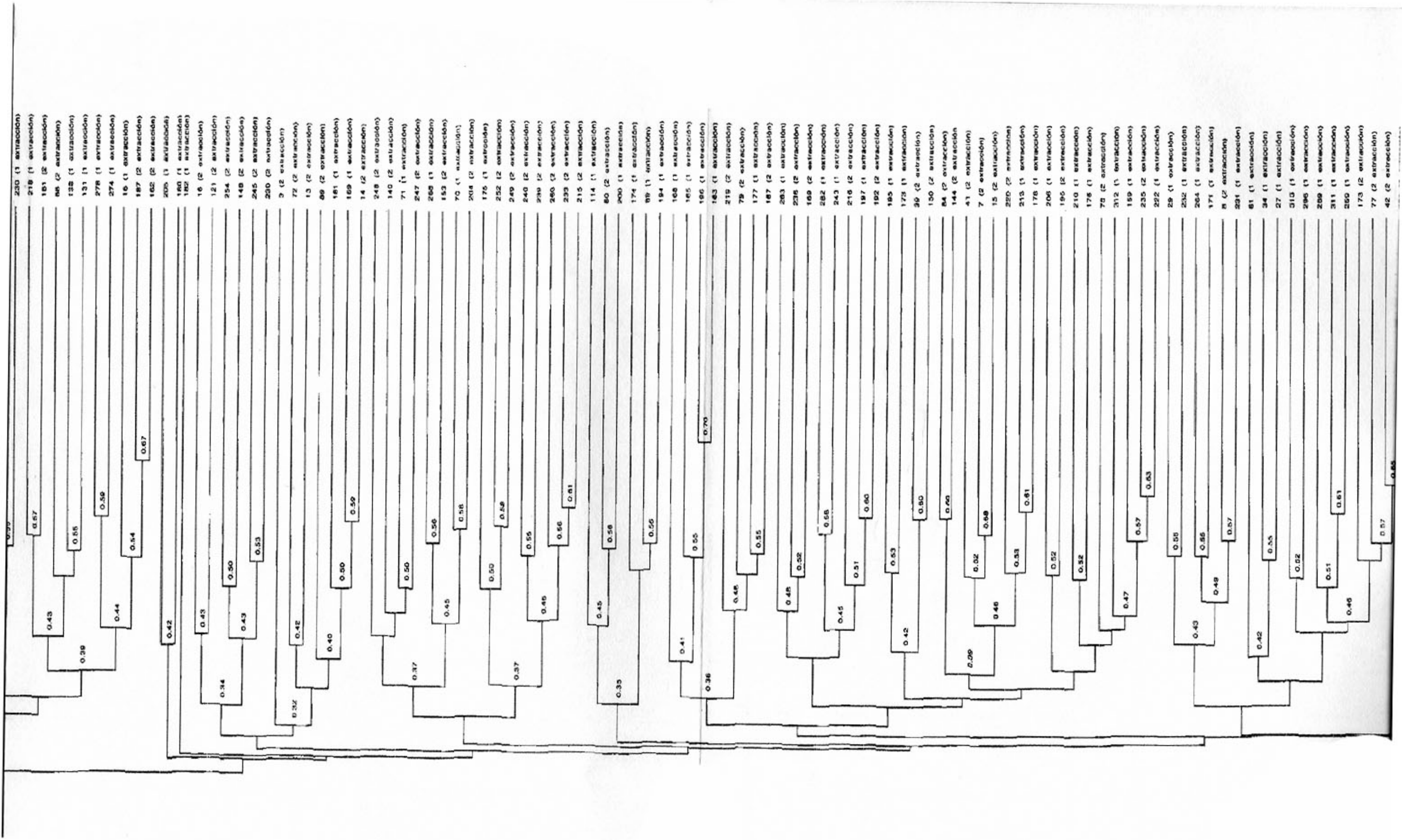
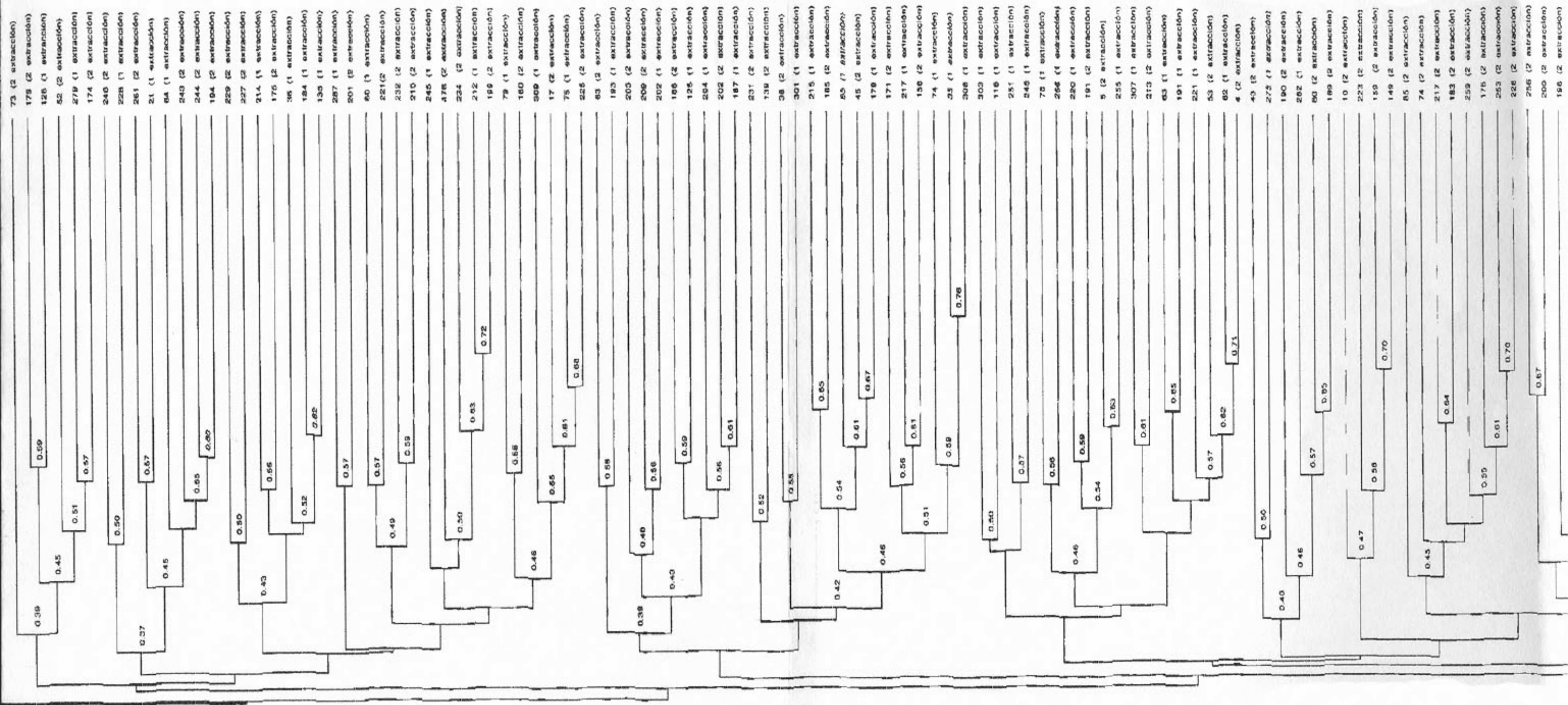
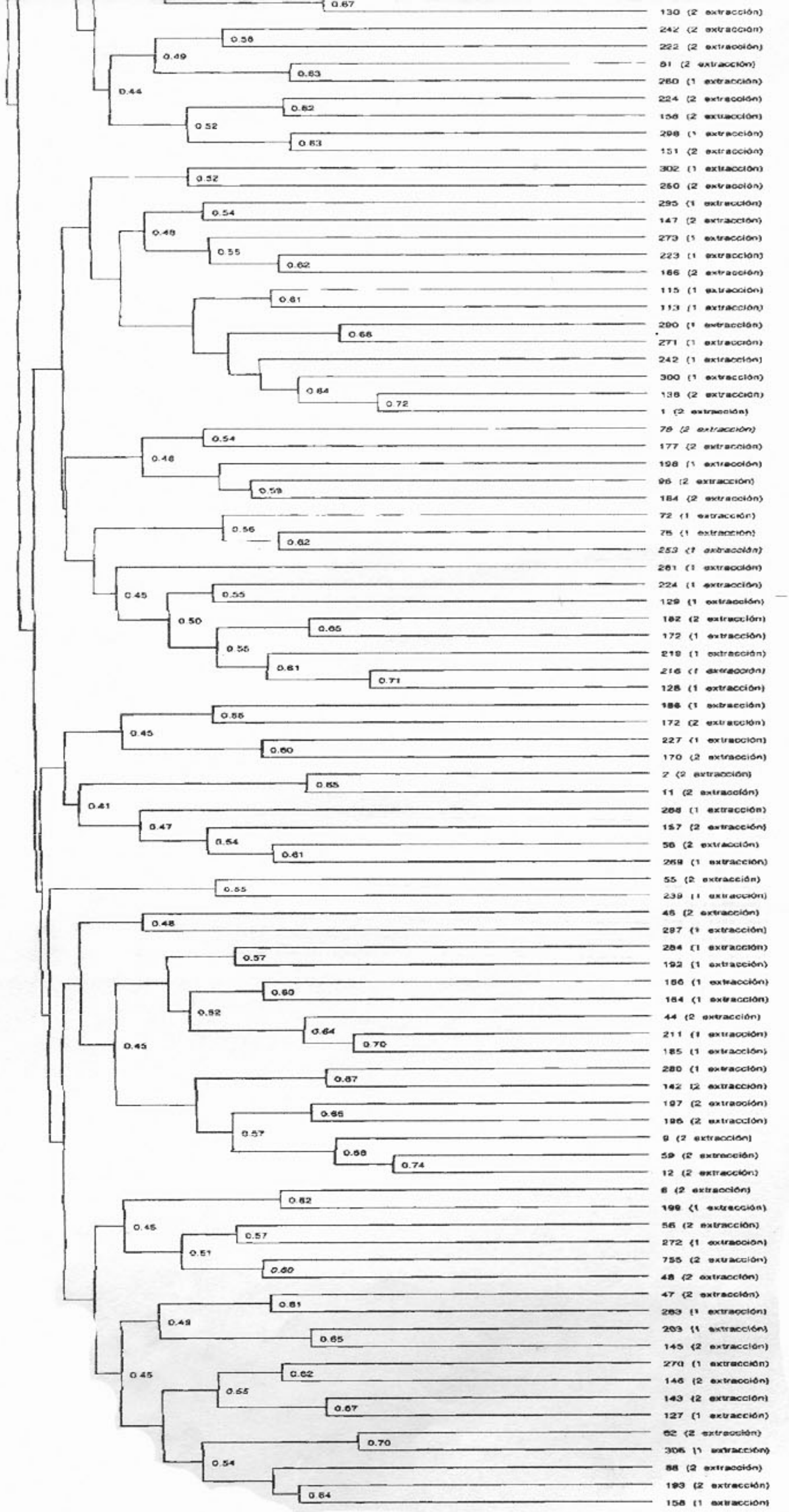


Fig. 8. Relación genética entre los individuos del grupo E13. Dendrograma basado en los perfiles de ISSRs obtenidos a 4,8 y 11,9 g (pesos promedio de la población).






130 (2 extracción)
242 (2 extracción)
222 (2 extracción)
81 (2 extracción)
260 (1 extracción)
224 (2 extracción)
156 (2 extracción)
298 (1 extracción)
151 (2 extracción)
302 (1 extracción)
250 (2 extracción)
295 (1 extracción)
147 (2 extracción)
273 (1 extracción)
223 (1 extracción)
166 (2 extracción)
115 (1 extracción)
113 (1 extracción)
290 (1 extracción)
271 (1 extracción)
242 (1 extracción)
300 (1 extracción)
138 (2 extracción)
1 (2 extracción)
78 (2 extracción)
177 (2 extracción)
198 (1 extracción)
96 (2 extracción)
184 (2 extracción)
72 (1 extracción)
75 (1 extracción)
253 (1 extracción)
261 (1 extracción)
224 (1 extracción)
129 (1 extracción)
182 (2 extracción)
172 (1 extracción)
218 (1 extracción)
216 (1 extracción)
128 (1 extracción)
186 (1 extracción)
172 (2 extracción)
227 (1 extracción)
170 (2 extracción)
2 (2 extracción)
11 (2 extracción)
288 (1 extracción)
157 (2 extracción)
56 (2 extracción)
269 (1 extracción)
55 (2 extracción)
239 (1 extracción)
46 (2 extracción)
287 (1 extracción)
284 (1 extracción)
192 (1 extracción)
186 (1 extracción)
164 (1 extracción)
44 (2 extracción)
211 (1 extracción)
185 (1 extracción)
280 (1 extracción)
142 (2 extracción)
197 (2 extracción)
195 (2 extracción)
9 (2 extracción)
59 (2 extracción)
12 (2 extracción)
6 (2 extracción)
199 (1 extracción)
56 (2 extracción)
272 (1 extracción)
755 (2 extracción)
48 (2 extracción)
47 (2 extracción)
283 (1 extracción)
203 (1 extracción)
145 (2 extracción)
270 (1 extracción)
146 (2 extracción)
143 (2 extracción)
127 (1 extracción)
62 (2 extracción)
306 (1 extracción)
88 (2 extracción)
193 (2 extracción)
158 (1 extracción)

entre 800 y 200 pb. Sin embargo, el análisis de los perfiles se realizo con las bandas que se encontraban entre 800 y 300 pb (Fig. 7). El set de datos (bandas patrones) construido para este análisis estuvo formado por 48 bandas.

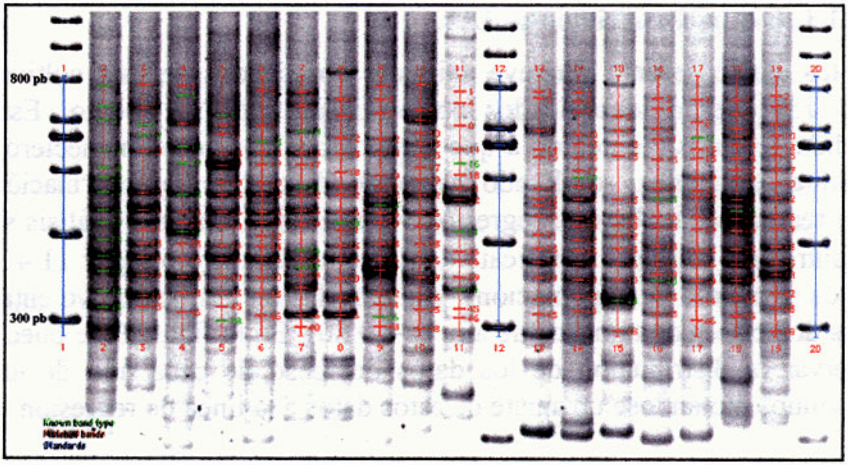


Fig. 7. Set de bandas creado con perfiles de ISSRs de ADN de *L. vannamei*.

Los perfiles obtenidos fueron usados para determinar las matrices de similitud genética entre los individuos, con estas matrices se realizo un cluster análisis. El dendrograma (Fig. 8) obtenido del cluster análisis muestra la distancia genética entre todos los individuos de la población, se obtuvieron 304 muestras relacionadas, de las cuales 174 se encontraban dentro de una misma población y solo 138 muestras eran relacionadas desde las dos poblaciones. No fue posible determinar el análisis de correlación porque los datos obtenidos del dendrograma no fueron representativos. El número de bandas utilizadas para el análisis comparativo de los perfiles genéticos fue muy bajo (48 bandas).

4.3. CORRELACIÓN DE CRECIMIENTO.

4.3.1. CORRELACIÓN EN ANIMALES IDENTIFICADOS POR ELASTÓMEROS.

4.3.1.1. Grupo Experimental E14.

De los ciento sesenta y nueve animales cosechados de este cultivo, sólo 151 fueron identificados correctamente por su código. Esta perdida de datos fue debido a que algunos códigos no permanecieron claramente visibles, resultando necesario descartar esa información para realizar el análisis de regresión y correlación. En este análisis se encontró una relación significativa ($P \leq 0,0001$) entre 6,5 g y 11,4 g (pesos promedio de la población), y la correlación que se obtuvo entre estas dos clases de tamaño fue alta ($r = 0,80$). En la figura 9 se puede observar la distribución de los datos del peso de cada uno de los individuos, notándose un ajuste de estos datos a la línea de regresión.

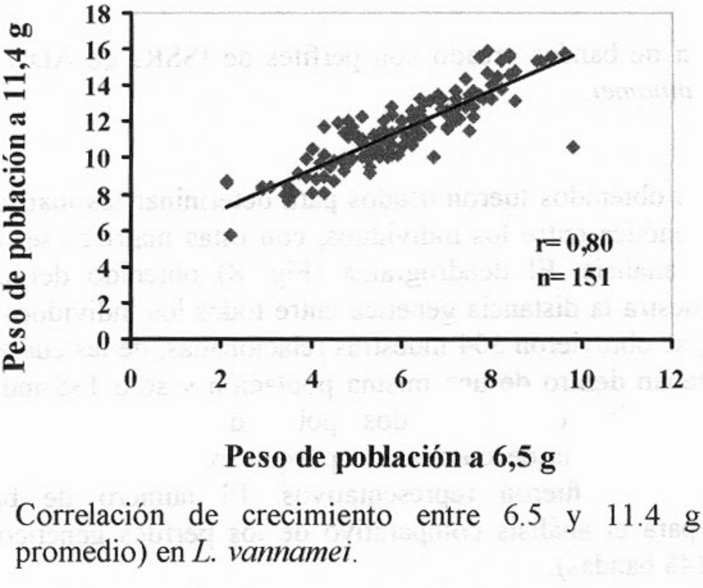


Fig. 9. Correlación de crecimiento entre 6.5 y 11.4 g (pesos promedio) en *L. vannamei*.

4.3.1.2. Grupo Experimental E15.

En este levantamiento se realizo un análisis de correlación entre tres clases de tamaño a 1,8 g; 6,6 g y 11,7 g (pesos promedio de la población), encontrándose una relación estadísticamente significativa ($P \leq 0,0001$) entre 1,8 g y 6,6 g y altamente correlacionada ($r = 0,87$; Fig. 10). Así mismo hubo una relación significativa entre 1,8 g y el peso a cosecha (11, 7 g) aunque la correlación no fue tan alta ($r= 0,68$; Fig. 11).

La correlación obtenida entre 6,6 g y el peso a cosecha (11,7 g) fue similar ($r= 0,88$; $P\leq 0,0001$) a la obtenida en el grupo E14 (Fig.12). El cuadro 6 resume los resultados de la correlación obtenida entre las tres clases de tamaño evaluadas en este grupo.

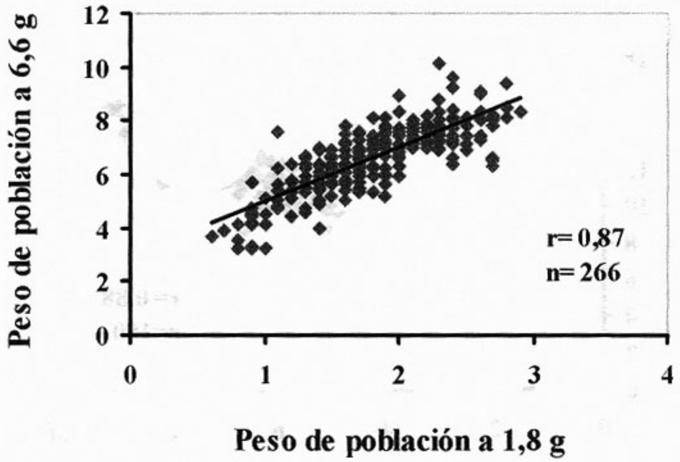


Fig. 10. Correlación de crecimiento entre 1,8 g y 6,6 g (pesos promedio) en *L. vannamei*.

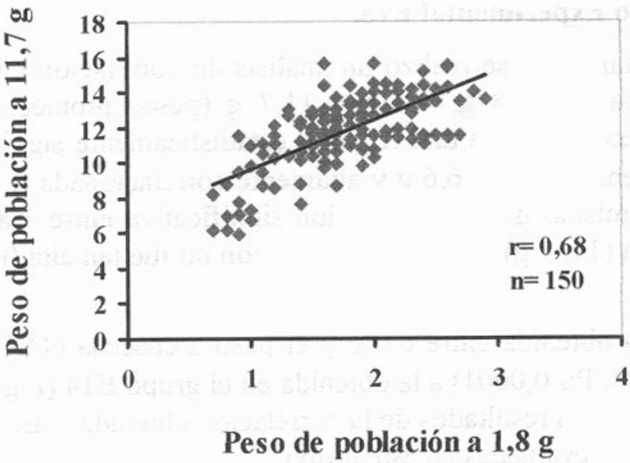


Fig. 11. Correlación de crecimiento entre 1,8 g y 11,7 g (pesos promedio) en *L. vannamei*.

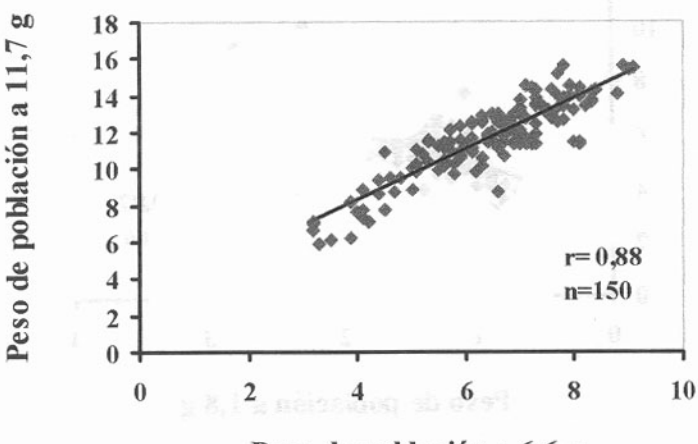


Fig. 12. Correlación de crecimiento entre 6,6 g y 11,7 g (pesos promedio) obtenida en el segundo levantamiento de *L. vannamei*.

Cuadro 6. Coeficientes de correlación entre tres clases de tamaño de camarones *Litopenaeus vannamei*.

Clases:	Pesos (g) a:			*P*
	1,8±0,5	**6,6±1,2**	**11,7±2,0**	
Pesos (g) a:				
1,8±0,5				
6,6±1,2	0,87			$P \leq 0{,}0001$
11,7±2,0	0,68	0,88		$P \leq 0{,}0001$

El cuadro 7 presenta los pesos del 10 % de los individuos más grandes a 11,7 g, indicando cuales fueron los individuos que estuvieron entre el 10% de los más grandes a 6,6 y 1,8 g. Si analizamos estos datos encontramos que sólo el 20% de los animales más grandes a cosecha estuvo entre el 10% de los animales más grandes a 1,8 g. Así mismo, sólo el 53% estuvo entre el 10% de los animales más grandes a 6,6 g.

Cuadro 7. Peso de los individuos más grandes a 11,7 g (10% de la población final) y su peso a 6,6 g y 1,8 g.

#	Código			11,7 g	6,6 g	1,8 g
1	naranja	púrpura	verde	15,6	8,9	2,0
2	amarillo	verde	verde	15,6	7,8	1,6
3	negro	rojo	azul	15,5	9,1	2,6
4	púrpura	púrpura	púrpura	15,4	9,0	2,6
5	azul	verde	rojo	15,2	7,7	2,4
6	púrpura	naranja	púrpura	14,5	7,9	2,1
7	azul	púrpura	verde	14,5	7,1	2,0
8	negro	amarillo	negro	14,4	8,1	2,4
9	verde	púrpura	negro	14,4	7,2	1,6
10	negro	negro	negro	14,3	8,4	2,4
11	amarillo	negro	azul	14,3	8,4	2,4
12	negro	negro	azul	14,3	7,6	2,2
13	naranja	rojo	azul	14,3	7,3	1,8
14	rojo	azul	púrpura	14,2	8,3	2,6
15	azul	púrpura	amarillo	14,1	8,8	2,3

5. DISCUSIÓN.

5.1. CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA

La tasa de crecimiento obtenida en los cultivos realizados en este estudio fue de 1,1 y 1,0 g/semana en los grupos E13 y E14 respectivamente (Cuadro 3), lo que es considerado como un crecimiento ideal dentro de un ciclo de cultivo (Brown, 1991). Esto se debe a que, en términos globales, los parámetros limitantes del crecimiento en los tanques de cultivo estuvieron dentro de los límites establecidos para la especie.

La temperatura que es uno de los factores más importantes que controla el crecimiento de los camarones (Wyban, Walsh y Godin, 1995) se mantuvo en un rango de 27-30 °C. Estos valores se encuentran dentro de los límites planteados por Pretto (1984), quien reporta, que las temperaturas óptimas del agua para el crecimiento rápido de los camarones son superiores a 25 °C e inferiores a los 30 °C.

Por el contrario, la tasa de crecimiento obtenida (0,6 g/sem) en el grupo E15 no fue la más adecuada desde el punto de vista productivo. Esta diferencia en la tasa de crecimiento con respecto a los grupos E13 y E14, es atribuible al efecto de la temperatura, ya que los valores medidos en el tanque de cultivo de este grupo estuvieron por debajo del límite inferior de los recomendados para la especie.

Por otra parte, el porcentaje de supervivencia o la mortalidad obtenida en ambos levantamientos, es atribuido a una leve infección de WSV (White Spot Virus, por sus siglas en inglés) que presentaron los animales al inicio del cultivo, la misma que se acentuó frente al estrés causado por la manipulación de estos animales cuando se tomaron los datos de peso (cosecha, pesaje, extracción de pleópodos e inyección de elastómeros). Esto explicaría la diferencia en los porcentajes de mortalidad obtenidos en este estudio con respecto a los datos publicados por Godin *et al* (1996), quienes reportan el 2,6% de mortalidad en juveniles *L. vannamei*, después de ser marcados con elastómeros, aunque atribuyen éste porcentaje sólo al estrés causado por cosecha y pesaje antes que a la inyección del elastómero. Hay que indicar que en ambos experimentos se realizaron 2 y 3 pesajes, lo cual influyó en la inducción de stress en los animales cultivados.

5.2. AMPLIFICACIÓN DE ISSRs EN *L. vannamei.*

Después de varias pruebas para obtener las condiciones óptimas de amplificación, las bandas ISSRs fueron obtenidas en camarones *L. vannamei*. Aunque los mejores resultados en cuanto al número y definición de bandas se obtuvieron con el trinucleótido $(ATG)_6$, no se descarta que los demás iniciadores que fueron probados no sean adecuados para ser aplicados en estudios genéticos del camarón, es posible que las diferencias encontradas en la amplificación de éstos iniciadores sean debido a la condiciones óptimas de hibridación de los oligonucleótidos usados como iniciadores ISSRs (Panaud *et al*, 1995; citado por Blair, Panaud y McCouch, 1999). Básicamente, las condiciones de amplificación deben optimizarse para cada iniciador.

A pesar de que los ISSRs demostraron ser útiles para amplificar ADN de camarón, los resultados obtenidos en el proceso de identificación de individuos no fueron los propuestos. El dendrograma (Fig. 8) construido usando los perfiles de ISSRs no presentó la relación genética esperada entre dos muestras pertenecientes a un mismo individuo. Este resultado podría ser explicado por el pequeño número de datos (48 bandas) que conformaban el set de bandas a partir del cual se realizo el análisis de los perfiles genéticos, pues este análisis fue realizado con un número grande de individuos pertenecientes a una misma especie y posiblemente provenientes de una misma familia. Por lo tanto, la distancia genética entre los individuos de esta población debe ser muy estrecha.

Alternativamente se puede considerar que la estrategia de separación y cálculos de tamaño de bandas no fue la adecuada. En este trabajo se utilizó una cámara de electroforesis vertical de 20 cm. de longitud y marcadores de talla de entre 1500 y 100 pbs. En el pequeño espacio de separación muchas bandas pueden no haberse separado adecuadamente. Trabajos realizados en CENAIM (datos no publicados) posteriores a esta investigación demuestran que geles verticales de 40 cm. con tinción de plata muestran una mejor separación de bandas así como reproducibilidad de perfiles en amplificaciones del mismo individuo.

5.3. CORRELACIÓN DE CRECIMIENTO EN ANIMALES IDENTIFICADOS POR ELASTÓMEROS.

La correlación obtenida entre las tres clases de tamaño evaluadas fueron generalmente alta. Observándose una correlación más baja (r= 0,68) entre el peso promedio inicial (1,8 g) y el peso promedio a cosecha (11,7 g). Sin embargo, del 10% de los individuos que crecieron más rápido a cosecha sólo el 20% estuvo entre el 10% de los animales más grandes a 1,8 g. Así mismo, del 10% de los individuos más grandes a cosecha el 53% estuvo entre el 10 % de los animales más grandes a 6,6 g. Según estos datos, seleccionar los individuos más grandes a una edad temprana no significa exactamente que estamos seleccionando los mejores individuos para mejorar la tasa de crecimiento.

Esto podría explicarse si analizamos que las curvas de crecimiento individuales no son constantes, pueden cruzarse unas a otras repetidamente durante el crecimiento de la población influenciadas por factores genéticos y medioambientales, los cuales determinan el crecimiento del animal sobre todo en estadíos juveniles. Por ejemplo, existe la competitividad por el alimento, los individuos más grandes o más activos le ganaran a los más pequeños y como consecuencia comerán más y crecerán más, aumentando las diferencias de tamaño desde estadíos tempranos y haciéndolas permanentes independientemente de sí tienen o no originalmente una base genética. Sin embargo nuestros datos demuestran que muchos de los animales que crecen muy rápido al inicio disminuyen su tasa de ganancia de peso y son superados posteriormente por animales que inicialmente fueron más pequeños.

Las diferentes etapas del desarrollo son controladas por diferentes genes. En un proceso de crecimiento diferentes sets de genes se activan e inactivan en forma coordinada siendo este juego coordinado el que permite el desarrollo armónico del individuo. Cada camarón tiene diferente complemento genético para cada etapa de desarrollo y esto explicaría las diferentes curvas de crecimiento. Por ejemplo, si un camarón A tiene un buen complemento para el desarrollo durante la primera etapa (digamos hasta 1,0 g), pero un mal complemento para la segunda etapa (6,0 g) su curva de crecimiento será diferente a un camarón B que tenga un mal complemento genético para la primera etapa pero bueno para la segunda etapa. Es la tarea del programa de selección genética aislar animales cuyos complementos genéticos sean buenos para todas las etapas de desarrollo y utilizarlos como padres de la nueva generación mejorada.

Por otro lado, la selección temprana antes de tamaño cosecha podría ser una eficiente estrategia para incrementar la intensidad de selección. Para ello se deberían realizar selecciones sucesivas, es decir, seleccionamos primero a una edad temprana (según nuestros datos podría ser a 6,0 g) los individuos más grandes y luego seleccionamos nuevamente cuando alcancen el peso comercial, de esta manera se incrementaría la presión de selección al seleccionar solo los individuos que se encuentren entre los más grandes en ambas ocasiones. Por ejemplo, en un proceso de selección masal utilizamos una presión de selección correspondiente al 1% cuando la población está primero a 6,0 g y luego sobre esos animales seleccionados aplicamos otra selección del 10%, cuando lleguen a tamaño cosecha se podrá aplicar una selección del 0,1%. Obviamente consideraciones sobre variabilidad genética del grupo seleccionado deberán ser tomadas en cuenta ya que a más alta la presión de selección mayor es la erosión genética de la población. Sin embargo mientras mayor es la presión de selección mayor es la ganancia genética por ciclo de selección.*

---

* PÉREZ, F. 2002. Comunicación Personal (CENAIM).

6. CONCLUSIONES.

- La selección temprana única no es un indicador confiable para la selección del peso total del camarón cuando se va a mejorar la tasa de crecimiento a cosecha. Los datos de correlación indican que una selección en tandem, es decir a diferentes etapas, podría ser efectiva en un programa de selección enfocado a mejorar la tasa de crecimiento del camarón blanco *L. vannamei*.
- La técnica de ISSRs demostró ser funcional para amplificar ADN de camarones *L. vannamei*. Es una técnica fácil de manejar, rápida, costo-efectiva y altamente polimorfica. Y puede ser útilmente aplicada para encontrar marcadores genéticos específicos de alguna característica que tenga importancia para los programas de mejoramiento.
- No fue posible realizar la identificación individual de camarones mediante los perfiles de ISSRs en este trabajo. Sin embargo, no se descarta la utilidad de esta técnica para este propósito hasta que no se realicen estudios mas detallados acerca del uso de ISSRs en camarones *L. vannamei*.

7. RESUMEN.

Los objetivos de este estudio fueron establecer la correlación entre el peso a una edad temprana y el peso a cosecha en *Litopenaeus vannamei* e implementar la técnica de Microsatélites anclados o ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeat, por sus siglas en inglés) para identificarlos individualmente. Se utilizaron tres grupos de camarones (E13, E14, E15) con 400 individuos (~l g) cada uno. Con el grupo E13 se obtuvieron los perfiles de ISSRs, el resultado del análisis de estos perfiles no permitió lograr el objetivo propuesto (identificar individualmente). Sin embargo, esta técnica demostró ser funcional para amplificar ADN de camarones *L. vannamei* y podría convertirse en una nueva herramienta de trabajo para el estudio de las características genéticas de camarones. Por otro lado los individuos de los grupos E14 y E15 fueron marcados con elastómeros para su identificación y la correlación se hizo entre tres clases de tamaño a 1,8 g, 6,6 g y 11,7 g (pesos promedio de la población). Hubo una relación significativa ($P \leq 0,0001$) entre las tres clases, la correlación más baja se obtuvo entre 1,8 g y 11,7 g ($r = 0,68$). Sin embargo, del 10% de los individuos que crecieron más rápido a cosecha sólo el 20% estuvo entre el 10% de los animales más grandes a 1,8 g. Así mismo, del 10% de los individuos más grandes a cosecha el 53% estuvo entre el 10 % de los animales más grandes a 6,6 g. La selección temprana única no parece ser un indicador confiable para la selección del peso total del camarón cuando se va a mejorar la tasa de crecimiento a cosecha. Esta información podría ser aplicada en procesos de selección secuencial para incrementar la presión de selección y por ende la ganancia genética por ciclo en programas enfocados a mejorar la tasa de crecimiento.

8. SUMMARY.

The objectives of this study were to establish the correlation among the weight to an early age and the weight to crop in *Litopenaeus vannamei* and to implement the technique of anchored Microsatellites or ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeats) to identify them individually. Three groups of shrimps were used (E13, E14, E15) with 400 individuals (~l g) each one. With the group E13 the profiles of ISSRs were obtained, the result of the analysis of these profiles didn't allow to achieve the proposed objective (to identify individually). However, this technique demonstrated to be functional to amplify DNA of shrimps *L. vannamei* and it could become a new work tool for the study of the genetic characteristics of shrimps. On the other hand the individuals of the groups E14 and E15 were marked with elastomers for their identification and the correlation was made among three size classes to 1,8 g, 6,6 g and 11,7g (the population's average weight). There was a significant relationship (P=0,0001) among the three classes, the lowest correlation was obtained between 1,8 g and 11,7 g (r = 0,68). However, from the 10% of the individuals that grew quicker to harvest, only the 20% was among the 10% of the biggest animals to 1,8 g. Likewise, from the 10% of the biggest individuals to harvest, only the 53% was among the 10% from the biggest animals to 6,6 g. The early growth doesn't seem to be a good indicator of breeding value for total growth at harvest. This information could be applied in processes of sequential selection to increase the selection pressure and of course the genetic gain for cycle in programs focused to improve the rate of growth at harvest.

9. BIBLIOGRAFÍA.

ALVAREZ JURADO, G. 1987. Genética y Acuicultura. *In*,______. Genética en Acuicultura. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, España. pp. 1-31.

ARGUE, B.J., ARCE, S.M. y MOSS, S.M. 2000. Correlation between two size classes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its potential implications for selective breeding programs. Journal of the World Aquaculture Society 31(1): 119-122.

BAUTISTA, C. 1994. Crustáceos, tecnología de cultivo. España, Editorial Grafo, S.A. Bilbao. 180 p.

BECKMANN, J. y SOLLER, M. 1990. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. Bio/Technology 8: 930-932.

BLAIR, M.W., PANAUD, O. y MCCOUCH, S.R. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa L.*). Theoretical and applied genetics 98: 780-792.

BRATVOLD, D. y BROWDY, C. 2001. Effects of sand sediment and vertical surface (AquaMats™) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. Aquaculture 195: 81-94.

BROWN, C. 1991. Marine Penaeid shrimp. *In*,______. Production of aquatic animals crustaceans, molluscs, amphibians and reptiles. Elsevier science publishers B.V., Amsterdam. pp. 21-30.

CENIACUA. 1999. Colombia's closed-cycle program for penaeid shrimp genetic selection and improvement. Global Aquaculture Advocate 2(6): 71, 83-84.

_______. 2000. A la vanguardia en desarrollo de genética en camarón de cultivo. Panorama Acuícola 5(6): 14-17.

CNA. 2000. Industria camaronera hacia la reactivación. Acuacultura del Ecuador 38:12-15.

CRAWFORD, A.M., MONTGOMERY, G.W., PIERSON, C.A., BROWN, T., DODDS, K.G., SUNDEN, S.L.F., HENRY, H.M., EDE, A.J., SWARBRICK, P.A., BERRYMAN, T., PENTY, J.M. y HILL, D.F. 1994. Sheep linkage mapping: nineteen linkage groups derived from the analysis of paternal half-sib families. Genetics 137: 573-579.

CROCOS, P., PRESTON, N. y LEHNERT, S. 1999. Genetic improvement of farmed prawns in Australia. Global Aquaculture Advocate 2(6): 62-63.

CUN, M. 1982. Guía práctica para la cría de camarones commercial (Penaeus) en Ecuador. Instituto Nacional de Pesca, Ecuador. Boletín Científico y Técnico 5(1): 28.

DE LA LOMA, J.L. 1963. Genética general y aplicada. Chapingo, México. pp. 333, 419, 613-614, 617-618.

EL-IBIARY, H.M., HILL, T.K., JOYCE, J.A. y ANDREWS, J.W. 1979. Phenotype correlations between commercial characters in channel catfish. Proceedings of the Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies 32: 420-425.

GALLI, L. 1999. Técnicas de caracterización genéticas aplicables a programas de selección. V Congreso Ecuatoriano de Acuicultura Memorias. Guayaquil, Ecuador: 78.

GARCÍA, D.K., FAGGART, M.A., RHOADES, L., WYBAN, J.A., CARR, W.H., SWEENEY, J.N., EBERT, K.M. y ALCIVAR-WARREN, A.A. 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. Molecular Marine Biology Biotechnology 3: 270-280.

GARCÍA DE LEÓN, F.J., DALLAS, J.F., CHATAIN, B., CANONNE, M., VERSINI, J.J. y BONHOMME, F. 1995.

Development and use of microsatellite markers in sea bass *Dicentrarchus labrax* (linnaeus, 1758) (Perciformes: Serrandidae). Molecular Marine Biology Biotechnology 4: 62-68.

GJEDREM, T. 2002. Selective breeding, essential for further productivity, sustainability in aquaculture. Global Aquaculture Advocate 5(1): 46-47.

_______. 1999. Aquaculture needs genetically improved animals. Global Aquaculture Advocate 2(6): 69-70.

_______. 1997. Selective breeding to improve aquaculture production. World Aquaculture 28(1): 33-45.

GODIN, D.M., CARR, W.H., HAGINO, G., SEGURA, F., SWEENEY, J.N. y BLANKENSHIP, L. 1996. Evaluation of a fluorescent elastomer internal tag in juvenile and adult shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture 139: 243-248.

GOYARD, E., PATROIS, J., PEIGNON, J., VANAA, V., DUFOUR, R., BÉDIER, E. 1999. IFREMER's shrimp genetics program. Global Aquaculture Advocate 2(6): 26-28.

GUPTA, M., CHYI, Y-S., ROMERO-SEVERSON, J. y OWEN, J.L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Theoretical and Applied Genetics 89: 998-1006.

IBARRA, A.M. 2000. Métodos óptimos para el mejoramiento genético del camarón, ostión y de la almeja catarina. Panorama Acuícola 5(5): 38-41.

_______. 1998. Mejoramiento genético en la acuicultura, una realidad en peces. ¿Por qué no en camarón?. II Simposium Internacional de Acuacultura. Mazatlan, Sinaloa, México: 135-146.

INNIS, M.A. y GELFAND, D.H. 1990. Optimization of PCRs. *In*,_______. PCR protocols. Academic Press, San Diego, California. pp. 3-12.

JORY, D.E. 2000. Situación de la Acuicultura Camaronera al 2000. Acuacultura del Ecuador 38: 34-45.

LAI, L. 1999. Microsatellites: genetic markers of choice. Global Aquaculture Advocate 2(6): 32, 55.

_______, JONES, K. y BOEING, P. 1999. Marcadores para la selección genética de cualidades deseables en los camarones de cultivo. V Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Memorias. Guayaquil, Ecuador: 79.

LEE, D., WICKINS, J. 1997. Biología. *In* Cultivo de crustáceos. Acribia, S.A., Zaragoza, España. pp. 15-21.

MOORE, S.S., WHAN, V., DAVIS, G.P., BYRNE, K., HETZEL, D.J.S y PRESTON, N. 1999. The development and applications of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture 173: 19-32.

MOSS, S., ARGUE, B. y ARCE, S. 1999. Genetic improvement of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at the oceanic institute. Global Aquaculture Advocate 2(6): 41-43.

NAGAOKA, T. y OGIHARA, Y. 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.

NEWKIRK, G.F. 1980. Review of the genetics and the potential for selective breeding of commercially important bivalves. Aquaculture 19: 209-228.

PILLAY, T.V.R. 1997. Acuicultura principios y prácticas. Limusa, México. pp. 211-217.

PRETTO, R. 1984. Manual de cría de camarones peneidos en estanques de agues salobres. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. Dirección Nacional de Acuicultura, Panáma. pp. 54.

RANAMUKHAARACHCHI, D.G., KANE, M.E., GUY, C.L. y LI, Q.B. 2000. Modified AFLP technique for rapid genetic characterization in plants. BioTechniques 29: 858-866.

SAIKI, R.K. 1990. Amplification of genomic DNA. *In*,_______. PCR protocols. Academic Press, San Diego, California. pp. 13-20.

SLETTAN, A., OLSAKER, I. y LIE, O. 1993. Isolation and characterization of variable $(GT)_n$ repetitive sequences from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Animal Genetic 24: 195-197.

STERN, S. y GALLI, L. 1999. Molecular biology tools applied to selection programs. Global Aquaculture Advocate 2(6): 67-68.

SWIFT, D. 1985. Aquaculture training manual. Farnham, Surrey, England:135.

TACON, A. 2000. Shrimp feeds and feeding regimes in zero-exchange outdoor tanks. Global Aquaculture Advocate 3(2): 15-16.

TAVE, D. 1993. Genetic for fish hatchery managers. Segunda edición. AVI, New York, USA.

WEBER, J.L. y MAY, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal of Human Genetic 44: 388-396.

WEIDNER, D., REVORD, T., WELLS, R., MANUAR, A. 1992. World shrimp culture. National oceanic and atmospheric administration. Silver Spring, Maryland 2(3): 883-917.

WOLFUS, G.M., GARCIA, D.K. y ALCIVAR-WARREN, A. 1997. Application of the microsatellites technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. Aquaculture 152: 35-47.

WYBAN, J., WALSH, W.A. y GODIN, D.M. 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the pacific white shrimp. Aquaculture 138: 267-279.

WWW.CSUSM.EDU/DGARCIA/#TOP.HTML. Identification of genetic marker(s) for IHHNV resistance in *Penaeus stylirostris* shrimp using the techniques: random amplified polymorphic DNA, inter-simple sequence repeats and expressed sequence tags.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A. y LABUDA, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.

10. APÉNDICE.

Apéndice 1. Protocolo optimizado para extraer ADN de pleópodos de camarón.

En un tubo eppendorf de 1,5 mL:

1. Colocar 4 µL de Proteinaza K y 396 µL de CTAB.
2. Colocar la muestra (1 pleópodo).
3. Bortexear por 10 segundos.
4. Incubar en baño maría a 66 °C durante 8 horas.
5. Macerar la muestra.
6. Incubar nuevamente en baño maría a 66 °C por 2 horas.
7. Retirar y añadir 200 µL de fenol y 200 µL de cloroformo.
8. Agitar ligeramente el tubo y centrifugar a 14000 rpm por 5 min.
9. Recuperar 350 µL de sobrenadante, colocar en otro tubo y,
10. Añadir 350 µL de cloroformo.
11. Agitar ligeramente y centrifugar a 14000 rpm por 5 min.
12. Recuperar y transferir 300 µL del sobrenadante y,
13. Añadir 500 µL de etanol (100%) helado.
14. Dejar a -20 °C durante 1 hora.
15. Centrifugar a 14000 rpm por 5 min.

15\. Retirar el etanol y agregar 500 µL de etanol (70%) helado.

15\. Centrifugar a 14000 rpm por 5 min.

16. Retirar el etanol y dejar secar el pellet.
17. Disolver el pellet en 100 µL de TE buffer 1X.
18. Preservar el ADN a -20 °C ó a 4 °C.

Apéndice 2. Crecimiento semanal en peso de los grupos experimentales E13 y E14 durante el ciclo de cultivo. (Gramos).

	Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		Semana 7		Semana 8		Semana 9	
#	E13	E14	E13	E14	E13	E14	E13	E14	E13	E14	E13	E14	E13	E14	E13	E14
1	2,9	2,1	3,1	3,6	3,5	3,6	5,6	6,2	8,8	4,0	9,1	8,3	11,2	9,5	13,0	12,3
2	1,4	1,7	3,6	2,6	4,1	5,2	5,4	8,8	10,1	9,5	10,4	7,9	11,2	10,0	10,9	10,5
3	2,3	1,4	3,0	5,2	4,4	4,1	6,4	7,1	8,3	9,1	9,6	9,8	11,7	14,7	11,4	11,7
4	1,1	2,6	2,9	2,2	4,5	5,3	5,8	8,4	9,9	7,4	5,7	6,2	9,7	13,2	11,2	9,4
5	1,1	2,6	3,5	3,9	5,0	3,3	3,7	7,3	7,7	8,7	10,1	9,5	8,0	11,3	15,4	9,6
6	1,7	2,7	3,3	2,4	5,1	2,9	7,3	7,6	8,3	5,5	8,5	9,2	10,2	10,2	13,3	11,4
7	1,9	1,2	3,4	3,4	4,4	5,9	6,1	5,1	6,8	9,8	6,5	7,2	10,1	12,9	12,5	12,1
8	1,5	1,9	3,9	3,6	5,0	4,2	5,0	5,8	8,0	8,2	8,9	9,1	10,3	10,2	13,6	10,1
9	1,9	2,0	3,8	2,3	5,8	4,3	6,2	7,7	4,8	7,9	8,8	7,2	9,9	11,8	11,9	10,6
10	2,5	1,8	3,4	1,6	5,2	3,2	6,7	6,8	6,1	6,2	8,5	9,7	10,3	11,2	11,6	11,8
11	2,1	1,4	4,8	2,8	3,3	3,3	5,6	6,5	4,7	9,4	6,0	12,6	9,8	10,6	9,3	11,6
12	1,9	1,2	3,0	2,4	4,9	6,1	5,6	5,4	6,4	7,5	9,5	10,7	10,3	13,7	9,5	11,1
13	1,6	1,1	2,6	4,0	4,9	4,0	7,5	5,9	7,2	7,7	6,7	7,8	9,2	12,1	16,5	15,2
14	2,6	1,5	3,8	3,7	3,4	5,5	6,8	5,9	6,8	12,9	10,7	7,5	11,9	12,3	10,6	10,1
15	1,4	1,6	4,3	3,7	5,3	3,6	5,1	9,6	8,8	6,5	8,7	8,3	10,2	10,4	10,0	9,5
16	2,1	1,1	3,3	2,2	4,0	2,8	6,8	5,5	7,9	7,8	5,1	9,6	9,9	9,6	11,7	11,7
17	2,8	1,9	4,4	2,7	6,4	4,4	6,9	7,2	8,7	7,5	8,9	10,0	12,4	11,2	13,7	12,7
18	2,9	1,9	3,5	2,8	4,6	4,3	4,4	3,7	9,3	7,2	8,9	7,8	8,0	11,5	11,8	12,8
19	1,7	1,9	3,8	4,2	4,7	4,5	7,5	5,9	8,3	8,2	4,7	8,5	10,6	8,0	11,2	12,4
20	1,6	1,3	2,7	2,9	4,4	5,6	5,6	6,6	8,1	8,6	6,6	11,4	9,6	4,7	11,1	11,8
21	1,7	0,8	4,7	3,6	4,6	2,3	3,9	5,6	7,0	7,8	9,1	6,5	11,4	15,5	14,8	10,7
22	1,7	1,3	4,6	3,2	4,9	6,3	5,7	6,0	6,9	8,7	7,5	6,4	10,1	7,5	14,5	12,9
23	2,4	2,9	2,6	1,8	5,6	2,9	7,6	6,6	5,5	6,8	9,6	8,7	10,1	5,8	12,3	11,1
24	2,4	1,3	3,5	3,5	6,3	4,8	7,8	7,9	8,2	7,8	6,4	5,6	10,4	11,4	8,3	12,2
25	2,1	2,1	3,1	2,4	5,0	6,0	5,2	5,6	7,2	9,3	10,5	11,7	12,3	9,5	13,1	11,0
26	2,2	1,0	2,7	2,7	4,2	3,3	6,7	5,7	8,8	7,2	8,3	9,6	7,5	13,5	14,2	12,2
27	0,9	1,4	2,8	3,9	6,2	3,5	5,0	3,2	8,9	6,2	8,7	7,9	10,5	13,4	8,5	12,5
28	1,3	1,8	3,3	5,0	3,0	4,9	5,7	6,2	6,9	4,6	10,3	9,5	8,8	10,5	13,2	10,4
29	0,5	1,1	4,9	0,6	5,0	4,0	7,2	6,8	9,2	9,1	9,5	4,9	11,2	9,1	13,0	8,6
30	0,9	0,9	4,0	3,1	4,4	3,2	4,7	9,1	5,0	7,0	11,3	10,8	9,3	11,2	12,1	11,6
AVER	1,8	1,7	3,5	3,1	4,7	4,2	6,0	6,5	7,6	7,8	8,4	8,7	10,2	10,9	12,1	11,4
SD	0,6	0,6	0,7	1,0	0,8	1,1	1,1	1,4	1,4	1,7	1,7	1,8	1,2	2,4	2,0	1,3

Apéndice 3. Crecimiento semanal en peso del grupo experimental E15 durante el ciclo de cultivo. (Gramos).

#	Semanas														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	15	16
1	1,3	2,9	3,1	4,3	2,9	6,1	6,0	6,5	6,9	7,5	11,2	12,7	10,2	9,3	11,6
2	1,7	2,8	2,9	5,0	2,2	6,1	6,3	4,6	9,1	8,0	9,2	11,9	9,7	10,7	7,3
3	1,9	3,7	2,0	4,4	5,3	5,9	5,6	6,1	7,4	4,9	8,7	11,8	11,6	13,6	6,1
4	2,6	1,7	4,0	3,5	3,3	5,1	4,7	6,4	6,7	6,2	10,7	7,9	10,3	12,1	12,3
5	2,5	3,2	3,6	4,7	4,4	6,2	4,9	5,9	7,9	9,0	9,6	12,2	8,2	15,0	13,6
6	2,1	2,5	2,4	4,5	4,4	5,8	5,9	5,0	6,5	9,0	12,1	9,9	13,0	12,6	13,4
7	2,1	1,3	3,0	2,8	4,5	6,8	7,8	7,3	7,9	9,0	12,2	7,4	12,7	11,1	15,3
8	2,6	3,3	2,5	4,6	5,3	3,1	6,4	7,3	8,7	9,0	9,1	14,0	11,0	12,0	11,0
9	2,0	2,4	3,3	3,9	6,2	5,8	4,5	5,2	6,8	8,9	10,8	11,4	12,3	11,7	12,4
10	2,2	2,6	2,7	3,6	5,3	6,1	4,5	6,1	6,7	9,8	12,2	11,8	11,9	13,2	12,7
11	2,5	2,4	2,6	3,7	4,2	5,9	6,0	3,8	7,1	8,9	10,4	10,7	12,1	12,6	11,7
12	2,6	2,3	1,5	3,8	3,8	4,5	6,4	7,3	6,2	5,9	11,0	11,7	15,0	14,0	10,5
13	2,0	2,6	2,9	1,7	4,2	5,4	4,6	8,3	9,8	8,6	12,5	13,0	9,6	13,6	11,9
14	2,5	2,7	2,0	4,9	4,5	4,7	2,9	4,0	5,6	5,0	5,3	8,8	13,6	11,8	9,4
15	2,5	2,7	3,5	4,0	3,3	4,8	5,2	5,5	7,0	7,2	10,5	8,7	10,5	10,1	13,7
16	2,1	2,4	4,1	6,2	4,4	2,1	6,7	5,4	5,3	7,3	11,0	10,1	11,3	13,2	11,7
17	1,9	2,6	3,5	4,7	4,6	5,9	6,9	6,8	5,6	9,3	13,7	12,2	12,3	8,0	11,7
18	2,3	2,7	1,8	3,2	4,3	3,9	5,0	6,5	7,6	9,1	10,5	13,2	13,1	10,4	9,9
19	1,5	2,8	2,9	2,5	4,7	5,4	5,9	7,6	5,8	5,4	10,4	12,4	6,6	12,5	12,9
20	1,6	3,0	2,8	4,3	3,1	4,4	4,9	6,4	8,6	6,9	9,2	11,1	12,0	12,0	13,1
21		2,8	3,0	3,5	5,2	5,8	6,2	6,9	8,7	7,6	10,3	11,9	13,9	9,9	13,1
22		3,3	3,0	4,2	5,5	4,6	5,2	8,5	7,5	7,9	9,4	13,4	11,8	11,1	11,8
23		2,7	3,2	3,4	4,0	5,2	5,5	7,0	8,9	7,3	12,0	11,3	12,7	12,7	12,1
24		2,3	3,0	3,6	3,6	5,2	4,9	7,8	7,8	9,4	5,8	11,3	11,9	9,0	7,5
25		2,7	2,9	4,3	5,2	3,6	4,6	5,9	8,8	8,3	10,2	10,7	9,5	11,0	12,6
26		1,3	3,5	2,0	4,2	6,7	4,9	6,3	5,1	8,7	11,5	10,3	11,8	12,2	14,2
27		2,9	2,9	3,9	4,6	2,9	5,7	6,3	6,7	9,7	11,9	8,4	11,3	14,3	12,6
28		2,1	2,7	5,1	4,9	6,0	4,6	6,8	5,8	6,7	7,0	9,8	13,8	11,2	12,0
29		1,9	3,4	4,6	5,7	6,0	3,2	4,4	5,5	8,1	11,1	9,1	13,5	11,3	11,0
30		2,1	1,6	3,2	4,6	6,7	4,6	5,1	6,5	7,7	5,9	12,5	12,3	12,3	13,6
AVER	2,1	2,6	2,9	3,9	4,4	5,2	5,4	6,2	7,2	7,9	10,2	11,1	11,7	11,8	11,8
SD	0,4	0,5	0,6	0,9	0,9	1,2	1,0	1,2	1,3	1,4	2,0	1,7	1,8	1,6	2,0

Apéndice 4. Peso de los camarones del grupo E13 en la primera extracción de pleópodos a 4,8±1,0 g.

#	(g)	#	(g)	#	(g)	#	(g)	#	(g)	#	(g)
1	6,3	53	4,6	105	4,7	157	3,7	209	4,5	261	5,3
2	6,0	54	4,6	106	3,3	158	5,8	210	4,4	262	4,5
3	3,3	55	5,7	107	5,5	159	6,5	211	3,8	263	3,6
4	4,8	56	4,2	108	3,8	160	4,3	212	5,9	264	6,9
5	4,4	57	3,6	109	4,7	161	5,7	213	4,4	265	4,5
6	6,0	58	2,0	110	4,9	162	4,8	214	4,4	266	4,6
7	6,7	59	3,1	111	4,3	163	4,4	215	4,4	267	4,4
8	4,8	60	3,4	112	5,1	164	3,4	216	2,8	268	5,0
9	6,0	61	4,0	113	4,3	165	4,4	217	5,2	269	6,4
10	5,1	62	4,8	114	7,0	166	5,5	218	3,3	270	6,5
11	4,2	63	5,5	115	5,6	167	5,5	219	5,1	271	3,4
12	5,3	64	4,9	116	5,4	168	7,0	220	5,1	272	5,3
13	5,6	65	3,5	117	5,6	169	3,4	221	4,2	273	4,1
14	5,5	66	2,5	118	2,9	170	5,3	222	5,0	274	5,2
15	4,9	67	5,8	119	4,9	171	6,4	223	4,3	275	4,4
16	5,2	68	4,9	120	4,3	172	3,2	224	3,2	276	4,4
17	6,1	69	5,5	121	3,6	173	4,3	225	4,3	277	5,8
18	6,5	70	5,5	122	4,9	174	6,0	226	6,1	278	4,0
19	3,5	71	6,2	123	3,1	175	3,1	227	2,6	279	5,2
20	5,9	72	5,3	124	4,0	176	3,0	228	3,9	280	4,9
21	4,5	73	3,3	125	5,0	177	6,9	229	6,6	281	2,3
22	4,0	74	4,5	126	2,5	178	5,5	230	5,5	282	4,6
23	6,2	75	5,2	127	5,7	179	3,6	231	3,5	283	4,9
24	5,4	76	3,8	128	5,8	180	5,6	232	3,7	284	5,1
25	7,0	77	5,3	129	5,9	181	4,5	233	5,2	285	4,2
26	5,9	78	5,7	130	3,8	182	7,5	234	6,7	286	5,9
27	4,7	79	4,9	131	4,6	183	5,9	235	3,8	287	5,8
28	5,0	80	5,7	132	5,8	184	5,4	236	4,0	288	5,0
29	4,7	81	3,4	133	5,3	185	4,2	237	7,1	289	3,5
30	5,3	82	5,2	134	5,1	186	4,7	238	7,3	290	4,5
31	6,6	83	4,2	135	5,7	187	5,0	239	6,1	291	6,0
32	6,0	84	5,4	136	4,5	188	6,2	240	5,9	292	4,2
33	6,0	85	4,5	137	4,6	189	4,0	241	5,2	293	4,8
34	4,6	86	6,1	138	5,7	190	3,3	242	5,8	294	4,8
35	5,1	87	6,0	139	4,3	191	4,7	243	4,0	295	3,7
36	4,0	88	4,9	140	4,8	192	4,9	244	3,7	296	5,8
37	4,8	89	4,9	141	4,5	193	3,1	245	4,7	297	5,3
38	4,1	90	5,3	142	4,9	194	4,4	246	5,2	298	3,0
39	4,8	91	4,9	143	5,0	195	4,9	247	3,3	299	5,2
40	5,9	92	4,6	144	6,0	196	3,0	248	4,8	300	4,0
41	4,8	93	4,9	145	5,0	197	4,1	249	4,8	301	5,1
42	5,7	94	6,1	146	4,5	198	4,2	250	5,1	302	3,0
43	4,5	95	3,9	147	4,8	199	4,9	251	8,3	303	6,1
44	4,5	96	4,5	148	2,6	200	4,8	252	5,6	304	4,8
45	5,6	97	4,3	149	3,6	201	5,4	253	3,9	305	3,9
46	4,0	98	4,8	150	6,6	202	4,5	254	5,0	306	5,3
47	4,2	99	4,2	151	4,0	203	4,7	255	4,2	307	5,5
48	4,0	100	2,9	152	7,2	204	4,3	256	5,7	308	4,8
49	5,7	101	4,4	153	5,2	205	4,5	257	3,5	309	4,1
50	4,1	102	5,2	154	4,1	206	5,7	258	4,9	310	4,3
51	6,2	103	6,6	155	5,3	207	4,8	259	3,9	311	4,6
52	4,2	104	2,4	156	6,2	208	5,0	260	5,3	312	4,1

Apéndice 5. Peso de los camarones del grupo E13 en la segunda extracción de pleópodos a 11,9±1,7 g.

#	(g)	#	(g)	#	(g)	#	(g)	#	(g)	#	(g)
1	10,5	46	9,7	91	12,5	136	11,3	181	11,1	226	11,4
2	12,3	47	12,7	92	11,9	137	9,5	182	10,7	227	11,6
3	16,3	48	13,0	93	13,1	138	14,5	183	12,3	228	14,2
4	10,2	49	10,4	94	12,6	139	11,7	184	11,5	229	14,2
5	12,8	50	10,6	95	11,8	140	12,8	185	8,0	230	10,8
6	14,0	51	12,8	96	12,8	141	13,7	186	9,1	231	12,7
7	10,3	52	12,6	97	11,3	142	9,6	187	10,9	232	13,8
8	12,7	53	13,8	98	11,9	143	12,2	188	11,5	233	13,4
9	12,5	54	10,1	99	12,9	144	11,2	189	13,7	234	8,7
10	12,4	55	14,3	100	12,4	145	14,0	190	15,8	235	13,5
11	11,6	56	13,3	101	10,9	146	11,2	191	10,5	236	14,1
12	13,5	57	11,3	102	12,6	147	13,7	192	11,2	237	12,3
13	12,8	58	11,9	103	14,8	148	12,2	193	11,2	238	12,1
14	11,1	59	11,2	104	11,0	149	11,5	194	7,8	239	12,3
15	12,3	60	11,7	105	10,6	150	11,5	195	10,0	240	11,0
16	11,5	61	12,5	106	13,3	151	13,2	196	10,0	241	10,3
17	11,7	62	11,8	107	11,3	152	13,3	197	11,8	242	10,4
18	11,1	63	11,4	108	8,9	153	10,1	198	10,4	243	10,8
19	11,3	64	12,2	109	10,5	154	10,0	199	13,3	244	10,2
20	11,6	65	12,4	110	13,3	155	12,0	200	11,8	245	13,8
21	12,4	66	12,8	111	15,3	156	10,3	201	11,1	246	10,5
22	10,7	67	13,2	112	12,7	157	12,5	202	10,7	247	12,0
23	12,9	68	13,3	113	11,2	158	11,6	203	14,5	248	8,9
24	9,8	69	10,2	114	13,1	159	12,4	204	12,3	249	13,6
25	10,3	70	8,8	115	10,1	160	12,7	205	7,9	250	11,7
26	12,3	71	9,5	116	11,5	161	11,1	206	8,4	251	15,0
27	11,9	72	13,9	117	11,8	162	10,8	207	10,8	252	13,9
28	11,2	73	13,9	118	13,5	163	11,5	208	10,8	253	14,2
29	11,0	74	15,3	119	14,4	164	11,6	209	12,5	254	14,4
30	12,1	75	11,2	120	8,6	165	9,4	210	13,2	255	13,1
31	14,3	76	11,0	121	13,2	166	12,6	211	11,0	256	12,3
32	14,4	77	12,0	122	13,8	167	12,8	212	13,7	257	9,9
33	11,4	78	11,3	123	14,5	168	10,7	213	12,1	258	14,4
34	11,5	79	8,6	124	10,6	169	13,1	214	11,7	259	8,2
35	13,4	80	13,4	125	11,3	170	14,0	215	10,7	260	14,1
36	12,2	81	18,5	126	12,8	171	10,9	216	8,5	261	10,7
37	13,0	82	13,1	127	9,3	172	12,2	217	13,7	262	
38	11,1	83	13,5	128	9,0	173	11,7	218	12,5	263	
39	12,4	84	11,4	129	10,4	174	13,0	219	12,6	264	
40	13,3	85	13,9	130	13,2	175	8,0	220	10,7	265	
41	13,6	86	11,4	131	9,1	176	13,3	221	13,3	266	
42	12,3	87	13,7	132	9,8	177	9,8	222	8,7	267	
43	15,4	88	15,5	133	11,6	178	11,6	223	6,2	268	
44	9,8	89	11,1	134	11,4	179	9,4	224	13,4	269	
45	12,8	90	11,0	135	8,4	180	12,1	225	11,6	270	

Apéndice 6. Peso de los camarones del grupo E14 (datos usados en el análisis de correlación).

	PESO (g)		CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN		
#	6,5±1,4	11,4±1,3	4to segmento	5to segmento	6to segmento
1	6,0	11,6	amarillo	amarillo	amarillo
2	6,8	13,5	amarillo	amarillo	rojo
3	7,9		amarillo	amarillo	verde
4	3,9	9,0	amarillo	amarillo	naranja
5	4,7		amarillo	amarillo	azul
6	6,4	12,3	amarillo	amarillo	púrpura
7	5,2		amarillo	amarillo	negro
8	5,7		amarillo	rojo	amarillo
9	4,8	9,8	amarillo	rojo	rojo
10	5,3		amarillo	rojo	verde
11	6,9		amarillo	rojo	naranja
12	5,5		amarillo	rojo	azul
13	4,5		amarillo	rojo	púrpura
14	7,2	13,3	amarillo	rojo	negro
15	4,3	9,0	amarillo	verde	amarillo
16	7,2		amarillo	verde	rojo
17	7,2		amarillo	verde	verde
18	3,7	9,2	amarillo	verde	naranja
19	5,5	10,1	amarillo	verde	azul
20	7,1		amarillo	verde	púrpura
21	7,4	12,8	amarillo	verde	negro
22	6,4		amarillo	naranja	amarillo
23	5,8		amarillo	naranja	rojo
24	6,2		amarillo	naranja	verde
25	4,8	11,2	amarillo	naranja	naranja
26	2,1	8,7	amarillo	naranja	azul
27	6,3		amarillo	naranja	púrpura
28	7,2		amarillo	naranja	negro
29	6,3	12,0	amarillo	azul	amarillo
30	5,8	11,4	amarillo	azul	rojo
31	5,6		amarillo	azul	verde
32	6,6	11,7	amarillo	azul	naranja
33	5,8	10,2	amarillo	azul	azul
34	7,4		amarillo	azul	púrpura
35	5,8		amarillo	azul	negro
36	4,5	8,7	amarillo	púrpura	amarillo
37	5,7		amarillo	púrpura	rojo
38	5,7	10,8	amarillo	púrpura	verde
39	7,2	13,7	amarillo	púrpura	naranja
40	7,0	11,7	amarillo	púrpura	azul
41	5,0	11,1	amarillo	púrpura	púrpura
42	7,3		amarillo	púrpura	negro
43	6,4		amarillo	negro	amarillo
44	7,4		amarillo	negro	rojo
45	5,3	10,4	amarillo	negro	verde
46	3,5	7,6	amarillo	negro	naranja
47	6,4		amarillo	negro	azul
48	6,3	11,8	amarillo	negro	púrpura
49	7,1		amarillo	negro	negro
50	4,3	11,7	rojo	amarillo	amarillo

Continua...

	PESO (g)		CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN		
#	6,5±1,4	11,4±1,3	4to segmento	5to segmento	6to segmento
51	5,8	12,4	rojo	amarillo	rojo
52	6,7		rojo	amarillo	verde
53	5,3	9,5	rojo	amarillo	naranja
54	6,2		rojo	amarillo	azul
55	9,3		rojo	amarillo	púrpura
56	6,1		rojo	amarillo	negro
57	3,5		rojo	rojo	amarillo
58	4,6	11,9	rojo	rojo	rojo
59	5,0		rojo	rojo	verde
60	4,2	9,7	rojo	rojo	naranja
61	6,5	13,0	rojo	rojo	azul
62	6,3		rojo	rojo	púrpura
63	3,7		rojo	rojo	negro
64	7,1		rojo	verde	amarillo
65	7,0	11,6	rojo	verde	rojo
66	7,8		rojo	verde	verde
67	8,4	14,6	rojo	verde	naranja
68	8,4	15,7	rojo	verde	azul
69	7,7		rojo	verde	púrpura
70	5,5	11,4	rojo	verde	negro
71	5,4	11,1	rojo	naranja	amarillo
72	4,9		rojo	naranja	rojo
73	7,7		rojo	naranja	verde
74	8,1		rojo	naranja	naranja
75	6,2		rojo	naranja	azul
76	7,7		rojo	naranja	púrpura
77	8,3		rojo	naranja	negro
78	5,7	11,3	rojo	azul	amarillo
79	7,4		rojo	azul	rojo
80	7,9		rojo	azul	verde
81	4,8	9,7	rojo	azul	naranja
82	5,0		rojo	azul	azul
83	4,9	11,7	rojo	azul	púrpura
84	7,7	15,6	rojo	azul	negro
85	7,3		rojo	púrpura	amarillo
86	6,5		rojo	púrpura	rojo
87	5,0		rojo	púrpura	verde
88	3,8		rojo	púrpura	naranja
89	6,4		rojo	púrpura	azul
90	6,0		rojo	púrpura	púrpura
91	6,7		rojo	púrpura	negro
92	5,3	10,1	rojo	negro	amarillo
93	3,3		rojo	negro	rojo
94	6,3	12,2	rojo	negro	verde
95	7,2		rojo	negro	naranja
96	7,2	12,7	rojo	negro	azul
97	7,6	13,6	rojo	negro	púrpura
98	7,6	12,3	rojo	negro	negro
99	5,3	9,2	verde	amarillo	amarillo
100	7,3		verde	amarillo	rojo
101	5,1	10,8	verde	amarillo	verde
102	7,8		verde	amarillo	naranja
103	8,5		verde	amarillo	azul
104	6,9	13,2	verde	amarillo	púrpura

Continua..

#	PESO (g)		CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN		
	6,5±1,4	11,4±1,3	4to segmento	5to segmento	6to segmento
105	5,5		verde	amarillo	negro
106	7,2		verde	rojo	amarillo
107	4,4	9,6	verde	rojo	rojo
108	5,4		verde	rojo	verde
109	4,8		verde	rojo	naranja
110	7,7	13,4	verde	rojo	azul
111	7,0		verde	rojo	púrpura
112	7,5		verde	rojo	negro
113	4,5		verde	verde	amarillo
114	6,3		verde	verde	rojo
115	6,2	11,3	verde	verde	verde
116	6,6		verde	verde	naranja
117	3,9	9,9	verde	verde	azul
118	7,7		verde	verde	púrpura
119	6,1		verde	verde	negro
120	7,8	13,2	verde	naranja	amarillo
121	4,8	11,2	verde	naranja	rojo
122	6,4	11,4	verde	naranja	verde
123	7,4	14,4	verde	naranja	naranja
124	6,3		verde	naranja	azul
125	4,9		verde	naranja	púrpura
126	5,4	11,1	verde	naranja	negro
127	6,7		verde	azul	amarillo
128	6,2		verde	azul	rojo
129	8,1		verde	azul	verde
130	6,2		verde	azul	naranja
131	6,2		verde	azul	azul
132	9,2		verde	azul	púrpura
133	6,5		verde	azul	negro
134	2,9	8,4	verde	púrpura	amarillo
135	6,4	12,6	verde	púrpura	rojo
136	6,4	12,4	verde	púrpura	verde
137	5,7		verde	púrpura	naranja
138	8,1		verde	púrpura	azul
139	6,6		verde	púrpura	púrpura
140	5,2		verde	púrpura	negro
141	4,7	9,3	verde	negro	amarillo
142	5,9	10,2	verde	negro	rojo
143	9,8		verde	negro	verde
144	2,1	8,6	verde	negro	naranja
145	6,3		verde	negro	azul
146	4,7		verde	negro	púrpura
147	6,6		verde	negro	negro
148	8,2	15,4	naranja	amarillo	amarillo
149	5,5	10,9	naranja	amarillo	rojo
150	5,6	11,5	naranja	amarillo	verde
151	6,5		naranja	amarillo	naranja
152	5,1	11,0	naranja	amarillo	azul
153	6,4	12,0	naranja	amarillo	púrpura
154	4,8	9,8	naranja	amarillo	negro
155	8,5	13,1	naranja	rojo	amarillo
156	4,3	10,2	naranja	rojo	rojo
157	6,9	12,7	naranja	rojo	verde
158	7,8		naranja	rojo	naranja

Continua..

#	PESO (g) 6,5±1,4	11,4±1,3	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN 4to segmento	5to segmento	6to segmento
159	5,1	10,1	naranja	rojo	azul
160	6,1		naranja	rojo	púrpura
161	7,9	15,9	naranja	rojo	negro
162	6,7	10,0	naranja	verde	amarillo
163	6,1	11,1	naranja	verde	rojo
164	4,9		naranja	verde	verde
165	7,6		naranja	verde	naranja
166	5,1	10,9	naranja	verde	azul
167	7,5		naranja	verde	púrpura
168	6,8		naranja	verde	negro
169	7,3		naranja	naranja	amarillo
170	5,5		naranja	naranja	rojo
171	6,2	10,9	naranja	naranja	verde
172	5,8		naranja	naranja	naranja
173	9,8		naranja	naranja	azul
174	9,0	15,3	naranja	naranja	púrpura
175	6,7		naranja	naranja	negro
176	9,7		naranja	azul	amarillo
177	5,4	11,3	naranja	azul	rojo
178	7,2		naranja	azul	verde
179	2,9	8,3	naranja	azul	naranja
180	7,5	11,5	naranja	azul	azul
181	7,7	13,5	naranja	azul	púrpura
182	5,4	10,4	naranja	azul	negro
183	6,8		naranja	púrpura	amarillo
184	7,5		naranja	púrpura	rojo
185	6,5	12,2	naranja	púrpura	verde
186	5,4	10,6	naranja	púrpura	naranja
187	6,4		naranja	púrpura	azul
188	5,5	11,2	naranja	púrpura	púrpura
189	7,0	12,4	naranja	púrpura	negro
190	5,1		naranja	negro	amarillo
191	5,5	11,0	naranja	negro	rojo
192	6,2	10,7	naranja	negro	verde
193	5,2	10,1	naranja	negro	naranja
194	6,7		naranja	negro	azul
195	5,5	10,9	naranja	negro	púrpura
196	5,6		naranja	negro	negro
197	7,0		azul	amarillo	amarillo
198	6,9		azul	amarillo	rojo
199	7,5	13,2	azul	amarillo	verde
200	7,6	12,8	azul	amarillo	naranja
201	9,3	15,6	azul	amarillo	azul
202	6,5		azul	amarillo	púrpura
203	7,5	13,5	azul	amarillo	negro
204	8,7		azul	rojo	amarillo
205	5,9		azul	rojo	rojo
206	6,6		azul	rojo	verde
207	6,6		azul	rojo	naranja
208	5,2		azul	rojo	azul
209	5,0		azul	rojo	púrpura
210	5,7	10,0	azul	rojo	negro
211	6,4	13,3	azul	verde	amarillo
212	9,1	15,4	azul	verde	rojo

Continua..

#	PESO (g) 6,5±1,4	11,4±1,3	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN 4to segmento	5to segmento	6to segmento
213	5,1	12,3	azul	verde	verde
214	8,2	13,8	azul	verde	naranja
215	8,7		azul	verde	azul
216	7,9		azul	verde	púrpura
217	4,7	11,4	azul	verde	negro
218	6,6		azul	naranja	amarillo
219	3,8		azul	naranja	rojo
220	6,2	12,1	azul	naranja	verde
221	5,6	11,0	azul	naranja	naranja
222	6,0	12,0	azul	naranja	azul
223	8,3		azul	naranja	púrpura
224	8,4	15,6	azul	naranja	negro
225	6,8	13,2	azul	azul	amarillo
226	3,6	8,1	azul	azul	rojo
227	5,3		azul	azul	verde
228	9,8	10,6	azul	azul	naranja
229	6,3		azul	azul	azul
230	7,2	12,0	azul	azul	púrpura
231	4,6		azul	azul	negro
232	6,2	12,6	azul	púrpura	amarillo
233	6,4		azul	púrpura	rojo
234	7,2		azul	púrpura	verde
235	5,5		azul	púrpura	naranja
236	6,5		azul	púrpura	azul
237	5,7	10,3	azul	púrpura	púrpura
238	4,0		azul	púrpura	negro
239	9,6	15,8	azul	negro	amarillo
240	4,8	11,1	azul	negro	rojo
241	4,0	10,5	azul	negro	verde
242	3,7		azul	negro	naranja
243	6,2		azul	negro	azul
244	4,6		azul	negro	púrpura
245	6,9		azul	negro	negro
246	7,9	14,7	púrpura	amarillo	amarillo
247	3,1	8,4	púrpura	amarillo	rojo
248	7,2	12,8	púrpura	amarillo	verde
249	5,6		púrpura	amarillo	naranja
250	7,3		púrpura	amarillo	azul
251	8,0	13,3	púrpura	amarillo	púrpura
252	6,5	12,0	púrpura	amarillo	negro
253	9,5		púrpura	rojo	amarillo
254	6,6	13,1	púrpura	rojo	rojo
255	7,6	13,7	púrpura	rojo	verde
256	4,9	9,9	púrpura	rojo	naranja
257	7,3		púrpura	rojo	azul
258	6,8		púrpura	rojo	púrpura
259	2,2	5,7	púrpura	rojo	negro
260	5,8	10,7	púrpura	verde	amarillo
261	3,1		púrpura	verde	rojo
262	5,3		púrpura	verde	verde
263	6,0	10,6	púrpura	verde	naranja
264	8,0	13,3	púrpura	verde	azul
265	4,8	12,0	púrpura	verde	púrpura
266	8,2		púrpura	verde	negro

Continua..

#	PESO (g)		CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN		
	6,5±1,4	11,4±1,3	4to segmento	5to segmento	6to segmento
267	6,0		púrpura	naranja	amarillo
268	6,6		púrpura	naranja	rojo
269	7,4		púrpura	naranja	verde
270	6,1		púrpura	naranja	naranja
271	5,6		púrpura	naranja	púrpura
272	7,8		púrpura	naranja	negro
273	6,6	11,7	púrpura	púrpura	amarillo
274	6,6	11,7	púrpura	púrpura	rojo
275	5,6	12,0	púrpura	púrpura	verde
276	5,9		púrpura	púrpura	naranja
277	7,3	12,1	púrpura	púrpura	púrpura
278	8,0		púrpura	púrpura	negro
279	8,5	14,8	púrpura	negro	amarillo
280	6,0		púrpura	negro	rojo
281	4,8		púrpura	negro	verde
282	4,7	9,7	púrpura	negro	naranja
283	8,1		púrpura	negro	púrpura
284	5,8		púrpura	negro	negro
285	5,9		negro	amarillo	amarillo
286	5,8	.2,8	negro	amarillo	rojo
287	4,1		negro	amarillo	verde
288	5,0	11,3	negro	amarillo	naranja
289	7,0		negro	amarillo	púrpura
290	5,8	11,3	negro	amarillo	negro
291	8,1	14,5	negro	rojo	amarillo
292	6,0		negro	rojo	rojo
293	4,0	8,1	negro	rojo	verde
294	5,5		negro	rojo	naranja
295	7,8		negro	rojo	púrpura
296	3,5	8,4	negro	rojo	negro
297	7,3		negro	verde	amarillo
298	3,7		negro	verde	rojo
299	4,3	8,1	negro	verde	verde
300	8,1		negro	verde	naranja
301	4,1	8,8	negro	verde	púrpura
302	6,8		negro	verde	negro
303	7,8		negro	naranja	amarillo
304	5,5	10,4	negro	naranja	rojo
305	1,1		negro	naranja	verde
306	3,5		negro	naranja	naranja
307	3,4	8,0	negro	naranja	púrpura
308	8,6		negro	naranja	negro
309	6,7		negro	púrpura	amarillo
310	6,4	11,3	negro	púrpura	rojo
311	4,7	9,3	negro	púrpura	verde
312	7,1	12,2	negro	púrpura	naranja
313	8,0	14,0	negro	púrpura	púrpura
314	7,0	12,6	negro	púrpura	negro
315	4,7	9,9	negro	negro	amarillo
316	4,3		negro	negro	rojo
317	6,2		negro	negro	verde
318	5,6		negro	negro	naranja
319	4,4	9,5	negro	negro	púrpura
320	4,5	9,8	negro	negro	negro

Apéndice 7. Análisis de correlación (Grupo E14).

Pearson Product-Moment Correlation.

	Peso 2 (11,4±1,3)	Peso 1 (6,5±1,4)
Peso 2	1	
Peso 1	**0,802**	1

Dependent variable is: Peso 2

R squared = 76,0%   R squared (adjusted) = 75,8%

s = 0,9523 with 151 - 2 = 149 degrees of freedom

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-ratio
Regression	427,374	1	427,374	471
Residual	135,132	149	0,906928	

Variable	Coefficient	s.e. of Coeff	t-ratio	prob
Constant	4,9871	0,3101	16,1	≤ 0,0001
Peso 1	1,09301	0,0504	21,7	≤ 0,0001

Apéndice 8. Peso de los camarones del grupo E15 (datos usados en el análisis de correlación).

	PESO (g)			CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN		
#	1,8±0,5	6,6±1,2	11,7±2,0	4to segmento	5to segmento	6to segmento
1	1,7	7,0	13,7	amarillo	amarillo	amarillo
2	1,4	6,4		amarillo	amarillo	rojo
3	2,0	7,4		amarillo	amarillo	verde
4	1,8	7,3	13,4	amarillo	amarillo	naranja
5	1,7	6,1	12,4	amarillo	amarillo	azul
6	1,8	5,9	10,9	amarillo	amarillo	púrpura
7	2,0	7,0		amarillo	amarillo	negro
8	1,8	5,3		amarillo	rojo	amarillo
9	1,6	6,1	12,6	amarillo	rojo	rojo
10	2,3	7,5		amarillo	rojo	verde
11	1,9	7,2		amarillo	rojo	naranja
12	1,4	4,0	7,6	amarillo	rojo	azul
13	1,0	4,1	7,3	amarillo	rojo	púrpura
14	1,6	7,5	13,0	amarillo	rojo	negro
15	2,1	7,2	11,4	amarillo	verde	amarillo
16	1,9	7,3		amarillo	verde	rojo
17	1,6	7,8	15,6	amarillo	verde	verde
18	1,8	6,2		amarillo	verde	naranja
19	1,5			amarillo	verde	azul
20	1,8			amarillo	verde	púrpura
21	2,6	7,4		amarillo	verde	negro
22	1,8	6,3		amarillo	naranja	amarillo
23	1,7	6,7	11,8	amarillo	naranja	rojo
24	1,0	3,2	6,7	amarillo	naranja	verde
25	0,9	4,7		amarillo	naranja	naranja
26	1,3			amarillo	naranja	azul
27	1,5	6,1	10,9	amarillo	naranja	púrpura
28	1,7	6,5	11,6	amarillo	naranja	negro
29	2,4	6,6	11,1	amarillo	azul	amarillo
30	1,6	6,7		amarillo	azul	rojo
31	2,3	7,3		amarillo	azul	verde
32	2,0	7,7	13,3	amarillo	azul	naranja
33	2,1			amarillo	azul	azul
34	1,9	7,5	13,2	amarillo	azul	púrpura
35	1,3		9,3	amarillo	azul	negro
36	1,4			amarillo	púrpura	amarillo
37	1,8			amarillo	púrpura	rojo
38	1,9	5,2	10,8	amarillo	púrpura	verde
39	1,8	6,7	12,6	amarillo	púrpura	naranja
40	1,2	5,7	12,1	amarillo	púrpura	azul
41	1,6	6,4	11,5	amarillo	púrpura	púrpura
42	1,7			amarillo	púrpura	negro
43	2,0	6,7	10,7	amarillo	negro	amarillo
44	1,7	7,3		amarillo	negro	rojo
45	1,3	5,9		amarillo	negro	verde
46	1,6	7,1		amarillo	negro	naranja
47	2,4	8,4	14,3	amarillo	negro	azul
48	2,7	6,5		amarillo	negro	púrpura
49	1,6			amarillo	negro	negro
50	2,2	7,3		rojo	amarillo	amarillo

Continua..

#	PESO (g) 1,8±0,5	6,6±1,2	11,7±2,0	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN 4to segmento	5to segmento	6to segmento
51	1,5	5,6	10,4	rojo	amarillo	rojo
52	2,7	6,3		rojo	amarillo	verde
53	1,7	6,7	12,0	rojo	amarillo	naranja
54	1,9		12,0	rojo	amarillo	azul
55	2,3	7,6	12,8	rojo	amarillo	púrpura
56	1,9	7,8	12,7	rojo	amarillo	negro
57	2,4	7,1	11,4	rojo	rojo	amarillo
58	1,5			rojo	rojo	rojo
59	1,4	6,1		rojo	rojo	verde
60	1,3	4,7		rojo	rojo	naranja
61	1,9	5,9	10,7	rojo	rojo	azul
62	1,7	6,6	8,7	rojo	rojo	púrpura
63	1,8	5,9		rojo	rojo	negro
64	1,2			rojo	verde	amarillo
65	2,7	7,8	13,4	rojo	verde	rojo
66	1,7	6,8	12,4	rojo	verde	verde
67	2,4	8,0	13,2	rojo	verde	naranja
68	2,4	9,6		rojo	verde	azul
69	1,7	6,8		rojo	verde	púrpura
70	1,6	5,7		rojo	verde	negro
71	1,0			rojo	naranja	amarillo
72	1,2	5,8	10,3	rojo	naranja	rojo
73	1,2			rojo	naranja	verde
74	1,2	5,1	11,0	rojo	naranja	naranja
75	1,8	6,9	12,1	rojo	naranja	azul
76	2,5	7,8		rojo	naranja	púrpura
77	2,0	6,3	10,2	rojo	naranja	negro
78	2,3	7,8		rojo	azul	amarillo
79	2,2			rojo	azul	rojo
80	1,4	5,4		rojo	azul	verde
81	1,9	7,8	13,9	rojo	azul	naranja
82	1,6			rojo	azul	azul
83	2,6	8,3	14,2	rojo	azul	púrpura
84	1,5	6,6	11,1	rojo	azul	negro
85	1,4	5,0	8,8	rojo	púrpura	amarillo
86	1,4			rojo	púrpura	rojo
87	2,5			rojo	púrpura	verde
88	1,6	5,0	10,0	rojo	púrpura	naranja
89	1,9			rojo	púrpura	azul
90	2,1			rojo	púrpura	púrpura
91	2,1	7,6	13,0	rojo	púrpura	negro
92	2,6	9,0		rojo	negro	amarillo
93	2,8	8,5		rojo	negro	rojo
94	1,8			rojo	negro	verde
95	1,4		10,9	rojo	negro	naranja
96	2,2	7,3	11,9	rojo	negro	azul
97	1,8		13,9	rojo	negro	púrpura
98	1,9			rojo	negro	negro
99	1,9	7,3	12,4	verde	amarillo	amarillo
100	0,8	3,5	6,1	verde	amarillo	rojo
101	1,4	5,4		verde	amarillo	verde
102	1,9	6,7		verde	amarillo	naranja
103	2,0	6,6		verde	amarillo	azul
104	1,7	6,5	12,0	verde	amarillo	púrpura

Continua..

	PESO (g)			CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN		
#	1,8±0,5	6,6±1,2	11,7±2,0	4to segmento	5to segmento	6to segmento
105	2,3			verde	amarillo	negro
106	2,2	7,6		verde	rojo	amarillo
107	1,7			verde	rojo	rojo
108	1,9	7,0	13,3	verde	rojo	verde
109	1,5			verde	rojo	naranja
110	1,4	6,3	10,6	verde	rojo	azul
111	1,5	6,1	11,7	verde	rojo	púrpura
112	1,7	5,5	9,9	verde	rojo	negro
113	1,8	7,1		verde	verde	amarillo
114	1,6	6,9	11,4	verde	verde	rojo
115	1,2	5,1	10,3	verde	verde	verde
116	1,2			verde	verde	naranja
117	1,5	6,6		verde	verde	azul
118	1,3	4,6		verde	verde	púrpura
119	2,5			verde	verde	negro
120	2,4			verde	naranja	amarillo
121	1,1	5,6	10,5	verde	naranja	rojo
122	1,9	7,2		verde	naranja	verde
123	1,6	5,6	11,5	verde	naranja	naranja
124	2,7	8,0		verde	naranja	azul
125	1,3	6,4		verde	naranja	púrpura
126	1,7	7,0	13,0	verde	naranja	negro
127	1,6	6,7	12,3	verde	azul	amarillo
128	1,6			verde	azul	rojo
129	2,3	7,4		verde	azul	verde
130	1,9	7,3	11,9	verde	azul	naranja
131	1,4	6,9		verde	azul	azul
132	0,9	4,4	9,4	verde	azul	púrpura
133	1,6	6,1		verde	azul	negro
134	2,2	7,1		verde	púrpura	amarillo
135	1,2	5,4		verde	púrpura	rojo
136	1,8	7,3		verde	púrpura	verde
137	2,3	7,3	11,9	verde	púrpura	naranja
138	2,5	6,9	11,5	verde	púrpura	azul
139	1,5	6,0	11,2	verde	púrpura	púrpura
140	1,6	7,2	14,4	verde	púrpura	negro
141	2,0	6,8	12,6	verde	negro	amarillo
142	1,9			verde	negro	rojo
143	1,7			verde	negro	verde
144	1,6	6,4	11,7	verde	negro	naranja
145	1,5	6,2		verde	negro	azul
146	1,7	6,5	11,9	verde	negro	púrpura
147	1,9	6,0		verde	negro	negro
148	2,1			naranja	amarillo	amarillo
149	1,9			naranja	amarillo	rojo
150	1,9	7,2		naranja	amarillo	verde
151	1,1	5,4		naranja	amarillo	naranja
152	2,3			naranja	amarillo	azul
153	1,8	7,1		naranja	amarillo	púrpura
154	1,4	5,9		naranja	amarillo	negro
155	1,2	4,4	8,6	naranja	rojo	amarillo
156	1,9			naranja	rojo	rojo
157	2,4	7,3	13,5	naranja	rojo	verde
158	2,2			naranja	rojo	naranja

Continua..

#	PESO (g) 1,8±0,5	6,6±1,2	11,7±2,0	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN 4to segmento	5to segmento	6to segmento
159	1,8	7,3	14,3	naranja	rojo	azul
160	1,6	5,4		naranja	rojo	púrpura
161	1,7	6,2		naranja	rojo	negro
162	1,9	7,6		naranja	verde	amarillo
163	2,4			naranja	verde	rojo
164	2,7	8,1	11,5	naranja	verde	verde
165	1,1	4,7	8,7	naranja	verde	naranja
166	1,9	7,7	12,6	naranja	verde	azul
167	1,6	7,1		naranja	verde	púrpura
168	2,1	7,7		naranja	verde	negro
169	2,2	7,7	13,3	naranja	naranja	amarillo
170	1,3	6,6		naranja	naranja	rojo
171	1,7	5,7	11,0	naranja	naranja	verde
172	0,8	3,2	7,0	naranja	naranja	naranja
173	1,1	4,8	9,5	naranja	naranja	azul
174	2,6	7,3	11,4	naranja	naranja	púrpura
175	2,3	10,1		naranja	naranja	negro
176	2,4	9,2		naranja	azul	amarillo
177	2,1			naranja	azul	rojo
178	2,3	7,2	11,3	naranja	azul	verde
179	1,8	8,1	11,3	naranja	azul	naranja
180	1,8	7,0	13,2	naranja	azul	azul
181	1,4	5,5	11,2	naranja	azul	púrpura
182	2,0	7,4		naranja	azul	negro
183	2,8	8,1	14,0	naranja	púrpura	amarillo
184	1,7	6,6	12,6	naranja	púrpura	rojo
185	2,0	8,9	15,6	naranja	púrpura	verde
186	1,9			naranja	púrpura	naranja
187	1,1			naranja	púrpura	azul
188	2,3	8,3	13,7	naranja	púrpura	púrpura
189	2,2	8,2		naranja	púrpura	negro
190	1,6			naranja	negro	amarillo
191	0,9	3,2	7,1	naranja	negro	rojo
192	2,5	7,1		naranja	negro	verde
193	2,1	8,0		naranja	negro	naranja
194	1,5	5,6		naranja	negro	azul
195	1,5	6,3		naranja	negro	púrpura
196	2,5			naranja	negro	negro
197	1,3	5,7		azul	amarillo	amarillo
198	1,5	6,6	12,6	azul	amarillo	rojo
199	1,5	6,4	11,8	azul	amarillo	verde
200	0,8	4,1	8,8	azul	amarillo	naranja
201	1,3			azul	amarillo	azul
202	0,7			azul	amarillo	púrpura
203	2,4	7,3		azul	amarillo	negro
204	2,0	7,6		azul	rojo	amarillo
205	1,4	5,6	10,1	azul	rojo	rojo
206	2,8	9,4		azul	rojo	verde
207	1,3	6,2		azul	rojo	naranja
208	1,5	6,7		azul	rojo	azul
209	1,3	5,5		azul	rojo	púrpura
210	2,7	6,6		azul	rojo	negro
211	2,6	8,0	11,5	azul	verde	amarillo
212	2,4	7,7	15,2	azul	verde	rojo

Continua..

	PESO (g)			CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN		
#	**1,8±0,5**	**6,6±1,2**	**11,7±2,0**	**4to segmento**	**5to segmento**	**6to segmento**
213	0,9			azul	verde	verde
214	1,6	6,1	11,1	azul	verde	naranja
215	2,3			azul	verde	azul
216	2,3	8,0		azul	verde	púrpura
217	1,9	7,8		azul	verde	negro
218	1,1	4,7		azul	naranja	amarillo
219	2,4			azul	naranja	rojo
220	1,3	6,6	13,0	azul	naranja	verde
221	0,7	3,9	8,2	azul	naranja	naranja
222	1,2			azul	naranja	azul
223	1,6	6,7	12,7	azul	naranja	púrpura
224	1,6	6,3	10,6	azul	naranja	negro
225	2,0	8,3		azul	azul	amarillo
226	2,1			azul	azul	rojo
227	2,3	7,6		azul	azul	verde
228	1,7	5,3	11,6	azul	azul	naranja
229	1,8	7,4		azul	azul	azul
230	1,2			azul	azul	púrpura
231	1,6	7,1		azul	azul	negro
232	2,3	8,8	14,1	azul	púrpura	amarillo
233	1,3			azul	púrpura	rojo
234	2,0	7,1	14,5	azul	púrpura	verde
235	1,8			azul	púrpura	naranja
236	1,8	6,2		azul	púrpura	azul
237	1,6	5,7	11,0	azul	púrpura	púrpura
238	1,7	5,9	10,6	azul	púrpura	negro
239	1,1	5,6	11,1	azul	negro	amarillo
240	1,5	5,2		azul	negro	rojo
241	1,5			azul	negro	verde
242	0,9	4,5	7,8	azul	negro	naranja
243	1,7	7,0		azul	negro	azul
244	1,1	5,0		azul	negro	púrpura
245	2,0	5,9		azul	negro	negro
246	0,6	3,7		púrpura	amarillo	amarillo
247	1,5	6,3	12,9	púrpura	amarillo	rojo
248	0,7	3,9	6,2	púrpura	amarillo	verde
249	2,3		12,4	púrpura	amarillo	naranja
250	2,1	7,1	11,7	púrpura	amarillo	azul
251	1,1	7,6		púrpura	amarillo	púrpura
252	1,4	5,7		púrpura	amarillo	negro
253	1,6			púrpura	rojo	amarillo
254	2,4	7,4		púrpura	rojo	rojo
255	1,1	4,8		púrpura	rojo	verde
256	0,9	5,7	11,5	púrpura	rojo	naranja
257	2,1	7,0		púrpura	rojo	azul
258	2,4	6,4	11,5	púrpura	rojo	púrpura
259	2,1	7,3	13,9	púrpura	rojo	negro
260	1,8	7,0		púrpura	verde	amarillo
261	1,2	6,4		púrpura	verde	rojo
262	0,9	3,3	5,9	púrpura	verde	verde
263	2,4	7,3		púrpura	verde	naranja
264	1,7	6,6		púrpura	verde	azul
265	1,9	6,0		púrpura	verde	púrpura
266	1,6	6,9		púrpura	verde	negro

Continua..

#	PESO (g) 1,8±0,5	6,6±1,2	11,7±2,0	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN 4to segmento	5to segmento	6to segmento
267	1,9			púrpura	naranja	amarillo
268	1,2	5,6	11,5	púrpura	naranja	rojo
269	1,9		10,6	púrpura	naranja	verde
270	1,6	6,3	12,6	púrpura	naranja	naranja
271	1,7	6,5	13,0	púrpura	naranja	azul
272	2,1	7,9	14,5	púrpura	naranja	púrpura
273	0,9	4,2	7,1	púrpura	naranja	negro
274	0,9	4,6	9,5	púrpura	azul	amarillo
275	1,3			púrpura	azul	rojo
276	2,0	6,7	11,5	púrpura	azul	verde
277	1,5	5,9	11,6	púrpura	azul	naranja
278	2,0	7,7	14,0	púrpura	azul	azul
279	1,6	5,8	9,7	púrpura	azul	púrpura
280	0,9			púrpura	azul	negro
281	1,7	5,7		púrpura	púrpura	amarillo
282	1,9	7,1	12,8	púrpura	púrpura	rojo
283	0,9	4,1	7,8	púrpura	púrpura	verde
284	2,3	6,9	13,0	púrpura	púrpura	naranja
285	1,8	6,3		púrpura	púrpura	azul
286	2,6	9,0	15,4	púrpura	púrpura	púrpura
287	1,1	6,2		púrpura	púrpura	negro
288	1,6			púrpura	negro	amarillo
289	1,7	6,5		púrpura	negro	rojo
290	2,5	8,1	14,1	púrpura	negro	verde
291	2,3	7,0	11,8	púrpura	negro	naranja
292	1,7	7,5		púrpura	negro	azul
293	1,9	6,2	9,8	púrpura	negro	púrpura
294	1,7	6,6	12,6	púrpura	negro	negro
295	2,4	7,2		negro	amarillo	amarillo
296	1,5	5,7		negro	amarillo	rojo
297	2,9	8,3	13,6	negro	amarillo	verde
298	1,5			negro	amarillo	naranja
299	2,7	8,2	13,4	negro	amarillo	azul
300	1,3	5,3	10,4	negro	amarillo	púrpura
301	2,4	8,1	14,4	negro	amarillo	negro
302	1,7	6,3		negro	rojo	amarillo
303	1,5			negro	rojo	rojo
304	1,9			negro	rojo	verde
305	1,7	6,9	12,3	negro	rojo	naranja
306	2,6	9,1	15,5	negro	rojo	azul
307	1,9	5,6		negro	rojo	púrpura
308	2,2	7,9	14,0	negro	rojo	negro
309	1,7			negro	verde	amarillo
310	1,2	5,3	11,5	negro	verde	rojo
311	1,4	5,4		negro	verde	verde
312	1,4	7,0	12,1	negro	verde	naranja
313	1,4	4,9		negro	verde	azul
314	1,3	6,7	12,7	negro	verde	púrpura
315	2,2	7,0	11,4	negro	verde	negro
316	1,8			negro	naranja	amarillo
317	2,7	8,0		negro	naranja	rojo
318	1,7	6,8	12,7	negro	naranja	verde
319	1,0	5,1	9,8	negro	naranja	naranja
320	1,9	7,2		negro	naranja	azul

Continua..

#	PESO (g) 1,8±0,5	6,6±1,2	11,7±2,0	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN 4to segmento	5to segmento	6to segmento
321	1,9	6,7	11,5	negro	naranja	púrpura
322	1,3	5,5		negro	naranja	negro
323	2,1	7,4		negro	azul	amarillo
324	1,4	5,9	12,3	negro	azul	rojo
325	1,0	4,5	10,9	negro	azul	verde
326	1,3	5,5		negro	azul	naranja
327	1,1			negro	azul	azul
328	2,5	7,4	13,4	negro	azul	púrpura
329	1,9			negro	azul	negro
330	1,7	6,4	11,9	negro	púrpura	amarillo
331	1,7			negro	púrpura	rojo
332	1,4			negro	púrpura	verde
333	1,4		12,2	negro	púrpura	naranja
334	1,7	7,6		negro	púrpura	azul
335	1,9	8,1		negro	púrpura	púrpura
336	1,3			negro	púrpura	negro
337	2,4			negro	negro	amarillo
338	2,6			negro	negro	rojo
339	1,5	6,9	12,0	negro	negro	verde
340	1,6			negro	negro	naranja
341	2,2	7,6	14,3	negro	negro	azul
342	1,5	6,3	12,7	negro	negro	púrpura
343	2,4	8,4	14,3	negro	negro	negro

Apéndice 9. Análisis de correlación (grupo E15).

Pearson Product-Moment Correlation

	Peso 2 (6,6±1,2)	Peso 1 (1,8±0,5)
Peso 2	1	
Peso 1	**0,872**	1

Dependent variable is: Peso 2
R squared = 64,3% R squared (adjusted) = 64,1%
s = 0,7310 with 266 - 2 = 264 degrees of freedom

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-ratio
Regression	253,741	1	253,741	475
Residual	141,064	264	0,534333	

Variable	Coefficient	s.e. of Coeff	t-ratio	prob
Constant	3,00966	0,1697	17,7	≤ 0,0001
Peso 1	2,01364	0,0924	21,8	≤ 0,0001

Pearson Product-Moment Correlation

	Peso 3 (11,7±2,0)	Peso 1 (1,8±0,5)
Peso 3	1	
Peso 1	**0,685**	1

Dependent variable is: Peso 3
266 total cases of which 116 are missing
R squared = 46,9% R squared (adjusted) = 46,5%
s = 1,477 with 150 - 2 = 148 degrees of freedom

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-ratio
Regression	285,174	1	285,174	131
Residual	322,849	148	2,18141	

Variable	Coefficient	s.e. of Coeff	t-ratio	prob
Constant	6,90242	0,4357	15,8	≤ 0,0001
Peso 1	2,74794	0,2403	11,4	≤ 0,0001

Pearson Product-Moment Correlation

	Peso 3 (11,7±2,0)	Peso 2 (6,6±1,2)
Peso 3	1	
Peso 1	**0,885**	1

Dependent variable is: Peso 3
266 total cases of which 116 are missing
R squared = 78,4% R squared (adjusted) = 78,2%
s = 0,9422 with 150 - 2 = 148 degrees of freedom

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-ratio
Regression	476,641	1	476,641	537
Residual	131,382	148	0,887714	

Variable	Coefficient	s.e. of Coeff	t-ratio	prob
Constant	2,71183	0,395	6,87	≤ 0,0001
Peso 2	1,38784	0,0599	23,2	≤ 0,0001