

ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL CAMARÓN BLANCO
(*Litopenaeus vannamei*) DE LA REGIÓN DE TUMACO (NARIÑO) MEDIANTE LA
TÉCNICA RAPD

PABLO ANDRÉS CORAL CHACHINOY

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2015

ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL CAMARÓN BLANCO
(*Litopenaeus vannamei*) DE LA REGIÓN DE TUMACO (NARIÑO) MEDIANTE LA
TÉCNICA RAPD

PABLO ANDRÉS CORAL CHACHINOY

Trabajo de grado presentado al Comité Curricular y de Investigaciones del
Departamento de Química como requisito parcial para optar al título de Químico

Director
Jesús Adriano Romo Ramos
Magister Scientiae en Bioquímica Básica (Universidad de La Habana)

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2015

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo son responsabilidad exclusiva del autor.

Artículo 1ro del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

Jesús Adriano Romo Ramos
Director

Jesús Antonio Cabrera Moncayo
Jurado

Sandra Lorena Álvarez Ordoñez
Jurado

San Juan de Pasto, 21 de mayo de 2015

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su sacrificio y el apoyo brindados en mis estudios.

Al profesor Jesús Romo M.Sc., por la dirección y orientación en el desarrollo de este trabajo de grado.

A los profesores Jesús Cabrera Ph.D., Sandra Lorena Álvarez M.Sc y Edith Mariela Burbano Ph.D., por su orientación y consejos en el desarrollo de este trabajo.

A los profesores Tulio Cesar Lagos Ph.D. y Luz Estela Lagos Ph.D. por permitirme desarrollar una buena parte del trabajo en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Nariño, así como el préstamo de los equipos necesarios para el desarrollo del mismo.

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Posgrados y Relaciones Internacionales de la Universidad de Nariño (VIPRI) por la financiación del presente trabajo.

A las personas que han trabajado en el laboratorio de Biología Molecular: Ana Estrada, Elizabeth Portilla y las encargadas de dicho laboratorio Anyuli y Vanessa. Así como también a Guido e Iván del laboratorio de Biotecnología por su valiosa colaboración y consejos.

A mis compañeros Fernando Chaves, Esteban Estrada, Verónica Lagos y Yaneth Gómez, del Grupo de Investigación de Bioquímica y Estudios Genéticos (BIOGEN) por su apoyo y compañerismo. Así como a Natalia Mosquera por toda su paciencia y apoyo durante este tiempo.

Un agradecimiento especial a Pedro Fernando Bravo y demás compañeros del Grupo de Investigación de Materiales Funcionales y Catálisis (GIMFC) por sacarme de más de un aprieto.

RESUMEN

La explotación de recursos pesqueros es una de las principales actividades económicas de la región de Tumaco en el departamento de Nariño, entre las especies de camarón más importantes para este sector se encuentra el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Los programas de mejoramiento genético en poblaciones de camarón han cobrado importancia en los últimos años debido a la relevancia económica de este recurso. En el presente estudio se estimó la variabilidad genética de cuatro poblaciones de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de la Costa Pacífica del departamento de Nariño (región de Tumaco), mediante el marcador genético RAPD a partir de cuatro iniciadores. Se seleccionaron tres poblaciones naturales (Salahonda, Curay y La Ensenada de Tumaco), además de una población de cultivo (La Carbonera). Los resultados mostraron una diversidad genética de Nei (D) entre 0,118 y 0,157 con porcentajes de polimorfismo entre 49,04% y 55,41%, siendo la población de La Carbonera la que presentó los valores de D y polimorfismo más elevados. Los valores de G_{ST} y Φ_{PT} entre todas las poblaciones fueron de 0,421 y 0,348 respectivamente, indicando que existen diferencias genéticas entre las poblaciones estudiadas. El análisis de Φ_{PT} entre pares de poblaciones y las distancias genéticas de Nei (1978) mostraron que la población que presentó mayor diferenciación genética fue la población de cultivo de La Carbonera, mientras que las poblaciones más similares fueron las poblaciones naturales de La Ensenada y Salahonda. La población de Curay fue la que presentó mayor diferenciación entre las poblaciones naturales. El análisis de varianza molecular AMOVA indicó que la variabilidad encontrada se debe en mayor porcentaje (58%) a las diferencias intrapoblacionales, mientras que un menor porcentaje de variación (42%) se debe a las diferencias interpoblacionales.

ABSTRACT

The exploitation of fisheries resources is one of the main economic activities in the region of Tumaco in department of Nariño, among the most important species of shrimp for this sector is the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. The breeding programs in shrimp stocks have gained importance in recent years due to the economic importance of this resource. In the present study the genetic variability of four populations of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Pacific Coast of Department of Nariño (Tumaco region) was estimated by the genetic marker RAPD from four primers. Three natural populations (Salahonda, Curay and La Ensenada de Tumaco) were selected, along with a hatchery population (La Carbonera). The results showed a Nei's gene diversity (D) between 0,118 and 0,157 with a percentage of polymorphism between 49.04% and 55.41%, being the population of La Carbonera the one which provided higher values for D and polymorphism. G_{ST} values and Φ_{PT} among all populations were 0,421 and 0,348 respectively, indicating that there are genetic differences between the populations studied. Φ_{PT} analysis between pairs of populations and Nei (1978) genetic distances showed that the hatchery population of La Carbonera had higher genetic differentiation, while the most similar populations were natural populations of La Ensenada and Salahonda. Curay population was the one with greater differentiation between natural populations. Analysis of molecular variance AMOVA indicated that the variability found in mayor percentage (58%) is due to within-population differences, while a smaller percentage of variation (42%) is due to inter-population differences.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. OBJETIVOS	20
1.1 OBJETIVO GENERAL	20
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
2. MARCO TEÓRICO	21
2.1 CARACTERÍSTICAS DEL CAMARÓN BLANCO (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	21
2.2 CAMARONES DE CULTIVO	22
2.3 VARIABILIDAD GENÉTICA (CONCEPTOS BÁSICOS)	23
2.4 GENÉTICA DE POBLACIONES (CONCEPTOS BÁSICOS)	24
2.5 MARCADORES GENÉTICOS	26
2.6 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA RAPD	27
3. ANTECEDENTES	30
4. METODOLOGÍA	35
4.1 ÁREA DE ESTUDIO	35
4.2 TOMA DE MUESTRAS Y TRATAMIENTO INICIAL	35
4.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO	36
4.3.1 Extracción de ADN genómico	36

4.3.2 Electroforesis en gel de agarosa	37
4.3.3 Cuantificación espectrofotométrica de ADN	37
4.4 ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA MEDIANTE RAPDs	38
4.4.1 Iniciadores seleccionados para la amplificación de RAPDs	38
4.4.2 Obtención de RAPDs	39
4.4.3 Detección de RAPDs	40
4.4.4 Análisis de los geles	40
4.4.5 Procesamiento de datos	40
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1 EXTRACCIÓN DE ADN	43
5.2 AMPLIFICACIÓN DE RAPDs	44
5.3 ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA	50
5.4 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS CON ALOENZIMAS	67
CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXOS	86

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Características de los iniciadores utilizados para el estudio de RAPDs en <i>L. vannamei</i> .	38
Tabla 2. Mezcla de reacción para la obtención de RAPDs en <i>L. vannamei</i> .	39
Tabla 3. Numero de bandas amplificadas, rango de tamaño para los fragmentos amplificados y porcentaje de polimorfismo por población y por iniciador para los RAPDs producidos en <i>L. vannamei</i> .	51
Tabla 4. Parámetros genéticos por población.	56
Tabla 5. Valores de Φ_{PT} apareados (debajo de la diagonal) para 1000 permutaciones.	59
Tabla 6. Distancias genéticas de Nei (1978) (debajo de la diagonal) e identidades genéticas de Nei (1978) (por encima de la diagonal) entre pares de poblaciones.	61
Tabla 7. Distancias genéticas de Nei (1978) sin sesgo (debajo de la diagonal) e identidades genéticas de Nei (1978) sin sesgo (por encima de la diagonal) entre pares de poblaciones	61
Tabla 8. Valores de polimorfismo promedio para cuatro poblaciones de <i>L. vannamei</i> de la región de Tumaco, estudiadas mediante ocho sistemas aloenzimáticos y cuatro iniciadores RAPDs.	68
Tabla 9. Estimados de índice de diferenciación (F_{st}) por pares de poblaciones (sobre la diagonal) e índice de diferenciación modificado (Φ_{PT}) (bajo la diagonal) para poblaciones de <i>L. vannamei</i> .	69
Tabla 10. Distancias genéticas de Nei (1978) para aloenzimas (sobre la diagonal) y para RAPDs (bajo la diagonal) entre pares de poblaciones de camarón blanco <i>L. vannamei</i> de la región de Tumaco.	70

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Esquema general de la anatomía de un camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>).	21
Figura 2. Mapa de la región de Tumaco en el departamento de Nariño.	36
Figura 3. Esquema de la metodología utilizada para estimar la variabilidad genética de las poblaciones de <i>L. vannamei</i> de la región de Tumaco con RAPDs.	42
Figura 4. ADN total en muestras de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) obtenido mediante tres protocolos de extracción.	44
Figura 5. Resultados de las pruebas piloto de reproducibilidad para muestras de Curay con el iniciador 4-R.	45
Figura 6. Perfil de RAPDs para la población de La Carbonera (población de cultivo) con el iniciador 9-F.	47
Figura 7. Perfil de RAPDs correspondientes a la población de Salahonda (población natural) con el iniciador 9-F.	48
Figura 8. Perfil de RAPDs correspondientes a la población de Curay (población natural) con el iniciador 9-F.	49
Figura 9. Perfil de RAPDs correspondientes a la población de La Ensenada (población natural) con el iniciador 9-F.	50
Figura 10. Porcentaje de polimorfismo para tres poblaciones naturales y una de cultivo de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> de la región de Tumaco.	52
Figura 11. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para 4 poblaciones de camarones <i>Litopenaeus vannamei</i> de la región de Tumaco.	63
Figura 12. Distribución de los 120 individuos de la especie	66

Litopenaeus vannamei de la región de Tumaco mediante RAPDs, en función de su similitud genética.

Figura 13. Dendrograma de las distancias genéticas de Nei (1978) 71
para poblaciones de *Litopenaeus vannamei* de la región de Tumaco,
obtenido a partir de aloenzimas.

Figura 14. Dendrograma de las distancias genéticas de Nei (1978) 72
para poblaciones de *Litopenaeus vannamei* de la región de Tumaco,
obtenido a partir de RAPDs.

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Extracción de ADN con CTAB (Modificado Shahjahan <i>et al</i>).	86
Anexo B. Extracción de ADN con fenol-cloroformo (Modificado Kocher <i>et al</i>).	87
Anexo C. Perfil de RAPDs para cada población de <i>L. vannamei</i> de la región de Tumaco, generado con cada uno de los cuatro iniciadores utilizados en este estudio.	88

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Analysis of Molecular Variance
bp	Pares de bases
CIMMYT	Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
CTAB	Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide
dNTPs	Desoxynucleoside triphosphate
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Fis	Coeficiente de fijación para individuos dentro de una subpoblación
Fst	Grado de diferenciación genética entre poblaciones en función de las frecuencias alélicas (índice de fijación entre subpoblaciones)
Gst	Índice de diversidad genética de Nei
He	Heterocigosidad esperada
Ho	Heterocigosidad observada
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
Na	Numero de alelos diferentes (observados)
Ne	Numero de alelos efectivos
Nm	Flujo genético
PCR	Polymerase chain reaction
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSR	Simple Sequences Repeats
TAE	Solución amortiguadora de Tris base, Ácido Acético, EDTA
TBE	Solución amortiguadora de Tris base, Ácido Bórico, EDTA
TSV	Taura syndrome virus
uHe	Heterocigosidad sin sesgo (corregida)
UPGMA	Unweighted Pair Group Mean Analysis
WSSV	White spot syndrome virus
Φ_{PT}	Homólogo del índice de fijación Fst

GLOSARIO

ADN (ácido desoxirribonucleico): cadenas de azúcares y fosfatos unidos en hebras opuestas formadas por cuatro tipos diferentes de bases o nucleótidos: Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) y Timina (T).

ALELO: una o más formas alternativas de un gen dado o una región no codificante de ADN (regiones que no codifican necesariamente para una proteína), cada uno con una secuencia de nucleótidos única.

ALOENZIMAS: formas alternativas de una enzima codificadas por alelos diferentes en el mismo locus. Las aloenzimas son preparadas a partir de tejido homogeneizado que produce una solución de proteínas, las cuales son separadas por medio de electroforesis en gel, productos enzimáticos específicos son entonces visualizados por una reacción específica. Alelos con diferente carga tienen movilidades electroforéticas diferentes.

CODOMINANTE: ambos alelos en un organismo diploide son visualizados por un marcador genético, de tal manera que los genotipos homocigotos y heterocigotos son detectados.

DOMINANTE: solo un alelo de un organismo diploide es visualizado por un marcador genético, de tal manera que solo uno de los genotipos es detectado, ya sea como la presencia o la ausencia de una banda.

ELECTROFORESIS: migración a distinta velocidad de moléculas cargadas en solución, debido a la aplicación de un campo eléctrico. Este desplazamiento ocurre en un medio líquido sostenido por una sustancia sólida inerte, por ejemplo un papel o un gel. En un medio de viscosidad y voltaje constante, el desplazamiento de la partícula cargada depende de la proporción carga/tamaño.

ENDOGAMIA: apareamiento de organismos relacionados entre sí, que trae consigo un aumento en la homocigosidad y posible expresión de genes deletéreos.

ENZIMA DE RESTRICCIÓN: una enzima que corta el ADN en secuencias específicas cortas. Cada enzima tiene un sitio de corte único.

FENOTIPO: las características o apariencia de un organismo influenciado por el medio y el genotipo del organismo. En un sentido más estricto, se trata de las características mostradas por un locus o loci particular.

FLUJO GENÉTICO: intercambio de alelos entre poblaciones como fuente de variabilidad genética.

FRECUENCIA ALÉLICA: concepto utilizado para cuantificar la variabilidad genética, se define como una medida de la presencia de un alelo dado en una población.

GEN: es la unidad molecular de información dentro del genoma de un organismo, compuesta por una secuencia de nucleótidos a la que se le puede asignar una función específica.

GENÉTICA DE POBLACIONES: rama de la genética en la que se estudia la variabilidad de las poblaciones naturales, expresada en frecuencias genotípicas y alélicas de ciertos marcadores genéticos, así como los mecanismos que la hacen variar en generaciones consecutivas.

GENOTIPO: la constitución genética de un organismo, que estará dada por la información heredada por ambos padres. Específicamente para un solo locus, el genotipo estará dado por los alelos heredados por ambos padres.

HETEROCIGOSIDAD: la proporción de individuos heterocigotos para un locus o en promedio para varios *loci*. Es un estimador de variabilidad genética en poblaciones naturales o domesticadas.

HETEROCIGOTO: dos alelos diferentes en un locus determinado.

HOMOCIGOTO: dos alelos idénticos en un locus determinado.

LOCUS: la posición que un gen tiene en un cromosoma o dentro de un segmento de ADN genómico. Por convencionalismo, se aplica el término para referirse a genes o marcadores moleculares aun cuando no se conozca el lugar en el genoma. Incluye cualquier código identificable (genes) y regiones no codificantes del cromosoma (plural *loci*).

MARCADOR GENÉTICO (marcador molecular): cualquier carácter genético que pueda ser detectado y cuantificado. La mayoría de los marcadores genéticos son visualizados usando procedimientos de laboratorio que detectan la variación tanto directamente, al nivel del ADN, o indirectamente por medio de los productos de la transcripción y traducción del ADN, tal como las enzimas o los caracteres morfológicos.

MARCADORES GENÉTICOS BASADOS EN PCR. Marcadores genéticos producidos mediante la amplificación de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

PCR (reacción en cadena de la polimerasa): procedimiento de laboratorio utilizado para generar fragmentos de ADN amplificados a partir de secuencias complementarias de ADN.

PERFIL DE ADN: bandas o huella dactilar (*fingerprint*) producidos por un marcador genético.

POBLACIÓN: grupo de organismos de la misma especie que habitan en una determinada área geográfica y que por ende se entrecruzan y comparten un conjunto de características similares.

POLIMORFISMO: la presencia de una o más formas alternativas de un locus o loci particular. Se relaciona con la variación genética. Toda la variación genética refleja variación en la secuencia de nucleótidos, la cual se puede ocasionar por procesos como variación de bases, inserción de nucleótidos o delección de nucleótidos. Se considera que un *locus* será polimórfico cuando en la muestra poblacional la frecuencia del alelo más común no rebasa el 95%.

RAPD (amplificación al azar de ADN polimórfico): un método de PCR que utiliza iniciadores arbitrarios, de secuencia conocida (usualmente de 10 pares de bases de longitud), que sirven como iniciadores tanto derechos (*forward*) como inversos (*reverse*). Generalmente, los fragmentos de ADN amplificados se resuelven en electroforesis en gel de agarosa de baja resolución teñido con bromuro de etidio. Un perfil multi-locus o huella digital de ADN es producido con un polimorfismo aparente detectado mediante la ausencia o presencia de una banda.

SECUENCIA DE ADN: es la sucesión de nucleótidos que indica su orden dentro de una molécula de ADN o ARN. Por convención, las secuencias son presentadas usualmente en dirección 5' (fosfato terminal) a 3' (hidroxilo terminal).

INTRODUCCIÓN

La gran diversidad de especies marinas en la región de Tumaco, en la Costa Pacífica Nariñense, son una fuente potencial de recursos tanto económicos como investigativos no solo para el municipio de Tumaco sino también para el departamento de Nariño. Una de las principales actividades económicas en este municipio es la pesca y cultivo de diferentes especies acuícolas, principalmente de camarón, como la especie *Litopenaeus vannamei*, conocida comúnmente con el nombre de camarón blanco (también se le conoce como langostino, aunque estos son en realidad camarones de mayor tamaño).

La industria camaronera en los últimos años se ha enfrentado a graves problemas que han amenazado la producción. Diversas enfermedades infecciosas en camarones han sido reportadas por la FAO¹ (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), como el síndrome de Taura (TSV), el síndrome de la mancha blanca (WSSV) y la vibriosis. También fenómenos medioambientales como la sobreexplotación, presencia de contaminantes y variaciones en la temperatura, salinidad y cantidad de oxígeno, han conducido al desarrollo de estrategias que permitan contrarrestar estas amenazas, como la domesticación de animales por medio de la generación de cultivos en ciclo cerrado y la creación de programas para la selección de animales como base de cría y mejoramiento genético².

Para el desarrollo de programas de domesticación y de mejoramiento genético se cuenta actualmente con herramientas que permiten identificar características específicas en poblaciones animales y monitorear su heredabilidad. Esto permite establecer la distribución y variabilidad de las características de interés dentro de las poblaciones, tanto de aquellas que sirven como reserva como de las que se crían en cautiverio. Como lo mencionan Montaña-Perez *et al*³, la variabilidad

¹ FAO. Programa de información de especies acuáticas: *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) [en línea]. Roma: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Actualizado 7 de abril 2006 [citado 10 de febrero 2015]. Disponible en <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es#tcNA00D9>

² BENZIE, J. A. Genetic improvement of prawns. En: 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (6: 11-16, enero: Armidale, Australia). Australia: Organising Committee, 1998.

³ MONTAÑO-PEREZ, Karla, *et al*. Ventajas del uso de marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético en camarón. Panorama Acuícola [en línea]. Enero, 2005. vol. 18, no. 22 [citado 10 de febrero 2015]. Disponible en <http://www.panoramaacuicola.com/noticias/2005/01/01/ventajas_del_uso_de_marcadores_moleculares_en_los_programas_de_mejoramiento_genetico_en_camaron.html>

genética o polimorfismo se debe a que cada individuo es afectado en forma diferente en su interacción con el medio ambiente y sufre pequeños cambios en el ADN. Debido a que estas modificaciones son en el genoma, solamente pueden ser detectadas por análisis de secuencias en el ADN, las cuales pueden ser utilizadas como marcadores genéticos. Según Alcántara⁴, las enzimas han sido utilizadas como marcadores y fueron las primeras herramientas para establecer diferencias entre poblaciones de una especie. Sin embargo, al utilizar una manifestación observable (o fenotípica) como una medida indirecta del genotipo, la diversidad genética real frecuentemente queda sub-representada y se limita su poder resolutivo. Montaña-Perez *et al*⁵ mencionan que, sin importar su origen, los marcadores genéticos son herramientas útiles en los programas de domesticación y mejoramiento genético, ya que con ellos es posible predecir la presencia de los caracteres deseados en el animal, aun cuando no puedan observarse fácilmente. Además, permiten conocer desde los primeros estadios de crecimiento, si la característica deseada ha sido heredada, ya que el análisis se hace en el genoma que, en términos reales, permanece inalterado durante toda la vida del organismo.

Diversos marcadores genéticos han sido utilizados en camaronicultura para estudios de variabilidad genética. El marcador genético RAPD (del inglés Random Amplified Polymorphic DNA) consiste en la amplificación al azar de secuencias cortas de nucleótidos, mediante la utilización de pequeños iniciadores de 8 a 10 bp (pares de bases) que reconocen sitios anónimos en el genoma total, los cuales son amplificados por PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction). Como lo describen Arif *et al*⁶, RAPD es una técnica de análisis molecular firmemente establecida, relativamente barata, confiable y debido a su rapidez, puede ser utilizada para el análisis poblacional en un alto número de individuos, siempre y cuando se conserven las condiciones de amplificación.

En el presente trabajo se pudo generar información respecto a la variabilidad genética que presentan algunas poblaciones (naturales y de cultivo) de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en la región del Pacífico Nariñense, especialmente de la región cercana a Tumaco, mediante el marcador genético RAPD. La información generada en el presente estudio puede utilizarse como base en los programas de mejoramiento genético de esta especie en la región del Pacífico Nariñense, permitiendo conocer las características genéticas de las poblaciones (tanto naturales como de cultivo) y disponer de material que permita conservar e incrementar la variabilidad genética de las poblaciones de estudio.

⁴ ALCÁNTARA, Miroslava. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Ecología Molecular. México D. F.: Instituto Nacional de Ecología SEMARNAT, 2007. p. 544-545.

⁵ MONTAÑO-PEREZ, *et al.* Op. cit., p. 1.

⁶ ARIF, Ibrahim, *et al.* DNA marker technology for wildlife conservation. En: Saudi Journal of Biological Sciences. 2011. vol. 18. p. 219, 220.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Estimar la variabilidad genética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en tres poblaciones naturales y una de cultivo, procedentes de la región de Tumaco (departamento de Nariño), mediante la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Normalizar a las condiciones de laboratorio en la Universidad de Nariño la técnica RAPD.

Evaluar mediante la técnica RAPD los parámetros genéticos G_{st} , Φ_{PT} , AMOVA y porcentaje de polimorfismo, para tres poblaciones naturales y una de cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de la región de Tumaco.

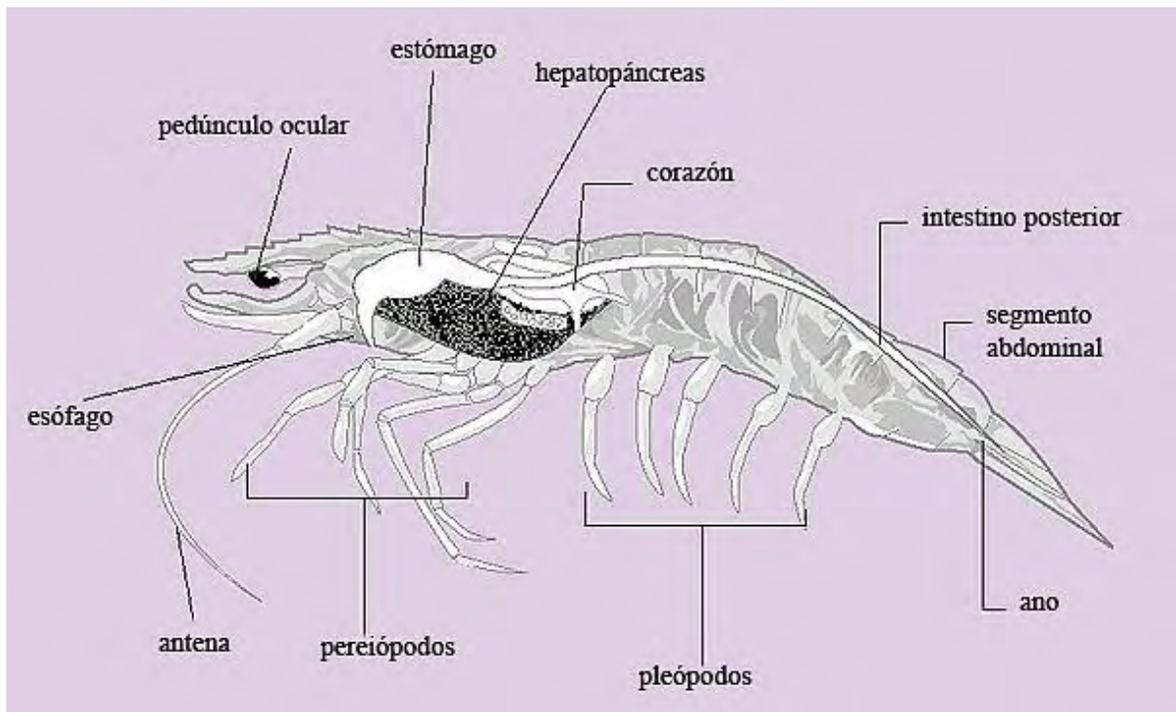
Comparar la variabilidad genética estimada para tres poblaciones naturales y una de cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* procedentes de la región de Tumaco, mediante la técnica de RAPD.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS DEL CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*).

Los camarones son animales invertebrados pertenecientes al grupo de los crustáceos. La especie *Litopenaeus vannamei* pertenece a la subclase de los malacostráceos, del orden de los decápodos, de la familia de los peneidos y según Pérez-Farfante y Kensley⁷ pertenece al género *Litopenaeus*, descrito como camarones de tégico abierto, petasma con costa ventral pequeña que no alcanza el margen distal del lóbulo lateral, surco y cresta adrostral pequeños, cresta gastrofrontal ausente y cresta hepática prominente. A este género pertenecen además especies como *L. schmitti*, *L. stylirostris*, *L. occidentalis* y *L. setiferus*.

Figura 1. Esquema general de la anatomía de un camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).



Fuente: FAO. Anatomía interna y externa de un camarón peneido.

⁷ PÉREZ-FARFANTE, I. y KENSLEY, B. *Penaeoid and Sengestoid shrimp and prawns of the World: Keys and diagnoses for the families and genera*. Leiden: Universal Books Services, 1997. p. 157.

La especie *L. vannamei* es conocida regionalmente como “camarón blanco” del Pacífico o también “langostino”, nativa de la costa oeste del Océano Pacífico, desde México hasta las costas del Perú. Fenucci⁸ menciona que esta especie se puede encontrar en aguas costeras en profundidades desde 0 hasta 72 metros, en fondos fangosos. En las etapas de post-larva y juveniles se encuentra preferiblemente en aguas estuarinas, mientras que su edad adulta transcurre generalmente en aguas marinas.

Según Fenucci⁹, estos camarones crecen por medio de mudas sucesivas a lo largo de su ciclo de vida, y presentan metamorfosis durante su primera fase de vida llamada fase larval. Son omnívoros, se alimentan con algas, restos de plantas y varios tipos de animales como gusanos, moluscos y pequeños crustáceos. Toleran altos rangos de temperatura y salinidad, copulan en aguas estuarinas o generalmente en aguas someras, durante la madrugada. La maduración y reproducción se realiza en aguas profundas entre 15 y 60 m. Las hembras fecundadas ponen huevos en cantidades variables (entre 150000 y 1000000); al cabo de un tiempo, estos eclosionan y el ciclo continúa en una serie de estadios denominados larvales, cada uno de los cuales tiene características morfológicas determinadas y diferentes requerimientos nutricionales. En la etapa de post-larvas tienen tallas entre 6 y 14 mm de longitud total, las post-larvas pasan a formar parte del bentos de las zonas litorales, alcanzando muy rápido el estado juvenil, e iniciando así la salida a las zonas de pesca, donde llegan a la edad de reproducción, para iniciar nuevamente su ciclo. La mayoría de los camarones de este género en las zonas de reproducción, son menores de un año de edad.

2.2 CAMARONES DE CULTIVO

Según Aguilera¹⁰, los cultivos de camarón en la Costa Pacífica Colombiana se realizan en grandes estanques, de por lo menos un metro de profundidad. El sitio suele estar en un estuario o cerca de la costa, para asegurar una fuente cercana de agua salada. El cultivo de camarón se produce en dos grandes procesos: producción de semilla y engorde. Al primero se le denomina *hatchery* y comprende el desarrollo de las diversas fases de larva y post-larva. Ocurre en un laboratorio que utiliza tanques de 8 a 15 toneladas de capacidad, donde se

⁸ FENUCCI, J. Manual para la cría de camarones peneidos [en línea]. Brasil: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1988. [consultado 15 dic. 2014]. Disponible en <<http://www.fao.org/3/content/9c1078d6-7837-5588-a4d7-de54c2519536/AB466S00.htm>>

⁹ *Ibíd.*, p. 2.1.

¹⁰ AGUILERA, María. Los cultivos de camarones en la costa caribe colombiana. En: Documentos de trabajo sobre economía regional. Cartagena: Banco de la Republica – Sucursal Cartagena, 1998. p. 16.

siembran de 80 a 150 nauplios por litro de agua de mar (la tasa de supervivencia esta entre 50% y 70%).

La fase larval tiene una duración de 20 a 22 días y se inicia después que los huevos previamente fecundados y liberados por la hembra, eclosionan y salen los nauplios. Este estadio tiene 5 subestadios, dura aproximadamente dos días y se alimenta de las reservas que tenía el huevo. Luego se transforma en zoea que tiene tres subestadios, que duran entre cuatro y cinco días, durante los cuales el animal es exclusivamente fitófago, es decir, consumen básicamente microalgas. La siguiente fase es la mysis que tiene tres subestadios, dura aproximadamente cuatro días y son omnívoros. Finalmente aparece la post-larva, forma a partir de la cual el animal ya no se transforma sino solamente crece, a partir de este punto se inicia el proceso de engorde el cual comprende el crecimiento del camarón hasta llegar al tamaño comercial (10 a 20 gramos, usualmente de 12 a 17 gramos). Este tamaño es alcanzado en 95 a 120 días a partir de la siembra; el ciclo puede realizarse de una a tres veces por año, dependiendo de las condiciones climáticas¹¹.

2.3 VARIABILIDAD GENÉTICA (CONCEPTOS BÁSICOS)

Como lo mencionan Utter *et al*¹², la mayoría de los genes en los grandes organismos diploides están contenidos en estructuras del núcleo celular llamados cromosomas. Los cromosomas (y por tanto los genes) se presentan generalmente en pares como consecuencia del conjunto de cromosomas individuales heredados de los progenitores. La condición en la cual solo una parte de los cromosomas está presente (como en los *gametos* o células sexuales) se denomina *haploide*, mientras que *diploide* describe los cromosomas pareados de los *cigotos* (célula germinal resultado de la reproducción sexual) que luego formarán otras células especializadas en los organismos.

Según Brandenberg *et al*¹³, la localización de un gen en un cromosoma es llamada *locus* (plural *loci*). El par de genes heredados en los diploides permite dos diferentes formas de un gen en un locus particular (dentro de un único individuo). Las formas diferentes de un gen son llamadas *alelos*. Muchos alelos pueden

¹¹ *Ibíd.*, p. 7.

¹² UTTER, Fred, AEBERSOLD, Paul y WINANS, Gary. Interpreting genetic variation detected by electrophoresis. *En*: Population genetics and fishery management. Washington: University of Washington Press, 1991. p. 23.

¹³ BRANDENBERG, Oliver, *et al*. Biotechnology in animal production. *En*: Introduction to molecular biology and genetic engineering. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011. p. 61.

existir para un locus particular en una especie, pero un solo organismo diploide puede cargar no más de dos alelos en un locus. Un individuo es *homocigoto* en un locus particular si los genes en ese locus son idénticos, y *heterocigoto* si son diferentes. Se dice que un locus es *monomórfico* si solo se observa un alelo, y *polimórfico* si dos o más alelos son observados. El conjunto de alelos poseído por un individuo en un locus (o grupo de loci) se conoce como el *genotipo* del individuo en ese locus. El *fenotipo* es el carácter observado en un individuo, y puede estar influenciado por el medioambiente al igual que por el genotipo.

Según Hartl y Clark¹⁴, la diversidad o variabilidad genética se refiere a la variedad de diferentes genes en una población reproductiva, dentro de una especie o dentro de todas las especies encontradas en un área dada y por ende, la capacidad de responder tanto a cambios de índole ambiental como a transformaciones dadas por algún tipo de selección, ya sea natural o generada con algún propósito.

Bürger *et al*¹⁵ señalan que la variación genética de un rasgo, es decir, la materia prima de la evolución, es una propiedad bastante efímera. Depende del complemento de genes que se segregan actualmente en la población, el efecto de los alelos presentes y sus frecuencias. Siempre que un alelo cambia su frecuencia o se arregla la variación genética, el carácter puede cambiar. Lo mismo es verdad para las correlaciones genéticas, ya que no sólo dependen de los alelos que se segregan sino también del desequilibrio de la unión entre ellos. Para estudiar estos fenómenos, se ha desarrollado la genética de poblaciones que permite entender la dinámica de la variación genética.

2.4 GENÉTICA DE POBLACIONES (CONCEPTOS BÁSICOS)

Según Hartl y Clark¹⁶, los estudios de genética de poblaciones proporcionan información sobre la estructura poblacional y la naturaleza de la variación genética que existe en las poblaciones naturales. El grado de variación genética de una población es un parámetro fundamental, porque determina el potencial evolutivo de la misma. Al cambiar la composición genética de las poblaciones se produce el proceso evolutivo de la especie. La genética poblacional intenta describir, tanto cualitativa como cuantitativamente, la variación genética dentro de la población estudiada. Estos estudios tratan de explicar cuáles son los mecanismos por los

¹⁴ HARTL, D. y CLARK, A. Genetic and phenotypic variation. En: Principles of population genetics. 4 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2007. p. 14.

¹⁵ BÜRGER, R., *et al*. How much heritable variation can be maintained in finite populations by mutation-selection balance? En: Evolution. Diciembre, 1989. vol. 43, no. 8. p. 1752.

¹⁶ HARTL y CLARK. Op. cit., p. 4, 15.

cuales evoluciona una especie y de responder a cuestiones específicas sobre la historia particular de esa especie y de sus poblaciones.

Como lo señala Sturtevant¹⁷, dentro de una determinada especie no existe una absoluta homogeneidad genética, sino que distintas poblaciones de una misma especie pueden presentar ligeras diferencias genéticas. Los cambios en la composición genética de las poblaciones se deben a distintos mecanismos que afectan las frecuencias génicas de la población. Los procesos de mutación, recombinación, migración, deriva genética y selección natural influyen en la naturaleza y velocidad de estos cambios. Hartl y Clark¹⁸ también indican que las variantes genéticas generadas por estos procesos pueden aumentar o disminuir la frecuencia, independientemente de si son o no cambios adaptativos útiles a sus portadores. En cambio, la selección natural es el único proceso evolutivo que es direccional respecto a la adaptación. La naturaleza adaptativa de los organismos, tanto en su fisiología como comportamiento es debida a la selección natural.

Sbordoni *et al*¹⁹ afirman que desde el punto de vista genético, la variabilidad genética es el atributo más importante en una población y constituye el material sobre el cual actúa la selección natural. A mayor variabilidad se incrementan las probabilidades de que una población enfrente exitosamente los cambios en su ambiente. En una población de cultivo, el hombre también actúa sobre la variabilidad genética seleccionando los fenotipos que determinan algún carácter de importancia comercial, pero si no se tiene un manejo adecuado de los reproductores, puede deteriorarse la variabilidad genética del cultivo. El deterioro genético puede aumentar, como lo indican Labasena *et al*²⁰, con la disminución del tamaño poblacional y ocurre principalmente por la endogamia y la deriva genética.

Los estudios de genética poblacional en animales son una herramienta útil para los programas de conservación, como lo demuestran Sunden y Davis²¹. La pérdida de diversidad genética disminuye la capacidad para mantener y mejorar la producción pecuaria y reduce la aptitud para hacer frente a nuevas condiciones

¹⁷ STURTEVANT, A. A history of Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 60.

¹⁸ HARTL y CLARK. Op. Cit., p. 115.

¹⁹ SBORDONI, V., *et al.* Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). En: Aquaculture. 1986. vol. 57. p. 239, 240.

²⁰ LABASENA, M.; TORRES, M. y ESPINOSA, G. Variabilidad y distancia genética en especies de *Penaeus*. En: Revista de Investigaciones Marinas. Marzo, 1994. vol. 15, no. 1. p. 80, 81.

²¹ SUNDEN, Sara y DAVIS, Scott. Evaluation of genetics in a domestic population of *Penaeus Vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. En: Aquaculture. Septiembre, 1991. vol. 97, no. 2-3. p. 131, 132, 139.

ambientales. Adicionalmente, el monitoreo de la diversidad genética es esencial para poder mejorar los programas de selección con el fin de mostrar que tan bien las poblaciones domésticas representan las variaciones naturales de las especies. Los datos de diversidad genética pueden proveer información acerca de alelos raros, decrecimiento de la heterocigosidad e incremento en los niveles de entrecruzamiento dentro de los programas de cría.

2.5 MARCADORES GENÉTICOS

Según Brandenberg *et al*²², un marcador genético se define como una secuencia de ADN que está asociada con un rasgo particular, en términos de proximidad espacial o secuencia, y por tanto, se segrega en un patrón prácticamente idéntico y predecible como el rasgo. Este concepto surgió a mediados del siglo XX y se utilizó para describir aquellos caracteres hereditarios que permiten diferenciar a un individuo de otro, estos pueden ser expresados como un rasgo físico o por diferencias demostrables en algunos de los constituyentes del organismo (por ejemplo proteínas). Los marcadores genéticos (tanto basados en proteínas como en ADN) están controlados por un gen localizado en un cromosoma determinado y permiten realizar estudios sobre las diferencias genéticas entre individuos o poblaciones. Estos marcadores genéticos pueden incluir el gen (o una parte del mismo) que es responsable del rasgo, o secuencias de ADN que son suficientemente cercanas a los genes, de tal modo que la cosegregación, está asegurada. Según Nuez y Carrillo²³, los atributos ideales de un marcador son:

Polimorfismo (presencia de muchas formas): en términos genéticos, se refiere a la coexistencia de dos o más fenotipos alternos en una misma población o entre poblaciones. Por lo general, los diversos fenotipos son originados por los alelos alternos de un gen. A nivel molecular, el polimorfismo se refiere a la coexistencia de patrones alternos de bandas o variantes de ADN que se evidencian mediante métodos de detección.

Herencia mendeliana: es la transmisión de características hereditarias que ocurre en fundamental acuerdo con las leyes formuladas por Mendel (1822-1884).

Codominancia: Cuando la acción de los dos alelos presentes en el heterocigoto se manifiesta simultáneamente se dice que existe codominancia. Los alelos que se manifiestan simultáneamente en el heterocigoto reciben el nombre de codominantes.

²² BRANDENBERG, *et al.* Op. cit. p. 61, 62.

²³ NUEZ, Fernando. y CARRILLO, José. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 2000. p. 10-15.

Insensibilidad a la influencia de efectos ambientales y simplicidad en la identificación y análisis.

Como mencionan Queller *et al*²⁴, los métodos moleculares han sido parte esencial de las herramientas de la Biología Evolutiva y han contribuido al estudio de la descendencia. Para estudios de poblaciones o de parentesco se han usado una gran variedad de marcadores de segregación genética: aloenzimas, RFLP, (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism), ADN mitocondrial, minisatélites (multilocus o locus simples), SSR (del inglés Simple Sequences Repeats), AFLP (del inglés Amplified Fragment Length Polymorphism) y RAPD (del inglés Randomly Amplified Polymorphic DNA). La calidad de información que brindan los marcadores genéticos depende de si pueden ser marcados consistente y objetivamente, de cómo reflejan la variación genética y de si son representativos. El primer requerimiento es que las señales de detección de los marcadores sean identificadas consistentemente y puedan ser comparables. En ocasiones, el uso de marcadores permite seleccionar los individuos aun antes de que expresen el rasgo de interés. Gracias al empleo de marcadores ha sido posible mejorar muchas especies que son base de la alimentación a nivel mundial.

2.6 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA RAPD

Según Williams *et al*²⁵, RAPD es una técnica versátil que utiliza iniciadores de secuencias arbitrarias que amplifican por PCR áreas específicas distribuidas al azar por el genoma. Los fragmentos amplificados pueden ser separados en geles de agarosa o poliacrilamida, con el fin de obtener perfiles electroforéticos que variarán según el polimorfismo de los distintos individuos o grupos de individuos. Esta técnica es cómoda, rápida, requiere poco ADN y no presupone conocimientos previos sobre la secuencia. Sin embargo, como lo mencionan Dinesh *et al*²⁶ y Benecke²⁷, los fragmentos amplificados no suelen corresponder a ADN ligado a algún carácter, sino redundante, y su repetibilidad puede variar si las condiciones experimentales cambian levemente.

²⁴ QUELLER, David; STRASSMAN, Joan y HUGHES, Collin. Microsatellites and kinship. En: Trends in Ecology & Evolution. Agosto, 1993. p. 285-288.

²⁵ WILLIAMS, J., *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. En: Nucleic Acids Research. Noviembre, 1990. vol. 18, no. 22. p. 6531-6532.

²⁶ DINESH, K., *et al.* RAPD markers in fishes: an evaluation of resolution and reproducibility. En: Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. 1995. vol. 3, no. 2. p. 112–118.

²⁷ BENECKE, M. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophageous insects (diptera, coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice. En: Forensic Science International. 1998. vol. 98. p. 157, 158, 165.

Según Walker y Rapley²⁸, los iniciadores usados en RAPD son cortos (generalmente de 10 bases) y pueden ser elegidos de manera arbitraria. Este iniciador se une a secuencias complementarias de ambas cadenas de ADN, lo que resulta en la amplificación de las regiones intermedias. La amplificación de la reacción procede en condiciones de baja severidad lo que permite la vinculación entre iniciadores y ADN template a pesar de que dos secuencias totalmente complementarias no se produzcan. Como resultado, se produce un conjunto de fragmentos amplificados que varían en tamaño e intensidad y que cuando se separan por electroforesis en gel, producen un patrón de bandas específico conocido como *fingerprinting* (huella dactilar). Por lo general, los marcadores RAPD son detectados por el uso de iniciadores con un 50-80% de contenido de C-G, aunque esto suele depender también del organismo de estudio.

Bardakci²⁹ menciona que para obtener perfiles claros en RAPD se requiere garantizar que la concentración del ADN sea la misma en cada muestra variando de 20 a 30 ng por reacción. Si la concentración de ADN es muy baja los resultados son pobres y poco reproducibles, por otro lado si la concentración es excesiva, la reacción puede ser inhibida y no se obtiene ningún producto en la amplificación. Además, para los estudios con RAPDs debe probarse un cierto número de iniciadores, los cuales, poseen condiciones óptimas de reacción que deben ser ajustadas empíricamente. De estos, solo aquellos que generen perfiles de bandas consistentes y reproducibles deben ser elegidos para el estudio de los organismos.

Liu *et al*³⁰ sugieren que el uso de seis o siete iniciadores, son suficientes para evaluar la variabilidad genética dentro y entre poblaciones de especies altamente polimórficas. O'Connell *et al*³¹ mostraron que tamaños de muestra de entre 25-30 individuos son adecuados para identificar los genotipos presentes en poblaciones de salmón del atlántico, pero se necesita mayor cantidad de muestras para diferenciar poblaciones muy cercanas.

²⁸ WALKER, J. y RAPLEY, R. Molecular biomethods handbook. 2 ed. [s.l.] Humana Press, 2008. p. 141-146.

²⁹ BARDAKCI, Fevzi. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. En: Turkish Journal of Biology. 2001. vol. 25, no. 2. p. 185-192.

³⁰ LIU, Zhao-Wei, *et al*. Genetic relationships and variation among ecotypes of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) determined by random amplified polymorphic DNA markers. En: Genome. Diciembre, 1994. vol. 37, no. 6. p. 1011,1015.

³¹ O'CONNELL, M.; SKIBINSKI, D. y BEARDMORE, J. Mitochondrial DNA and allozyme variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations in Wales. En: Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 1995. vol. 52, no 1. p. 171-174

Como lo describen Arif *et al*³², RAPD es una técnica que ha sido utilizada de manera exitosa para generar marcadores moleculares de uso en diversas disciplinas y debido a su rapidez, puede ser utilizado para análisis poblacional en un alto número de individuos, siempre y cuando se conserven las condiciones de amplificación. Si bien existen otros métodos de análisis más potentes y a pesar de los inconvenientes de reproducibilidad, RAPD es una técnica de análisis molecular firmemente establecida, relativamente barata, rápida y confiable, con amplia aplicabilidad en genética.

³² ARIF, *et al.* Op. cit., p. 219, 220.

3. ANTECEDENTES

Según Bray y Lawrence³³, en varios países las poblaciones silvestres de camarón han sido afectadas por la explotación pesquera y eventos naturales observándose una disminución y desestabilización de las poblaciones de reproductores de camarón. Lo anterior, unido a la incidencia de enfermedades en animales de cultivo, incrementando la necesidad de desarrollar una industria más estable desde el punto de vista productivo. Como afirman Carr *et al*³⁴ para lograr un programa genético con buenas probabilidades de éxito es necesario generar una estructura genética y una variabilidad amplia en las poblaciones base de selección, generando linajes domésticos libres de enfermedades o resistente a ellas, para esto, es necesario disponer de poblaciones naturales cuya caracterización en cuanto a variabilidad y estructura genética sea conocida y así disponer de material para aumentar las características genéticas en caso de que estas disminuyan durante el programa de mejoramiento. Debido a esto, se ha impulsado la implementación de programas de mejoramiento genético en camarón, apoyando el sector pesquero al crear programas de optimización del recurso con las poblaciones disponibles.

Según Andriantahina *et al* (2013)³⁵, las especies *Litopenaeus vannamei* y *Penaeus monodon* contribuyen al 87% de la producción de camarones de cultivo a lo largo del mundo, lo cual ha incrementado al interés en los estudios genéticos referentes a esta especie. Como lo reportan Valles-Jimenez *et al*³⁶, para *L. vannamei* diferentes marcadores moleculares han sido mejorados para su uso en esquemas de cultivo: para evaluar la diversidad genética, detectar parentesco, estructura poblacional y facilitar la trazabilidad.

³³ BRAY, William y LAWRENCE, Addison. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. En: Marine Shrimp Culture: principles and practices. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1992. p. 93-100.

³⁴ CARR, W., *et al*. Genetic variation in weight and survival in a population of specific pathogen-free shrimp, *Penaeus vannamei*. En: Diseases in Asian Aquaculture III. Manila: Asian Fisheries Society, 1997. p. 265-271.

³⁵ ANDRIANTAHINA, Farafidy, *et al*. Current status of genetics and genomics of reared *Penaeid* shrimp: information relevant to Access and benefit sharing. En: Marine Biotechnology. Agosto, 2013. vol. 15, no. 4. p. 399.

³⁶ VALLES-JIMENEZ, R.; CRUZ, P. y PEREZ-ENRIQUEZ, R. Population genetic structure of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA variation. En: Marine Biotechnology. Agosto, 2004. vol. 6, no. 5. p. 476, 482.

Más de 9000 secuencias referentes a *L. vannamei* se han acumulado en bases de datos públicas, tal como la NCBI³⁷ (hasta el año 2009). Además, según Yang *et al*³⁸ y Lay *et al*³⁹, varios genes se han clonado y sus respectivos patrones de expresión han sido reportados. Por otra parte, Ibarra⁴⁰ menciona que en la última década se han iniciado nuevos programas de crianza (tanto locales como nacionales) en muchos países para distintas especies de camarón, para *L. vannamei* se reportan algunos avances en Brasil, Colombia, Ecuador y México.

En 2004 el grupo de Pérez *et al*⁴¹, publicó el estudio de un mapa de ligamiento genético sexo-específico para *L. vannamei* generando la información a partir de marcadores AFLP en machos y hembras, encontrándose que el mapa de las hembras fue 24% más largo que el mapa de los machos. Por su parte, Zhang *et al*⁴² reportaron un mapa de ligamiento genético para esta misma especie utilizando microsatélites y marcadores AFLP en su estudio. Se seleccionaron 108 combinaciones de iniciadores AFLP y 30 marcadores microsatélites polimórficos que produjeron 2071 marcadores que fueron polimórficos en cada uno de los progenitores y fueron segregados en la progenie, encontrándose altas tasas de recombinación en los mapas de ambos progenitores.

Freitas *et al*⁴³ reportan reducciones en la variabilidad genética de *L. vannamei* en poblaciones de cultivo debido, en su mayoría, a efectos de embotellamiento y

³⁷ UNITED STATES OF AMERICA. National Center for Biotechnology Information. Base de datos de publicaciones científicas [base de datos en línea]. Disponible en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>

³⁸ YANG, Y., *et al.* Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. En: Journal of Biological Chemistry. Septiembre, 2003. vol. 278. p. 36859.

³⁹ LAY, Ching-Yi; CHENG, Winton y KUO, Ching-Ming. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. En: Fish & Shellfish Immunology. Mayo, 2005. vol. 18, no. 5. p. 417.

⁴⁰ IBARRA, Ana Maria, *et al.* Progress on the genetics of reproductive performance in penaeid shrimp. En: Aquaculture. Agosto, 2007. vol. 268. p. 23-25, 30-38.

⁴¹ PÉREZ, Franklin., *et al.* A sex-specific linkage map of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* based on AFLP markers. En: Aquaculture. Septiembre, 2004. vol. 242. p. 105.

⁴² ZHANG, Liusuo., *et al.* A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates. En: Genetica. Septiembre, 2007. vol. 131, no. 1. p. 37.

⁴³ FREITAS, PD; CALGARO, MR. y GALLETI junior, PM. Genetic diversity within and between broodstocks of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (*Decapoda, Penaeidae*) and its implication for the gene pool conservation. En: Brazilian Journal of Biology. Diciembre, 2007. vol. 67, no. 4. p. 939.

endogamia. Por su parte De Donato *et al*⁴⁴ y Andriantahina *et al* (2012a)⁴⁵, reportan resultados benéficos de los programas de selección y cría para las poblaciones de *L. vannamei* en Venezuela y China respectivamente. Estimaciones de heredabilidad en crecimiento para *L. vannamei* han sido reportadas por Castillo-Juárez *et al*⁴⁶, Ibarra y Famula⁴⁷ y Andriantahina *et al* (2012b)⁴⁸. Por su parte Argue *et al*⁴⁹ y Gitterle *et al*⁵⁰ han reportado estudios de heredabilidad en la resistencia a enfermedades en esta misma especie.

Sunden y Davis⁵¹ evaluaron la variación genética en poblaciones naturales de *L. vannamei* procedentes de México, Panamá y Ecuador y la compararon con una población de cultivo utilizando 26 loci aloenzimáticos, encontrando baja diferenciación entre las poblaciones estudiadas y demostrando también los efectos de pérdida de heterocigosidad en las poblaciones cautivas de esta especie.

Los estudios de Soto-Hernández y Grijalva-Chon⁵² con poblaciones naturales de *L. vannamei* en México (utilizados comúnmente como progenitores), mostraron

⁴⁴ DE DONATO, Marcos, *et al*. Mass selection and inbreeding effects on a cultivated strain of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in Venezuela. En: Genetics in Aquaculture VIII. June, 2005. vol. 247, no. 1-4. p. 159.

⁴⁵ ANDRIANTAHINA, Farafidy, *et al*. Response to selection, heritability and genetic correlations between body weight and body size in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Marzo, 2012a. vol. 30, no. 2. p. 200.

⁴⁶ CASTILLO-JUÁREZ, Héctor, *et al*. Heritability for body weight at harvest size in the Pacific white shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, from a multi-environment experiment using univariate and multivariate animal models. En: Aquaculture. Noviembre, 2007. vol. 273, no. 1. p. 42.

⁴⁷ IBARRA, Ana y FAMULA, Thomas. Genotype by environment interaction for adult body weights of shrimp *Penaeus vannamei* when grown at low and high density. En: Genetics Selection Evolution. Septiembre, 2008. vol. 40, no. 5. p. 541.

⁴⁸ ANDRIANTAHINA, Farafidy, *et al*. Assessment of age genetic correlations for weight in pond reared *Litopenaeus vannamei*. En: Journal of Animal Science Advances. 2012b. vol. 2, no. 4. p. 380.

⁴⁹ ARGUE, Brad, *et al*. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura syndrome virus. En: Aquaculture. Febrero, 2002. vol. 204, no. 3-4. p. 447.

⁵⁰ GITTERLE, Thomas. Genetic (co)variation in resistance to white spot syndrome virus (WSSV) and harvest weight in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. En: Aquaculture. 2005. vol. 246. p. 139.

⁵¹ SUNDEN y DAVIS. Op. cit., p. 131.

⁵² SOTO-HERNANDEZ, J. y GRIJALVA-CHON, J. Genetic differentiation in hatchery strains and wild white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone, 1931) from northwest Mexico. En: Aquaculture International. 2004. vol. 12. p. 593.

bajos valores de heterocigosidad y polimorfismo utilizando 10 sistemas aloenzimáticos. Por su parte, Perez-Enriquez *et al*⁵³ reportan valores más elevados de heterocigosidad y polimorfismo en poblaciones de cultivo de *L. vannamei* en México utilizando microsatélites, evidenciando los resultados de procesos de cultivo adecuados, los cuales garantizan la conservación de la diversidad genética en estas poblaciones.

Fresneda⁵⁴ reporta valores elevados de heterocigosidad y polimorfismo para poblaciones naturales de *L. vannamei* provenientes de las costas ecuatorianas utilizando marcadores ISSR (del inglés Inter Simple Sequence Repeat). Sus estudios indicaron, sin embargo, que no existe estructura poblacional entre las muestras utilizadas. El estudio de Casalla⁵⁵ sobre distancias genéticas para poblaciones de la misma región indicó solo una diferenciación moderada en las especies de estudio.

Con RAPDs Magalhães *et al*⁵⁶ y Freitas *et al*⁵⁷ reportan estudios sobre variabilidad genética en especies de cultivo de *L. vannamei* en Brasil, encontrándose baja variabilidad genética en las poblaciones. Del mismo modo, los estudios realizados por Valerio-García y Grijalva-Chon⁵⁸ en el Golfo de California (con RAPDs) y Cruz *et al*⁵⁹ en México (con microsatélites), indican una tendencia similar para poblaciones del mismo tipo.

⁵³ PEREZ-HENRIQUEZ, Ricardo; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, Fidencio y CRUZ, Pedro. Genetic diversity status of White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico. En: Aquaculture. Diciembre, 2009. vol. 297, no. 1-4. p. 44.

⁵⁴ FRESNEDA, Adriana. Determinación de la estructura poblacional de *Litopenaeus vannamei* mediante ISSRs a lo largo de la costa ecuatoriana. Tesis de Magister en Ciencias. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, 2003. p. 47.

⁵⁵ CASALLA, Robin. Medición de distancias genéticas en poblaciones de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en la costa ecuatoriana. Tesis de Magister en Ciencias. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, 2003. p. 51.

⁵⁶ MAGALHÃES, Marcelo; MARTINEZ, Romari y GALOTTO, Fernanda. Genetic diversity of *Litopenaeus vannamei* cultivated in Bahia State, Brazil. En: Pesquisa Agropecuária Brasileira. Agosto, 2007. vol. 42, no. 8. p. 1131.

⁵⁷ FREITAS; CALGARO y GALLETI. Op. cit., p. 939, 940.

⁵⁸ VALERIO-GARCIA, Roberto y GRIJALVA-CHON, Jose. Random-amplified Polymorphic DNA analysis in hatchery populations and wild Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* from the Gulf of California. En: Aquaculture Research. Abril, 2008. vol. 39, no. 6. p. 666.

⁵⁹ CRUZ, Pedro., *et al*. Genetic Variability Assessed by Microsatellites in a breeding program of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). En: Marine Biotechnology. Abril, 2004. vol. 6, no. 2. p. 157.

En dos estudios anteriores el Grupo de Investigación Bioquímica y Estudios Genéticos BIOGEN de la Universidad de Nariño, caracterizó genéticamente poblaciones de camarón blanco *L. vannamei* de la costa Pacífica de Nariño. Delgado y Reyes⁶⁰ estudiaron una población de cultivo (Balboa) y una población natural (La Ensenada) encontrando que sus valores de heterocigosidad fueron 0,1761 y 0,1951 respectivamente. Así mismo encontraron bajos porcentajes de polimorfismo (21% - 24%) y un índice de diferenciación F_{st} bajo ($F_{st} = 0,06739$).

Por su parte Hernández y Rosales⁶¹ estudiaron seis poblaciones de camarón blanco *L. vannamei* (cuatro poblaciones naturales y dos de cultivo), utilizando ocho *loci* electroforéticos que resolvieron ocho sistemas de proteínas. Se encontró que la población más variable fue la población natural de La Chorrera ($u_{He} = 0,49$) con un promedio de 3,12 alelos por locus, mientras que las menos variables son las poblaciones de cultivo ($u_{He} = 0,31$) con un promedio de 2,3 alelos por locus. Se encontró que el porcentaje promedio de polimorfismo fue de 93,5% para las poblaciones naturales y de 68,7% para las de cultivo. Además, se encontró que existe una diferenciación genética considerable entre las poblaciones naturales ($F_{st} = 0,35$), igualmente se reportan valores elevados para las distancias genéticas entre las poblaciones de estudio.

⁶⁰ DELGADO, Flor y REYES, Nancy. Estimación de la variabilidad genética en una población natural y una cautiva del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) de la región de Tumaco mediante la técnica de electroforesis de aloenzimas multilocus. Trabajo de Grado Químico. Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química, 2006. p. 59.

⁶¹ HERNÁNDEZ, Ana María y ROSALES, Álvaro. Caracterización bioquímica y análisis genético en las poblaciones naturales y cautivas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de la costa pacífica nariñense. Trabajo de Grado Químico. Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química, 2009. p. 68.

4. METODOLOGÍA

4.1 ÁREA DE ESTUDIO

La Bahía de Tumaco se constituye en la mayor entrante de la Costa Pacífica Colombiana y está ubicada en el departamento de Nariño a 304 kilómetros al sur occidente de la ciudad de San Juan de Pasto (capital del departamento) en cercanías de la frontera con Ecuador entre las latitudes 1°45' y 2°00' N y las longitudes 78°80' y 78°45' O, comprendiendo un área de aproximadamente 350 km² con aguas que presentan profundidades entre los cero y cincuenta metros. Posee alta pluviosidad, con bosque húmedo tropical y bosque pluvial pre-montano. El bosque de manglar es el principal medio de asociación vegetal y se interrelaciona con la gran variedad de fauna silvestre acuícola de la región⁶².

La Ensenada (de Tumaco) y las zonas aledañas de Salahonda y Bocas de Curay se escogieron como sitios de muestreo de las poblaciones naturales de camarón, ya que son las regiones de pesca más comunes. Estas regiones se encuentran a una distancia geográfica aproximada de 13 a 24 millas náuticas⁶³ (ver figura 2, pág. 36). Adicionalmente se escogió una población de cultivo obtenida de la camaronera La Carbonera (situada en la vereda del mismo nombre), ubicada aproximadamente a 15 min del municipio de Tumaco. Esta finca cuenta con varias piscinas de aproximadamente una hectárea y tres metros de profundidad, abastecidas con agua proveniente del mar a través de canales.

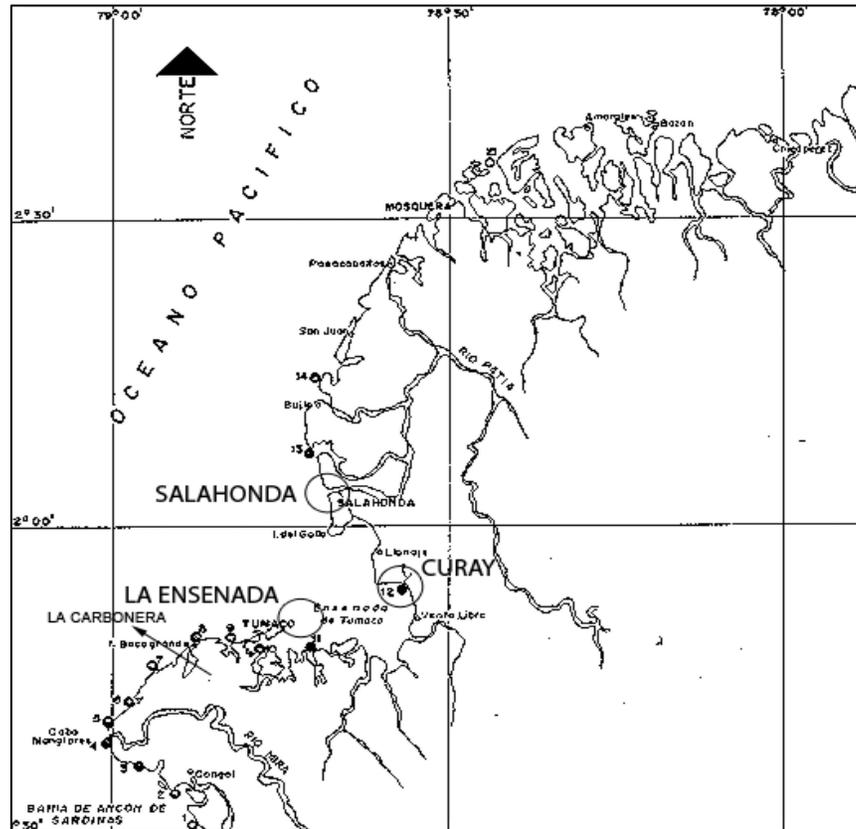
4.2 TOMA DE MUESTRAS Y TRATAMIENTO INICIAL

Se capturaron 40 ejemplares de cada población natural por arrastre de barcos pesqueros y 30 ejemplares de cultivo de la camaronera. A todos los ejemplares adultos se les extrajo un par de pleópodos que se conservaron en etanol al 70%, mientras que a los ejemplares de cultivo se les extrajo una porción de tejido abdominal (ya que tenían pleópodos muy pequeños) que se conservó en etanol al 70%. Las muestras se almacenaron a -18°C hasta su procesamiento posterior.

⁶² ALCALDÍA DE TUMACO. Nuestro municipio: información general [en línea]. [Tumaco]: Alcaldía de Tumaco, 2015. Actualizado 4 de noviembre de 2014. Disponible en: <http://www.tumaco-narino.gov.co/informacion_general.shtml>

⁶³ ALCALDÍA DE TUMACO. Nuestro municipio: documentos del municipio [en línea]. [Tumaco]: Alcaldía de Tumaco, 2015. Actualizado 10 de febrero de 2012. Disponible en: <http://www.tumaco-narino.gov.co/documentos_municipio.shtml>

Figura 2. Mapa de la región de Tumaco en el departamento de Nariño.



* Los sitios de muestreo de las poblaciones naturales se señalan con círculos, la población de cultivo aparece indicada con una flecha.
Fuente: Adaptado de Agencia AUPEC-Univalle. Ciencia al día.

4.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO

4.3.1 Extracción de ADN genómico. Para la extracción de ADN se probaron tres protocolos: fenol-cloroformo, CTAB y extracción con alta concentración de sal, de estos tres se seleccionó el protocolo de extracción con alta concentración de sal reportado por Aljanabi y Martínez⁶⁴ con algunas modificaciones (los protocolos adicionales se pueden consultar en los anexos A y B pág. 85-86): 50-100 mg de tejido se colocaron en tubos estériles de polipropileno de 1,5 mL y se maceraron en frío con 350 μ L de buffer de homogeneización salino (NaCl 0,4 M, Tris-HCl [pH=8,0] (10mM) y EDTA [pH=8,0] (2 mM)) (las concentraciones de reactivos entre paréntesis corresponden a concentraciones finales). Posteriormente se

⁶⁴ ALJANABI, Salah y MARTINEZ, Iciar. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *En: Nucleic Acids Research*. 1997. vol. 57, no. 22. p. 4692, 4693.

adicionaron 40 μL de SDS al 20% y 16 μL de proteinasa K de 10 mg/mL a cada muestra y se incubaron a 55-60 °C durante una hora con agitación leve. Después de la incubación se añadieron 300 μL de NaCl 6M, se agitó las muestras en vortex a máxima velocidad por 30 s y se centrifugó las muestras a 10000 rpm por 30 min. Luego se retiró el sobrenadante y se adicionó cloroformo 1:1 a la mezcla, centrifugando el conjunto a 10000 rpm por 15 min. Pasados los 15 min se separó la fase acuosa y se adicionó etanol absoluto helado en proporción 2:1, se incubó la muestra a -20 °C durante una hora aproximadamente y después se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min. El pellet de ADN se lavó dos veces con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente para finalmente ser resuspendido en TE 1X (Tris-HCl [pH=8,0] (100 mM) y EDTA [pH=8,0] (10 mM)).

La integridad y concentración del ADN se verificó por dos métodos: electroforesis en gel de agarosa y cuantificación espectrofotométrica.

4.3.2 Electroforesis en gel de agarosa. Se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa (Agarose ITM AMRESCO) al 1% en TBE 0,5X (Tris base (5,4%PV), ácido bórico (2,75% P/V) y EDTA 0,5 M (2% V/V)). Se tomaron 4 μL de ADN extraído, se mezclaron con 2 μL de EZ-Vision Three® (AMRESCO) y se sembraron en los pozos del gel. La corrida se realizó a 5 V/cm hasta que la marca de xilene cyanol (azul claro) llegó aproximadamente a la mitad del gel. Los geles de agarosa se visualizaron utilizando un transiluminador DyNA Light Dual Intensity UV Transilluminator (Labnet International) y se tomaron fotografías de los geles, las cuales fueron almacenadas como material de referencia. La calidad del ADN se verificó mediante la integridad de las bandas y la concentración se estimó a partir de un patrón de ADN Lambda (DNA Lambda (λ) Fermentas 300 ng/ μL) a tres concentraciones diferentes. Se utilizaron las bandas del marcador de peso molecular GeneRuler 100bp de Fermentas, para hacer una verificación adicional de las concentraciones. Las fotos de los geles se analizaron utilizando el programa GelAnalyzer 2010a (2010)⁶⁵.

4.3.3 Cuantificación espectrofotométrica de ADN. Se utilizó el procedimiento de cuantificación reportado por el CIMMYT⁶⁶ con algunas modificaciones: inicialmente las muestras de ADN se diluyeron en proporción 1:100 utilizando TE 1X (Tris-HCl [pH=8,0] (100 mM) y EDTA [pH=8,0] (10 mM)) como solvente y se determinó su absorbancia (A_{λ}) a 260 y 280 nm en una celda de cuarzo de 1 cm utilizando un espectrofotómetro Lambda 11 (Perkin Elmer). La concentración de ADN se estimó utilizando la siguiente relación:

⁶⁵ LAZAR, Istvan. GelAnalyzer 2010 [programa de computador]. Versión 2010a. Istvan Lazar, 2010. Disponible en <<http://www.gelanalyzer.com/>>

⁶⁶ CIMMYT. Quantification and quality control of DNA. En: Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. 3 ed. Mexico D.F.: International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), 2005. p. 11-13.

$$\text{ADN } (\mu\text{g/mL}) = \frac{A_{\lambda 260} \times \text{factor de dilucion} \times 50 \mu\text{g/mL}}{1000}$$

La pureza de las muestras se estimó calculando el coeficiente A_{260}/A_{280} . Con este método se trazó una curva de calibración con la cual se generaron patrones de concentración de ADN que posteriormente se contrastaron con los resultados del gel de agarosa para dar una estimación más precisa de la concentración de ADN.

4.4 ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA MEDIANTE RAPDs

4.4.1 Iniciadores seleccionados para la amplificación de RAPDs. Se escogieron 10 oligonucleótidos iniciadores procedentes de diferentes estudios con camarones de distintas especies. Las características de los iniciadores utilizados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Características de los iniciadores utilizados para el estudio de RAPDs en *L. vannamei*.

Código oligo	Secuencia (5' – 3')	%GC*	TM (°C)*	Referencias
1-F	TCA CGA TGC	55,6	28	García y Benzie, 1994 ⁶⁷
2-R	TGC TCA CTG	55,6	28	García y Benzie, 1994
3-F	ACG GTA CAC T	50,0	30	García y Benzie, 1994
4-R	AGG CCG CTT A	60,0	32	S. Klinbunga <i>et al</i> , 2001 ⁶⁸
5-F	AAT GTC GCC A	50,0	30	S. Klinbunga <i>et al</i> , 2001
6-R	TGT CAG CGG T	60,0	32	S. Klinbunga <i>et al</i> , 2001
7-F	CCC AAG GTC C	70,0	34	W. S. Lakra <i>et al</i> , 2010 ⁶⁹
8-R	GGT GCG GGA A	70,0	34	W. S. Lakra <i>et al</i> , 2010
9-F	CCA GAT GCA C	60,0	32	W. S. Lakra <i>et al</i> , 2010
10-R	GTG ACA TGC C	60,0	32	W. S. Lakra <i>et al</i> , 2010

* Los valores del contenido de GC (%GC) y la temperatura de fusión (TM) de los oligos iniciadores se calcularon utilizando el programa Khirshyat 1.0, 2010⁷⁰. Fuente: esta investigación.

⁶⁷ GARCIA, D. y BENZIE, J. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. En: Aquaculture. 1995. vol. 130. p. 138.

⁶⁸ KLINBUNGA, S., *et al*. Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and Mitochondrial DNA RFLP analyses. En: Marine Biotechnology. Septiembre, 2001. vol. 3, no. 5. p. 429.

⁶⁹ LAKRA, W. *et al*. Genetic characterization of *Metapenaeus affinis* (H. M. Edwards, 1837) using RAPD markers. En: Molecular Biology Reports. Diciembre, 2010. vol. 37, no. 8. p. 3757-3761.

4.4.2 Obtención de RAPDs. Los RAPDs se obtuvieron siguiendo la metodología propuesta por Valerio-García y Grijalva-Chon⁷¹ con algunas modificaciones. Se prepararon 15 µL de mezcla de reacción final usando los reactivos, concentraciones y cantidades mostradas en la tabla 2. Inicialmente se preparó una mezcla de amplificación utilizando todos los reactivos (a excepción del ADN) en un tubo estéril de polipropileno de 1,5 mL, 10 µL de la mezcla de amplificación fueron transferidos a tubos de PCR y posteriormente se adicionaron 5 µL de ADN genómico (6 ng/µL, concentración inicial). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador MyGenie 96 Thermal Block (BIONEER) en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Nariño.

Tabla 2. Mezcla de reacción para la obtención de RAPDs en *L. vannamei*.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µL)	Concentración final
PCR buffer	10X	1,5	1X
dNTPs	2 mM	3,0	0,4 mM
MgCl ₂	25 mM	1,8	3 mM
Iniciador	10 µM	1,5	1 µM
Taq polimerasa	5 U/µL	0,4	0,13 U/µL
ADN genómico	6 ng/µL	5,0	2 ng/µL
H ₂ O		1,8	
Total		15,0	

Fuente: esta investigación.

Con cada uno de los iniciadores se realizaron pruebas piloto para determinar las mejores condiciones de amplificación y reproducibilidad. Para la prueba piloto de reproducibilidad se escogieron tres muestras de cada población las cuales se probaron por triplicado (dos ensayos previos y un duplicado de cada muestra en la amplificación final), además se utilizó una muestra adicional de ADN de *Colletotrichum spp.* (proporcionada amablemente por el grupo de investigación GENPAT de la Universidad de Nariño) para verificar la correcta amplificación del grupo de muestras sometidas a PCR, debido a que no se disponía de un control de ADN de *L. vannamei*.

Las condiciones de amplificación que demostraron mejores resultados consistieron en desnaturalización inicial a 94 °C por 60 s, 40 ciclos de amplificación con

⁷⁰ YOUSSEF, Muhammad. Khirshyat 1.0 [programa de computador]. Versión 1.0. Youssef Muhammad, 2012. Disponible en <http://www.researchgate.net/publication/237090169_Khirshyat_1.0_a_Simple_Micro-Program_for_Some_Molecular_Biology_Protocols>

⁷¹ VALERIO-GARCÍA y GRIJALVA-CHON, Op. cit., p. 666.

desnaturalización a 92 °C por 60 s, hibridación a 38 °C por 75 s y extensión a 72 °C por 60 s. La extensión final se realizó a 72 °C por 15 min y las muestras se conservaron en nevera a 4 °C hasta su posterior análisis. Como blanco de reacción se utilizó mezcla de amplificación adicionando 5 µL de agua estéril en lugar de ADN.

4.4.3 Detección de RAPDs. La detección de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (C₂₁H₂₀BrN₃) al 0,5% (concentración final) en TBE 0,5X (Tris base (5,4%PV), Ácido bórico (2,75% P/V) y EDTA 0,5 M (2% V/V)). En cada pozo se agregaron 5 µL de producto de PCR con 1 µL de buffer de carga (Tris-HCl [pH=7,6] (10 mM), EDTA [pH=7,6] (10 mM), Azul de bromofenol (0,005% P/V), xylene cyanol (0,005% P/V y Glicerol (10% V/V) (concentraciones finales)). La corrida se realizó a 5 V/cm hasta que la marca de azul de bromofenol (azul tenue, cerca del cátodo) llegó aproximadamente a tres centímetros por encima del borde del gel (tiempo de corrida aproximado de dos horas). Los geles de agarosa se visualizaron utilizando un transiluminador DyNA Light Dual Intensity UV Transilluminator (Labnet International) y fotografías de los geles fueron almacenadas para su posterior análisis.

4.4.4 Análisis de los geles. El análisis de los geles de agarosa se realizó por observación directa, trazando una cuadrícula para cada población con ayuda del programa Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems). De este modo se estimó el tamaño molecular aproximado de cada fragmento amplificado tomando como base el tamaño de las bandas del marcador molecular GeneRuler 100 bp (Fermentas). Para la asignación de las bandas solo se tomaron en cuenta las bandas claramente identificables según los criterios reportados por Skroch y Nienhuis (1995)⁷² y Pan *et al* (1997)⁷³. Finalmente se procedió a realizar una matriz de datos binaria en EXCEL 2013 (Microsoft), donde 1 representa presencia y 0 ausencia. En primer lugar, los resultados se agruparon por iniciador (para todas las poblaciones), considerando que los fragmentos amplificados con el mismo iniciador en diferentes individuos son idénticos si tienen el mismo peso molecular y posteriormente, se generó una matriz consenso para todas las poblaciones con todos los iniciadores.

4.4.5 Procesamiento de datos. Con base en las matrices binarias se estimó la variabilidad genética de las poblaciones de *L. vannamei* utilizando los programas

⁷² SKROCH, P. y NIENHUIS, P. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. En: Theoretical and Applied Genetics. Noviembre, 1995. vol. 91, no. 6-7. p. 1086-1091.

⁷³ PAN, Y. *et al*. Analysis of primer-derived, nonspecific amplification products in RAPD-PCR. En: Biotechniques. Junio, 1997. vol. 22, no. 6. p. 1071-1074.

GenAIEx 6.5 (2012)⁷⁴ y PopGene 1.32 (2000)⁷⁵. Para cada población se calculó las frecuencias alélicas, grado de polimorfismo, los estadísticos G_{ST} (PopGene 1.32), Φ_{PT} (GenAIEx 6.5) y las distancias genéticas de Nei (1987) con y sin sesgo. Adicionalmente se realizó el análisis de AMOVA con GenAIEx 6.5 y se calculó una matriz de distancia genética para cada una de las muestras con tres coeficientes de similitud (concordancia simple, Jaccard y Dice) con ayuda del programa NTSYSpc 2.11 (2000)⁷⁶. Con base en la matriz de similitud que presentó los coeficientes cofenéticos más elevados (Jaccard) se construyó un árbol filogenético con un bootstrap de 2000 repeticiones utilizando el método UPGMA del programa PAST 3.05 (2015)⁷⁷. Este programa también se utilizó para realizar los arboles correspondientes a las distancias genéticas de Nei. La figura 3 resume los procesos realizados para la estimación de la variabilidad genética de las poblaciones de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* procedentes de la región de Tumaco.

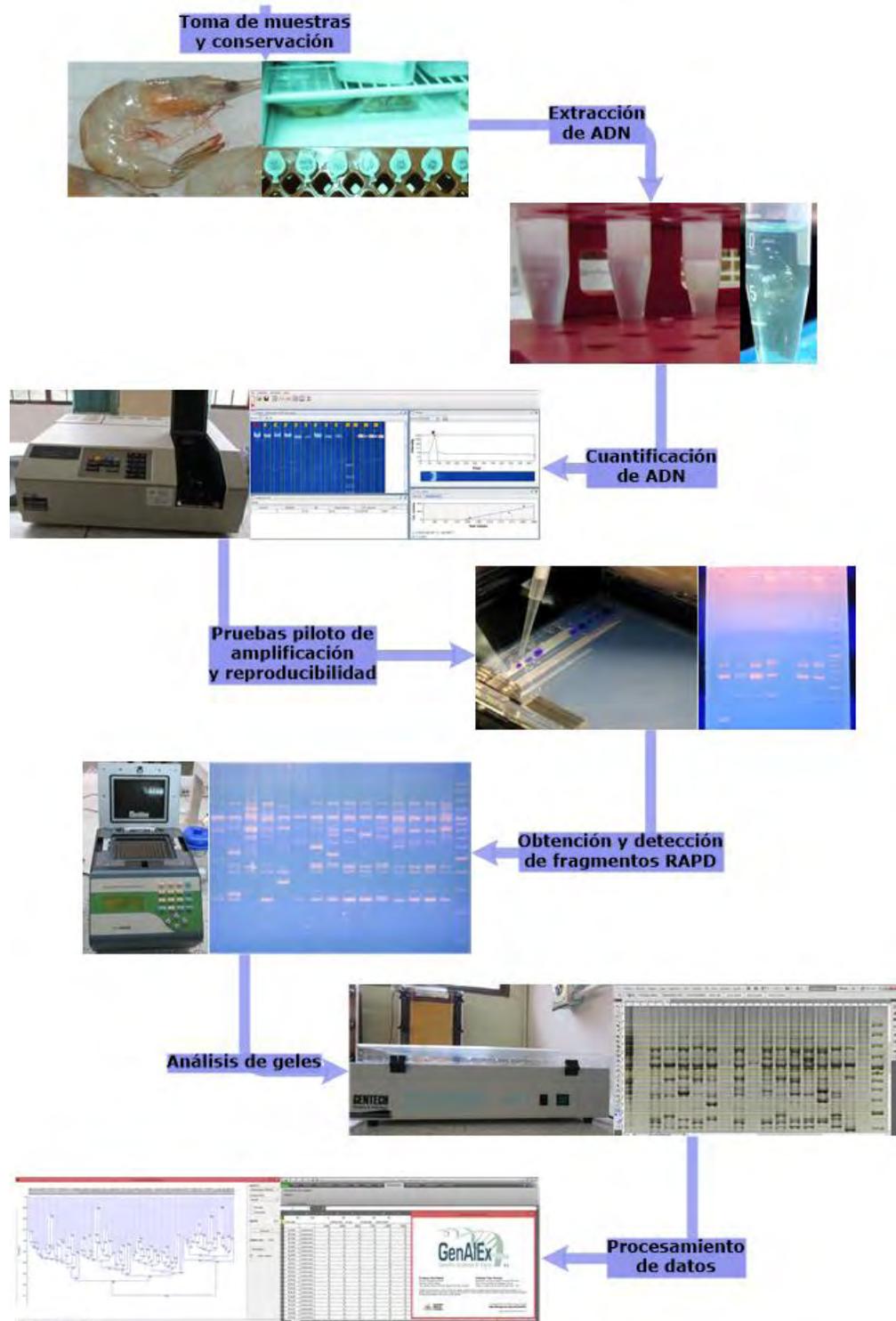
⁷⁴ PEAKALL, R y SMOUSE, P. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel [programa de computador]. Versión 6.5. Peakall and Smouse, 2012. Disponible en <<http://biology-assets.anu.edu.au/GenAIEx/Welcome.html>>

⁷⁵ UNIVERSITY OF ALBERTA y CENTER FOR INTERNATIONAL FORESTRY RESEARCH. POPGENE 1.32: population genetic analysis [programa de computador]. Versión 1.32 (32-bit). Molecular Biology and Biotechnology Centre, 2000. Disponible en <http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html>

⁷⁶ EXETER SOFTWARE. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System [programa de computador]. Version 2.1. New York: Applied Biostatistics Inc., 2000.

⁷⁷ HAMMER, Ø.; HARPER, D. y RYAN, P. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. En: Palaeontologia Electronica. 2001. vol. 4, no. 1. 9 p. Disponible en: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>

Figura 3. Esquema de la metodología utilizada para estimar la variabilidad genética de las poblaciones de *L. vannamei* de la región de Tumaco con RAPDs.



Fuente: esta investigación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 EXTRACCIÓN DE ADN

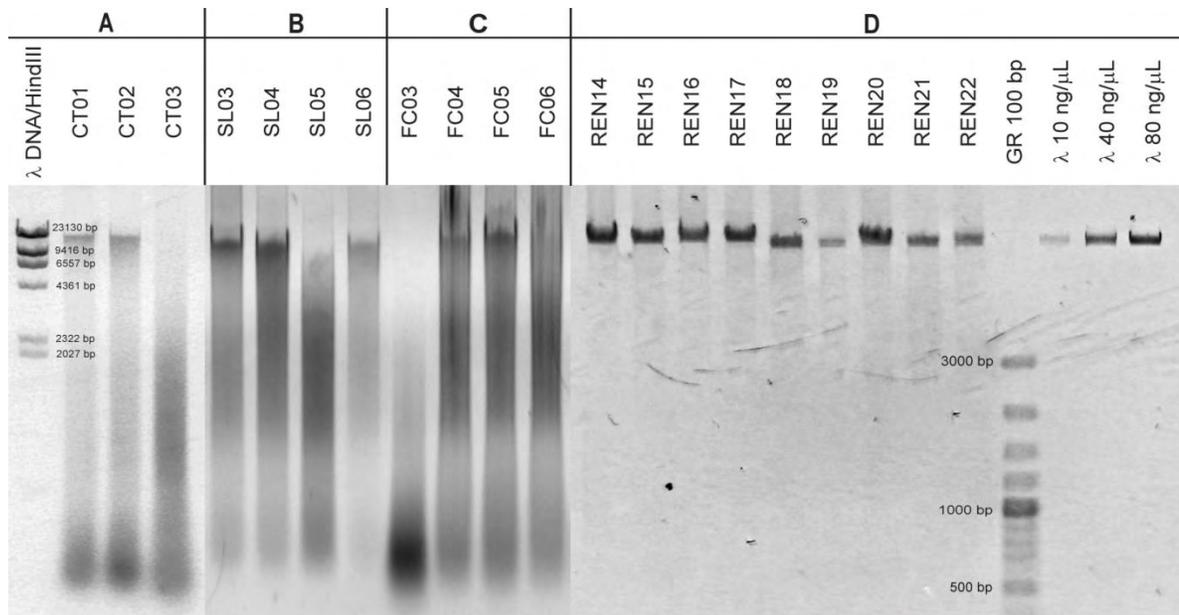
Para normalizar el protocolo de extracción de ADN a las condiciones de laboratorio en la Universidad de Nariño, se ensayaron diferentes técnicas: extracción con CTAB, con fenol-cloroformo y finalmente con alta concentración de sal. Este último protocolo, propuesto por Aljanabi y Martínez⁷⁸, produjo ADN de buena calidad en una concentración considerable, razón por la cual, se seleccionó para realizar la extracción de ADN total en cada una de las muestras. Se trata de un protocolo rápido, que utiliza pocos reactivos y genera una menor contaminación. Los detalles de los protocolos adicionales se pueden consultar en los anexos A y B (pág. 85-86).

La extracción de ADN total presentó inicialmente algunas dificultades, debido a que se observó coloración en el extracto final de las muestras de pleópodos, así como la formación de contaminantes de difícil separación después de la precipitación con alta concentración de sal. La coloración se pudo eliminar completamente después de quitar la capa externa de los pleópodos, la cual dejaba residuos insolubles que aportaban coloración al ADN extraído (además de afectar su calidad), mientras que la presencia de contaminantes luego de la digestión con proteinasa K se eliminó de manera efectiva al adicionar cloroformo luego de la precipitación con sal. Este último procedimiento no se reporta en el protocolo original, sin embargo, fue necesario llevarlo a cabo debido a que las impurezas afectaban considerablemente la calidad del ADN extraído.

La concentración de ADN obtenida por el protocolo de alta concentración de sal varió entre los 20 y 250 ng/μL, haciéndose necesaria la dilución de las muestras hasta una concentración aproximada de 6 ng/μL previo al proceso de PCR. Por otra parte, la extracción de ADN con este protocolo no generó contaminación por ARN. Una muestra de los resultados de los protocolos de extracción de ADN total se puede apreciar en la figura 4. En esta imagen se pueden observar los resultados de los diferentes tipos de extracción (A, B y C), además es posible apreciar el resultado final de la optimización del protocolo de extracción con alta concentración de sal (D), el amplio rango de concentraciones que se obtuvieron por este método y la ausencia de degradación en las muestras de ADN.

⁷⁸ ALJANABI y MARTINEZ. Op. cit., p. 4692, 4693.

Figura 4. ADN total en muestras de camarón blanco (*L. vannamei*) obtenido mediante tres protocolos de extracción.



* Electroforesis en gel de agarosa al 1% (5 V/cm) utilizando EZ-Vision Three (Fermentas) para la tinción de las muestras. **A** corresponde a la extracción con CTAB, **B** corresponde a la extracción con alta concentración de sal (sin optimizar), **C** corresponde a la extracción con fenol-cloroformo, **D** corresponde a la extracción con alta concentración de sal (optimizado). Se utilizó ADN λ (Promega) como control de concentración, GR 100bp es el marcador de peso molecular GenRuler™ 100bp (Fermentas). Las fotografías en las secciones **A-C** y **D** no están en escala según los marcadores de peso molecular y se muestran en colores invertidos para facilitar el análisis. Fuente: esta investigación.

5.2 AMPLIFICACIÓN DE RAPDs

Como mencionan Walker y Rapley⁷⁹, la técnica de RAPD no requiere conocimientos previos del ADN de partida y se puede realizar utilizando iniciadores aleatorios. Los iniciadores utilizados para el presente estudio se escogieron con base a las investigaciones realizadas por García y Benzie⁸⁰ en poblaciones de cultivo de *Penaeus monodon*, Klinbunga *et al*⁸¹ en poblaciones naturales de la misma especie y Lakra *et al*⁸² en poblaciones naturales de

⁷⁹ WALKER, J. y RAPLEY, R. Op. cit., p. 141-146.

⁸⁰ GARCIA, D. y BENZIE, J. Op. cit., p. 137-140.

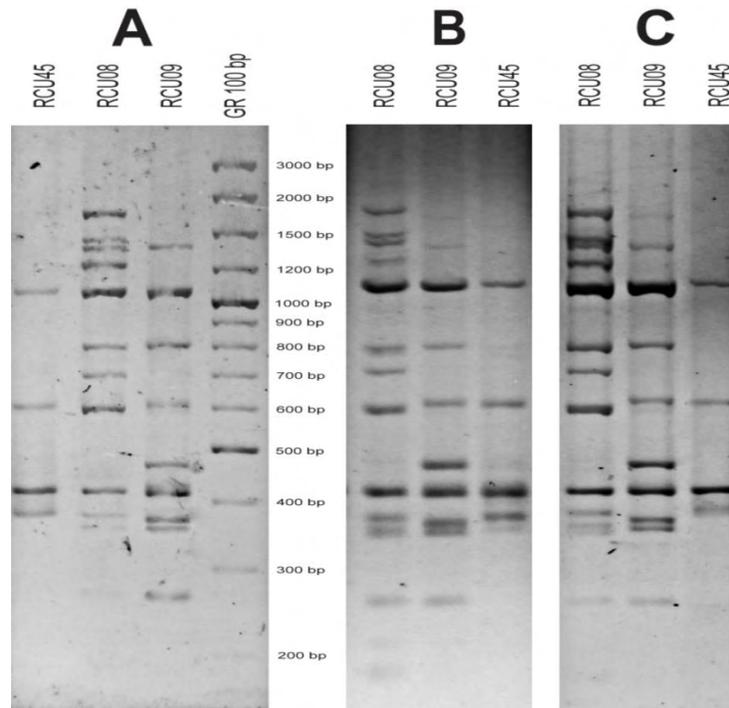
⁸¹ KLINBUNGA, *et al.* Op. cit., p. 428-435.

⁸² LAKRA, *et al.* Op. cit., p. 3757-3759.

Metapenaeus affinis, en los cuales cada iniciador se utilizó solo (no pareado como “forward and reverse”) obteniendo buenos resultados.

De los diez iniciadores ensayados, cuatro arrojaron buenos resultados: 4-R, 6-R, 9-R y 10-R. Los ensayos piloto de amplificación y reproducibilidad indicaron que estos iniciadores presentaban bandas claras y reproducibles. A partir de estos cuatro iniciadores se generaron un total de 480 perfiles de RAPD (*fingerprint*), 120 perfiles por iniciador (excluyendo controles y repeticiones) fueron producidos mediante la selección de 30 individuos de cada una de las cuatro poblaciones estudiadas. En la figura 5 se presenta una muestra parcial de los resultados de las pruebas piloto de reproducibilidad para los RAPDs de la población de Curay, obtenidos con el iniciador 4-R. Debido a la extensión de los perfiles de RAPD generados, solo una muestra parcial de estos es presentada. Se pueden observar más detalles de los perfiles en las figuras 6 a 9 (pág. 46-49) y en los anexos (pág. 87-88).

Figura 5. Resultados de las pruebas piloto de reproducibilidad para muestras de Curay con el iniciador 4-R.



* Electroforesis en gel de agarosa al 2% (5 V/cm) utilizando bromuro de etidio para la tinción de las muestras. GR 100bp es el marcador de peso molecular. **A** corresponde a los ensayos preliminares, **B** y **C** corresponden a replicas en las amplificaciones finales. La fotografía se muestra en colores invertidos para facilitar la identificación y asignación de bandas. Fuente: esta investigación.

Dentro del proceso de normalización de las condiciones de amplificación los dos parámetros que se modificaron, respecto a la metodología reportada por Valerio-Garcia y Grijalva-Chon⁸³, fueron la temperatura y el tiempo de hibridación. Para la optimización de estos parámetros se realizó un diseño de cribado tomando en cuenta que, como mencionan Newton y Graham⁸⁴, la optimización de estos parámetros es muy importante debido a que afectan considerablemente la especificidad de una reacción de PCR. Si bien, los valores de TM (temperatura de fusión) para los oligos pueden ser calculados mediante software (o realizando estimaciones directas), este parámetro debe ser ajustado empíricamente. Los cambios que se realizaron en el presente proyecto respecto al protocolo reportado en la literatura fueron el aumento de la temperatura de hibridación de los oligos y la reducción de 15 segundos en el tiempo de hibridación. También se probó el ajuste de otros parámetros, pero los que más afectaron los productos de amplificación fueron los mencionados anteriormente.

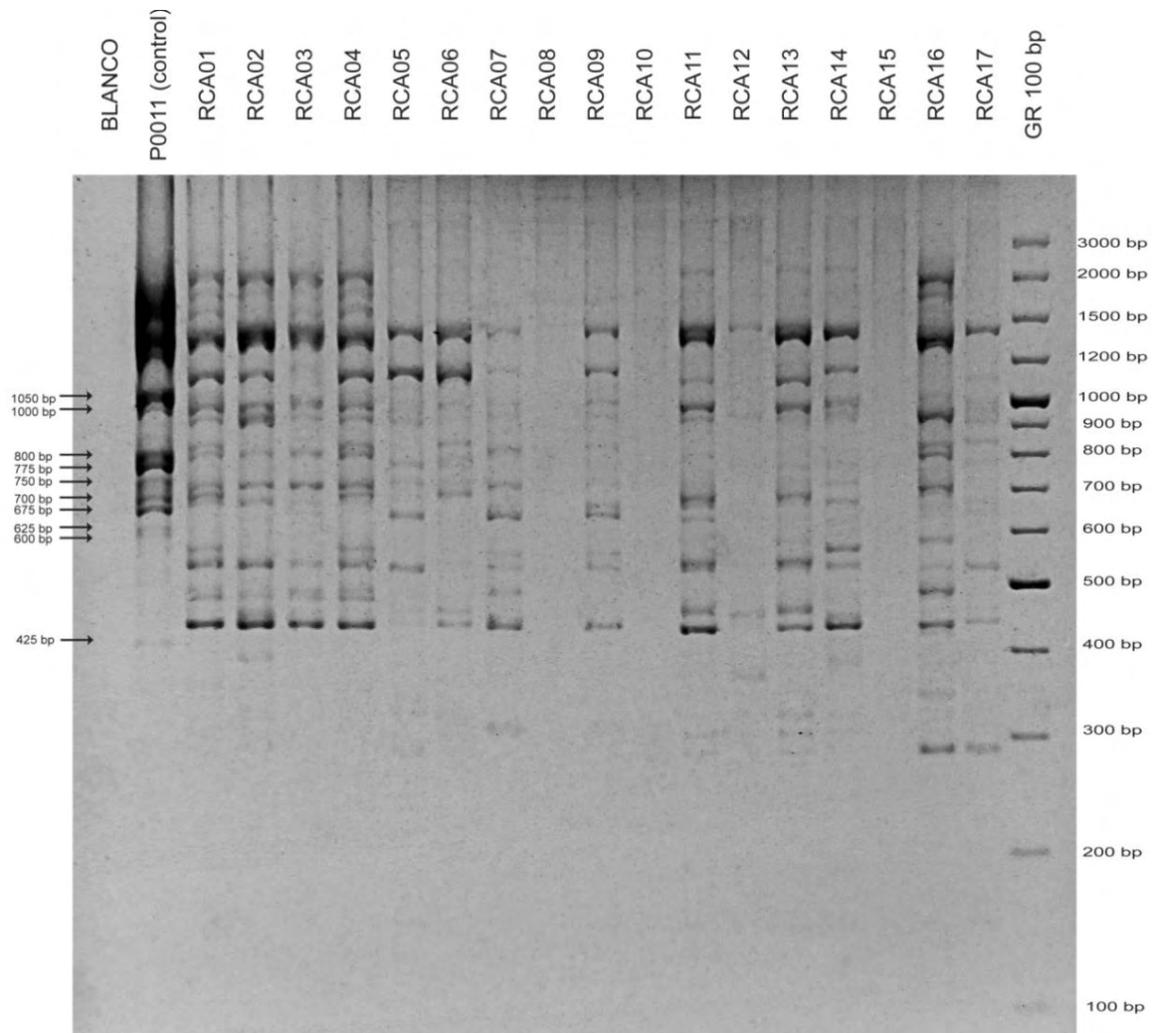
En la tabla 1 (pág. 38) se puede observar que los cuatro iniciadores presentan propiedades similares en cuanto a su porcentaje de guanina-citosina (60%) y su temperatura de fusión teórica (32 °C), lo cual podría explicar porque estos iniciadores presentaron amplificación dentro de las mismas condiciones de reacción.

Las figuras 6 a 9 muestran los resultados parciales de las amplificaciones utilizando el iniciador 9-F con cada una de las cuatro poblaciones utilizadas en el presente estudio. Debido a la extensión de los perfiles completos, solo se muestra una fracción del total de los resultados para cada una de las cuatro poblaciones. Una comparación de los perfiles parciales generados con todas las poblaciones y todos los iniciadores se puede apreciar en los anexos (pág. 87-88). De igual manera se observa el control adicional de ADN de *Colletotrichum spp.*, que sirvió para verificar el desarrollo correcto de la reacción. La aparición de esta muestra como control se debe a que fue utilizada para verificar la amplificación en las pruebas piloto (al normalizar las condiciones de reacción), debido a que estas muestras arrojaron unos perfiles de electroforesis consistentes, se decidió dejarlas como una prueba adicional del desarrollo correcto de la reacción.

⁸³ VALERIO-GARCIA y GRIJALVA-CHON. Op. cit., p. 666.

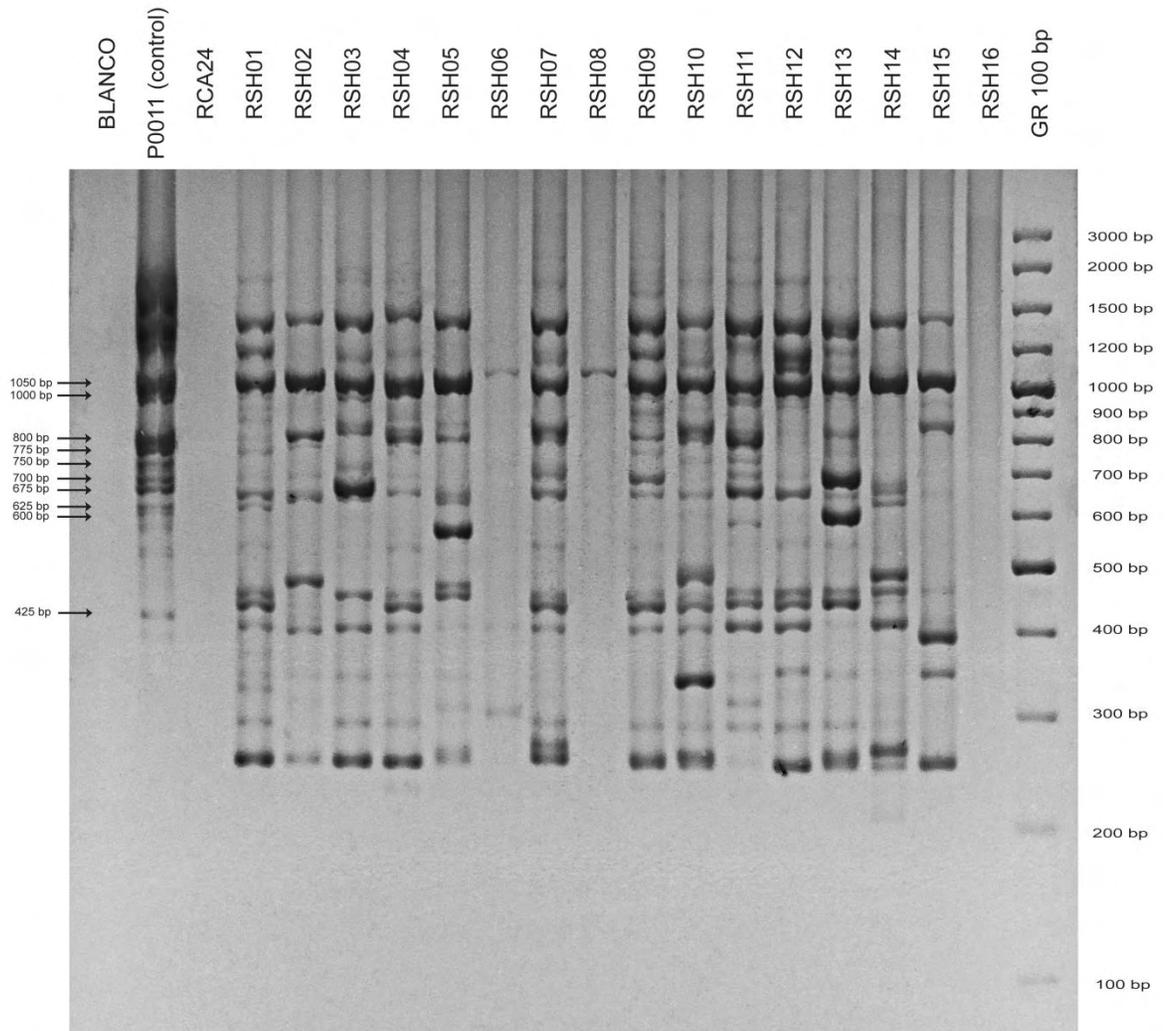
⁸⁴ NEWTON C. y GRAHAM, A. Instrumentation, reagents and consumables. En: PCR (Introduction to biotechniques series). Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 1994. p. 9-12.

Figura 6. Perfil de RAPDs para la población de La Carbonera (población de cultivo) con el iniciador 9-F.



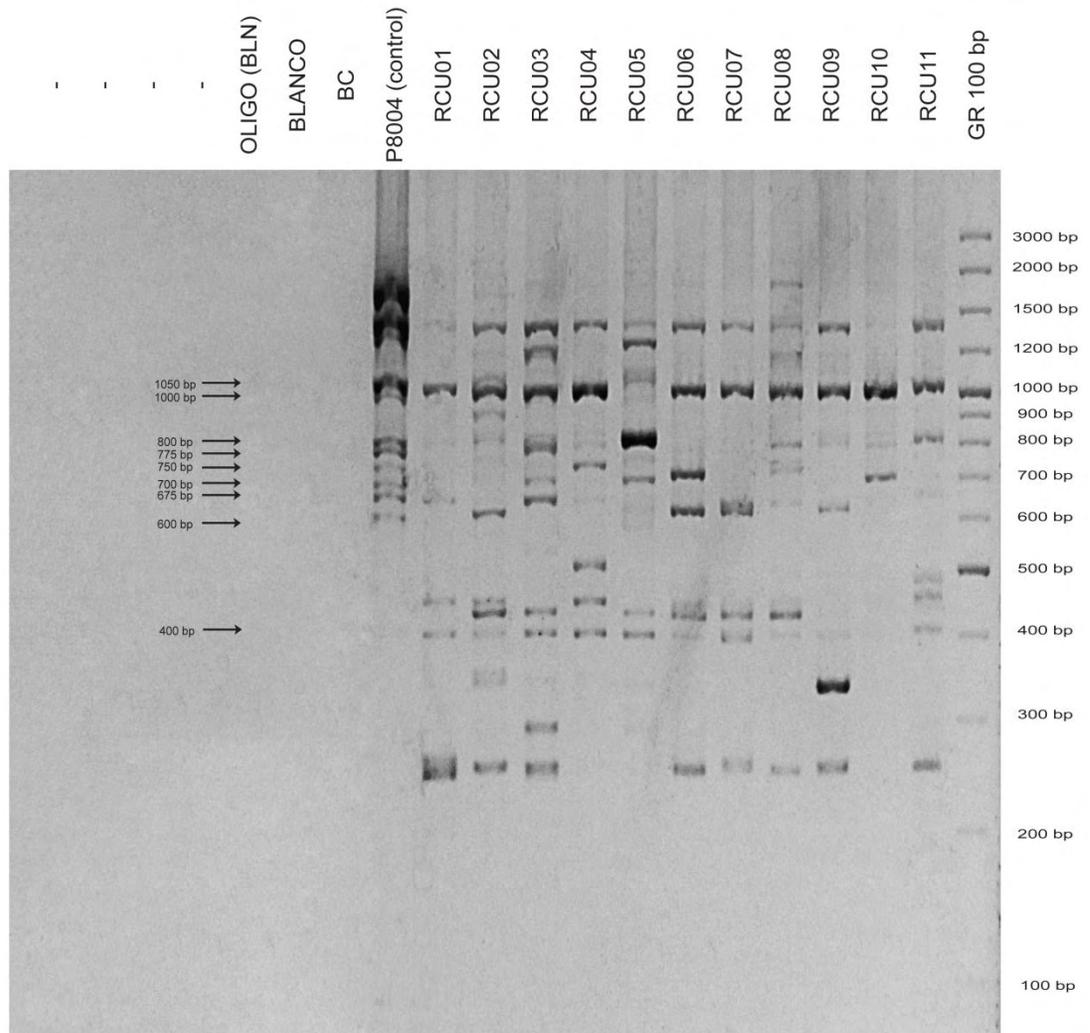
* Electroforesis en gel de agarosa al 2% (5 V/cm) utilizando bromuro de etidio para la tinción de las muestras. P0011 corresponde a una muestra de control adicional de ADN de *Colletotrichum spp.* GR 100bp es el marcador de peso molecular. La fotografía se muestra en colores invertidos para facilitar la identificación y asignación de bandas. Solo se muestra una fracción del total de individuos estudiados. Fuente: esta investigación.

Figura 7. Perfil de RAPDs correspondientes a la población de Salahonda (población natural) con el iniciador 9-F.



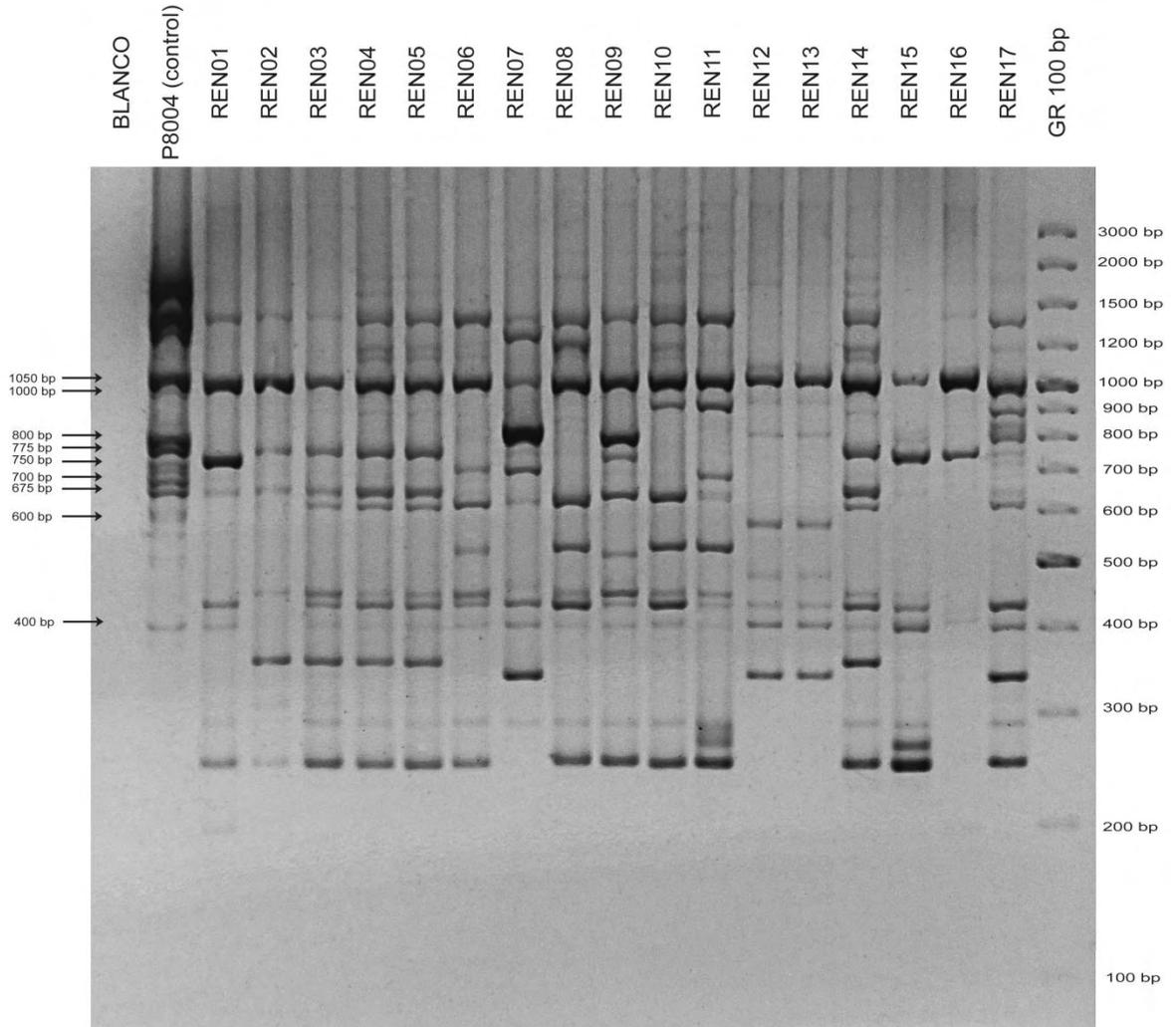
* Electroforesis en gel de agarosa al 2% (5 V/cm) utilizando bromuro de etidio para la tinción de las muestras. P0011 corresponde a una muestra de control adicional de ADN de *Colletotrichum spp.* GR 100bp es el marcador de peso molecular. La fotografía se muestra en colores invertidos para facilitar la identificación y asignación de bandas. Solo se muestra una fracción del total de individuos estudiados. Fuente: esta investigación.

Figura 8. Perfil de RAPDs correspondientes a la población de Curay (población natural) con el iniciador 9-F.



* Electroforesis en gel de agarosa al 2% (5 V/cm) utilizando bromuro de etidio para la tinción de las muestras. P8004 corresponde a una muestra de control adicional de ADN de *Colletotrichum spp.* GR 100bp es el marcador de peso molecular. La fotografía se muestra en colores invertidos para facilitar la identificación y asignación de bandas. Solo se muestra una fracción del total de individuos estudiados. Fuente: esta investigación.

Figura 9. Perfil de RAPDs correspondientes a la población de La Ensenada (población natural) con el iniciador 9-F.



* Electroforesis en gel de agarosa al 2% (5 V/cm) utilizando bromuro de etidio para la tinción de las muestras. P8004 corresponde a una muestra de control adicional de ADN de *Colletotrichum spp.* GR 100bp es el marcador de peso molecular. La fotografía se muestra en colores invertidos para facilitar la identificación y asignación de bandas. Solo se muestra una fracción del total de individuos estudiados. Fuente: esta investigación.

5.3 ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Un total de 120 muestras de ADN por iniciador fueron sometidas al protocolo de RAPD y analizadas en geles de agarosa al 2%. Si bien se disponía de algunas muestras adicionales, estas fueron descartadas al final debido a que algunas se degradaron por su continua utilización en las pruebas piloto y por problemas de infraestructura en los laboratorios de la Universidad de Nariño. A partir de los

cuatro iniciadores utilizados se generó un total de 157 bandas, 87 de ellas polimórficas, este resultado corresponde al total de bandas generadas por el consenso de los cuatro iniciadores y las cuatro poblaciones estudiadas. El tamaño de los fragmentos amplificadas varió desde 150 a 2500 bp, mientras que el número de bandas amplificadas fue de 36 hasta 44.

Los valores de polimorfismo (con un criterio del 95%) que se presentan en la Tabla 3, muestran que el polimorfismo más alto se presentó con el iniciador 10-R, alcanzando un polimorfismo promedio de 55,92%, mientras que el menor polimorfismo se presentó con el iniciador 6-R, con un polimorfismo promedio de 47,92%.

Tabla 3. Numero de bandas amplificadas, rango de tamaño para los fragmentos amplificadas y porcentaje de polimorfismo por población y por iniciador para los RAPDs producidos en *L. vannamei*.

Código iniciador	4-R	6-R	9-F	10-R	Total bandas y polimorfismo promedio (%) por población	
Secuencia (5' → 3')	AGGCCGCTTA	TGTCAGCGGT	CCAGATGCAC	GTGACATGCC		
Tamaño de fragmentos (rango en pares de bases)	150 - 2500	175 - 2500	150 - 2500	187 - 2000		
No. bandas (locus) amplificadas	39	36	44	38	157	
Carbonera	Bandas polimórficas	23	20	25	19	87
	% polimorfismo	58,97	55,56	56,82	50,00	55,41
Curay	Bandas polimórficas	19	17	23	18	77
	% polimorfismo	48,72	47,22	52,27	47,37	49,04
Ensenada	Bandas polimórficas	22	19	24	22	87
	% Polimorfismo	56,41	52,78	54,55	57,89	55,41
Salahonda	Bandas polimórficas	19	13	24	26	82
	% polimorfismo	48,72	36,11	54,55	68,42	52,23
Polimorfismo promedio por iniciador (%)*	53,21 ± 2,64	47,92 ± 4,30	54,55 ± 0,93	55,92 ± 4,73	53,03 ± 1,52**	
Promedio de bandas por iniciador***	6,9	5,9	11,7	9,1		

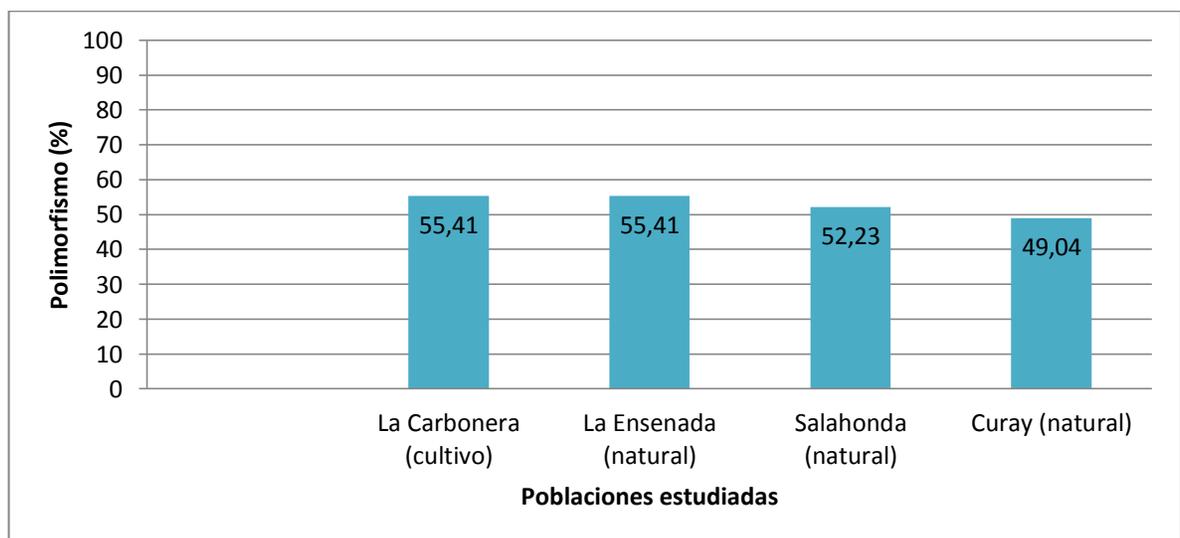
* Valor reportado por el programa GenAlEx 6.5 (2000) únicamente. Los demás valores se obtuvieron utilizando los programas GenAlEx 6.5 (2012) y PopGene 1.32 (2000).

** Polimorfismo promedio con todos los iniciadores y todas las poblaciones. Todos los datos presentados en esta columna corresponden al consenso de los cuatro iniciadores y las cuatro poblaciones.

***Estimado en hoja de cálculo. Este promedio se calculó como el total de bandas generadas por iniciador dividido entre el número total de individuos estudiados. Fuente: esta investigación.

Los resultados mostrados en la tabla 3 indican que la población natural con más alto polimorfismo fue La Ensenada, mostrando un porcentaje de polimorfismo de 55,41%. Este resultado fue igual al encontrado para la población de La Carbonera, siendo esta última una población de cultivo. El menor polimorfismo se detectó en la población natural de Curay con un valor del 49,04%. La figura 10 muestra el polimorfismo encontrado para las cuatro poblaciones estudiadas, en esta figura se puede observar que tanto las tres poblaciones naturales como la población de cultivo, presentan un polimorfismo similar que varía desde el 49% al 55%.

Figura 10. Porcentaje de polimorfismo para tres poblaciones naturales y una de cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de la región de Tumaco.



* Estimado a partir del consenso de los cuatro iniciadores y las cuatro poblaciones estudiadas. Fuente: esta investigación.

Respecto a los iniciadores utilizados Klinbunga *et al*⁸⁵ reportan un polimorfismo promedio entre 46,7% y 61,4% para poblaciones de *P. monodon* en Tailandia utilizando (entre otros) los iniciadores 4-R y 6-R, para los cuales reportan un promedio de bandas por iniciador entre 13,7 y 15,3. Si bien el porcentaje de polimorfismo es similar, el número de bandas promedio para estos iniciadores fue menor en el presente estudio. Por otra parte, Lakra *et al*⁸⁶ reportan un polimorfismo promedio entre 25,0% y 65,5% para poblaciones de *M. affinis* en la India utilizando (entre otros) los iniciadores 9-F y 10-R, siendo estos los que presentaron mayor número de bandas asignables. En el caso del presente estudio se observó que el iniciador 9-F fue el que presentó mayor número de

⁸⁵ KLINBUNGA, *et al.* Op. cit., p. 428-435.

⁸⁶ LAKRA, *et al.* Op. cit., p. 3757-3759.

bandas asignables, mientras que el iniciador 10-R fue el que presentó más bandas polimórficas. Aunque se trata de especies de camarón diferentes, estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio para *L. vannamei*.

Resultados similares a los mostrados en la tabla 3 han sido reportados para poblaciones naturales y de cultivo en *L. vannamei*. Valerio-García y Grijalva-Chon⁸⁷ reportan un tamaño de fragmentos amplificados, para poblaciones naturales y de cultivo, que varía entre los 200 y 1600 bp con un porcentaje de polimorfismo entre el 20% y 38% (para cada una de las poblaciones estudiadas), y un porcentaje de polimorfismo promedio de 67,6% (entre todas las poblaciones), obtenidos a partir de 4 iniciadores (decameros). También, en los estudios de Freitas y Galetti⁸⁸ para poblaciones de cultivo en las costas de Brasil, se reportan fragmentos amplificados en el rango de 220 a 900 bp, con un número de bandas por iniciador entre 7 y 15, y un porcentaje de polimorfismo entre 55% y 76%, obtenidos a partir de 6 iniciadores (decameros). Magalhães *et al*⁸⁹ reportan fragmentos amplificados en el rango de 150 a 2100 bp (porcentaje de polimorfismo no reportado) utilizando 20 iniciadores (decameros), mientras que García *et al*⁹⁰ reportan porcentajes de polimorfismo entre el 39% y 77%. Por otra parte, Fresneda⁹¹ estudió siete poblaciones naturales de *L. vannamei* con ISSRs (un marcador dominante al igual que RAPD) a lo largo de la costa ecuatoriana observando un polimorfismo entre el 50,0% y el 85,1%.

De igual manera se reportan resultados similares con RAPDs para otras especies de camarones peneidos. En poblaciones de *Penaeus monodon*, Tassanakajon *et al*⁹² reportan polimorfismos entre 24,2% y 47,8% en Tailandia, mientras que Klinbunga *et al*⁹³ reportan polimorfismos entre 46,7% y 61,4% en poblaciones naturales de esta especie con un tamaño de bandas de 200 a 1600 bp y un

⁸⁷ VALERIO-GARCIA y GRIJALVA-CHON. Op. cit., p. 666-669.

⁸⁸ FREITAS, Patricia y GALLETI, Pedro. Assessment of the genetic diversity in five generations of a commercial broodstock line of *Litopenaeus vannamei* shrimp. En: African Journal of Biotechnology. Diciembre, 2005. vol. 4, no. 12. p. 1362-1365.

⁸⁹ MAGALHÃES; MARTINEZ y GALOTTO. Op. cit., p. 1131.

⁹⁰ GARCIA, D., *et al*. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. En: Molecular Marine Biology and Biotechnology. Octubre, 1994. vol. 3, no. 5. p. 270-278.

⁹¹ FRESNEDA. Op. cit., p. 26-28.

⁹² TASSANAKAJON, Anchalee, *et al*. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. En: Molecular Marine Biology and Biotechnology. Junio, 1997. vol. 6, no. 2. p. 110.

⁹³ KLINBUNGA *et al*. Op. cit., p. 428-435.

promedio de bandas por iniciador de 13,7 a 15,3. En *Feropenaeus Chinensis*, Zhuang *et al*⁹⁴ reportaron un polimorfismo entre 20,0% y 33,3% en cuatro poblaciones de esta especie. Por otra parte, Liu *et al*⁹⁵ estudiaron el mapa genético de esta especie a partir de progenies de segunda generación de una población de cultivo utilizando AFLP, RAPD y SSR. Con RAPD amplificaron fragmentos entre los 490 y 1700 bp con un polimorfismo entre 14,0% y 66,7%. En *Litopenaeus schmitti*, Espinosa *et al*⁹⁶ reportaron un valor de polimorfismo promedio de 87,5%. En *Metapenaeus dobsoni*, Mishra *et al*⁹⁷ reportan porcentajes de polimorfismo entre 20% y 50% con un tamaño de bandas entre los 212 y 1290 bp y un número de fragmentos por iniciador que van desde 1 a 7 para poblaciones naturales. Song *et al*⁹⁸ analizaron la diversidad genética de *Penaeus japonicus* y reportaron un polimorfismo promedio de 54,14%. Por su parte, Lakra *et al*⁹⁹ en poblaciones naturales de *M. affinis* reportan un tamaño de fragmentos entre 200 y 2200 bp, con porcentajes de polimorfismo entre el 25% y 65%, y un número de bandas por iniciador entre 2 y 9.

En general, como características importantes en la mayoría de estudios los rangos de bandas reportados abarcan desde 200 a 2200 bp con un número de bandas por iniciador de 2 a 15 y polimorfismos entre 20% y 80%, encontrándose los valores más altos de polimorfismo en poblaciones naturales. Sin embargo, en algunos estudios se reportan porcentajes de polimorfismo en poblaciones de cultivo que pueden ser iguales o mayores que los reportados para poblaciones naturales (Freitas y Galetti¹⁰⁰, García *et al*¹⁰¹). Los resultados mostrados en la tabla 3 en cuanto al porcentaje de polimorfismo, tamaño y número de bandas, se

⁹⁴ ZHUANG, Zhimeng, *et al.* Genetic diversity in *Penaeus chinensis* shrimp as revealed by RAPD technique. En: Progress in Natural Science. 2001. vol. 11, no. 6. p. 432.

⁹⁵ LIU, Bo, *et al.* A genetic linkage map of marine shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* based on AFLP, SSR, and RAPD markers. En: Chinese Journal of Oceanology and Limnology. Julio, 2010. vol. 28, no. 4. p. 815.

⁹⁶ ESPINOSA, G., *et al.* Variación genética y morfológica en poblaciones naturales y cautivas de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en Cuba. En: I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA 2002) (1: 1 junio-30 septiembre, 2002) I. De Blas (Editor). Universidad de Zaragoza. España, 2002. p. 778-784.

⁹⁷ MISHRA, Prem Sagar, *et al.* Genetic diversity in *Metapenaeus dobsoni* using RAPD analysis. En: Biochemical Genetics. Junio, 2009. vol. 47, no. 5-6. p. 421.

⁹⁸ SONG, L., *et al.* Study of population genetic structure in *Penaeus japonicus* with RAPD markers. En: Oceanologia et Limnologia sínica. 1999. vol. 30. p. 261.

⁹⁹ LAKRA, *et al.* Op. cit., p. 3757-3759.

¹⁰⁰ FREITAS y GALLETI. Op. cit. p. 1362-1365.

¹⁰¹ GARCIA, *et al.* Op. cit., p. 270.

encuentran dentro de los rangos que han sido reportados en la literatura (tanto específicos para *L. vannamei* como para otras especies de camarones peneidos), también se ha observado que en la mayoría de estudios las poblaciones de cultivo presentan algunas diferencias respecto a las poblaciones naturales. En el presente estudio se observó que en cuanto al polimorfismo, las diferencias entre las poblaciones naturales y de cultivo fueron pequeñas, tal como puede apreciarse en la figura 10. Esta afirmación se realiza teniendo en cuenta que los porcentajes teóricos de polimorfismo abarcarían desde 0 a 100, y los valores mayor (población de cultivo La Carbonera) y menor (población natural de Curay) obtenidos en el presente estudio se diferencian en un 6,37%.

La tabla 4 resume los parámetros genéticos estimados para las poblaciones de *L. vannamei* en la región de Tumaco. Los resultados muestran que la diversidad genética de Nei (D) en las poblaciones varía desde 0,118 (población natural de Curay) hasta 0,157 (población de cultivo La Carbonera), indicando que la población de cultivo presenta una mayor diversidad genética de Nei. Según Wallace¹⁰² debido al carácter dominante del marcador, los estimativos de información genotípica para RAPD (por ejemplo, las frecuencias alélicas) se deben estimar bajo la suposición de equilibrio de Hardy-Weinberg en las poblaciones, un sistema de apareamiento cruzado y apareamiento aproximadamente aleatorio. Se considera que solo existen dos alelos para el locus de un marcador dominante, el alelo dominante (o presente; esto no implica que la presencia de una banda es dominante sobre la ausencia en el sentido Mendeliano) y el alelo nulo (o visualmente ausente). Así, las frecuencias alélicas son calculadas en base a las frecuencias del alelo nulo (por ejemplo, el número de individuos sin la banda). Como menciona Kosman¹⁰³, el índice de diversidad genética de Nei promedio entre todos los loci es una medida aproximada de variabilidad genética cuyos valores teóricos van desde 0 (variabilidad nula) hasta 1 (variabilidad máxima) y se puede calcular para marcadores dominantes, a pesar de que estos no permiten diferenciar entre los individuos homocigotos y heterocigotos en una población. Esto indicaría que la población de cultivo de La Carbonera presenta una mayor variabilidad genética respecto a las poblaciones naturales debido al mayor valor del índice de diferenciación genética de Nei observado en el presente estudio.

¹⁰² WALLACE, Lisa. Methods available for the analysis of data from dominant molecular markers [en línea]. [Ohio]: Ohio State University, 2003. Disponible en < <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/dominant.marker.pdf>>

¹⁰³ KOSMAN, E. Nei's gene diversity and the index of average differences are identical measures of diversity within populations. En: Plant Pathology. Octubre, 2003. vol. 52, no. 5. p. 533

Según Vela-Avitúa *et al*¹⁰⁴ y Freitas *et al*¹⁰⁵, las poblaciones de cultivo (como La Carbonera) suelen presentar menor diversidad genética que las poblaciones naturales debido a su aislamiento y se espera que la variabilidad genética en este tipo de poblaciones comience a disminuir con cada generación, debido a la pérdida de heterocigosidad ocasionada en gran parte por efectos de embotellamiento y endogamia. Sin embargo, Freitas y Galleti¹⁰⁶ han reportado que la inclusión de un mayor número efectivo de parejas de apareamiento y el uso de progenitores de diversos orígenes, contribuyen a la reducción en la pérdida de heterocigosidad en poblaciones de cultivo durante las sucesivas generaciones, permitiendo la conservación de la diversidad genética en este tipo de poblaciones. Basados en los resultados presentados en la tabla 4, se podría afirmar que por el momento, las características genéticas de la población de cultivo de La Carbonera son las adecuadas, ya que al presentar un número de alelos diferentes (N_a) mayor que las poblaciones naturales estudiadas, posee unas características genéticas apropiadas las cuales se deben tratar de conservar, no solo para los esquemas de cultivo de camarón, sino también de otras especies.

Tabla 4. Parámetros genéticos por población.

	Población	Carbonera	Curay	Ensenada	Salahonda	Entre poblaciones
Parámetros genéticos	N	30	30	30	30	120
	D	0,157 ± 0,184	0,118 ± 0,157	0,135 ± 0,160	0,132 ± 0,161	0,282 ± 0,145
	Gst					0,348
	Φ_{PT}					0,421

N = número de individuos por población; D = diversidad genética de Nei; Gst = diferenciación genética de Nei (análogo a Fst); Φ_{PT} = diferenciación genética calculada a partir del AMOVA (Fst modificado); Fst es el índice de fijación de Wright que proporciona una medida de la diferenciación genética entre subpoblaciones. Fuente: esta investigación.

Respecto a las poblaciones naturales se observa una disminución en el número de alelos en la población natural de Curay, lo cual podría estar ocasionado por procesos de aislamiento y endogamia. Según Goyard *et al*¹⁰⁷, cuando una

¹⁰⁴ VELA-AVITÚA, Sergio, *et al*. Decline of genetic variability in a captive population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using microsatellite and pedigree information. En: Electronic Journal of Biotechnology. Julio, 2013. vol. 16, no.4. p. 2.

¹⁰⁵ FREITAS; CALGARO y GALLETI. Op. cit., p. 939-940.

¹⁰⁶ FREITAS y GALLETI. Op. cit., 1366-1367.

¹⁰⁷ GOYARD, Emmanuel, *et al*. Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. En: Aquatic Living Resources. Diciembre, 2003. vol. 16, no. 06. p. 505, 506.

población pasa a través de un cuello de botella, muchos alelos de frecuencia baja pueden ser eliminados o contribuir poco a la heterocigosidad, este efecto puede incrementarse si el número de reproductores es muy pequeño ya que se incrementa la endogamia. Los valores de N_a presentados en la tabla 4 son similares a los reportados por Valerio-García y Grijalva-Chon¹⁰⁸ para poblaciones de *L. vannamei* en el Golfo de California, donde por medio de RAPDs se compararon tres poblaciones de cultivo y una población natural, encontrándose un número de alelos diferentes (N_a) entre 1,21 y 1,35 para las poblaciones de cultivo y de 1,38 para la población natural.

Los valores de 0,348 y 0,421 encontrados para G_{ST} y Φ_{PT} respectivamente, son muy similares e indican una diferenciación considerable entre las poblaciones. Según Meirmans y Hedrick¹⁰⁹, los estadísticos G_{ST} y Φ_{PT} son una medida de la diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas las cuales indican qué tan diferentes son estas poblaciones entre sí. Como menciona Smith¹¹⁰, debido a que RAPD es un marcador dominante, los valores de F_{ST} no pueden ser calculados directamente. F_{ST} es el índice de fijación de Wright, que como mencionan Holsinger y Weir¹¹¹, es equivalente a la proporción de diversidad genética debida a las diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones, siendo el indicador de diversidad genética más ampliamente utilizado en estudios de genética de poblaciones. Sin embargo, este estadístico solo puede ser calculado de manera directa en marcadores codominantes (por ejemplo microsatélites), por esta razón, se reporta el valor de Φ_{PT} el cual es utilizado comúnmente para marcadores dominantes o haploides. Φ_{PT} es un estimativo similar a F_{ST} , calculado a partir del análisis de varianza molecular (AMOVA) e indica la pérdida de heterocigosidad entre las poblaciones, ocasionada por procesos como la deriva genética o la migración. Por tanto, lo que G_{ST} y Φ_{PT} indican es que hay una diferenciación considerable entre las poblaciones estudiadas ya que, como señalan Franco e Hidalgo¹¹², los valores de F_{ST} , G_{ST} y Φ_{PT} varían teóricamente entre cero y uno, donde cero indica que no hay diferencia entre las poblaciones y uno indica una diferencia completa entre las poblaciones.

¹⁰⁸ VALERIO-GARCIA y GRIJALVA-CHON. Op. cit., p. 667.

¹⁰⁹ MEIRMANS y HEDRICK. Op. cit., p. 6

¹¹⁰ SMITH, P. Random amplified Polymorphic DNA (RAPD). En: Stock identification methods: applications in fishery science. 1 ed. Elsevier Inc., 2005. p. 371-387.

¹¹¹ HOLSINGER, Kent y WEIR, Bruce. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . En: Nature Reviews Genetics. Septiembre, 2009. vol. 10. p. 639-650.

¹¹² FRANCO, Tito e HIDALGO, Rigoberto. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Roma: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, 2003. 72-83.

La interpretación clásica de la magnitud de F_{st} indica que para un sistema simple de dos alelos valores de 0,25 indican gran variación, valores de 0,15 a 0,25 indican una variación moderada y si el valor es menor a 0,05 se considera que la variación es despreciable. Sin embargo, Meirmans y Hedrick¹¹³ señalan que la interpretación no siempre se puede ajustar a esta guía y por el contrario es más importante detectar si existe una diferenciación genética significativa, la cual puede estar representada por valores de F_{st} mayores a cero. Esta interpretación se puede extrapolar de igual manera a los estadísticos G_{st} y Φ_{PT} teniendo en cuenta que sus límites teóricos son los mismos. Por otra parte estos autores también señalan que en la mayoría de los casos G_{st} y Φ_{PT} presentan valores muy similares, tal como se observa con los valores reportados en este estudio ($G_{st} = 0,348$ y $\Phi_{PT} = 0,421$) y que permiten inferir que existen diferencias significativas entre las poblaciones de estudio. El resultado para G_{st} reportado en el presente estudio es menor al reportado por Valerio-Garcia y Grijalva-Chon¹¹⁴ ($G_{st} = 0,55$) en las poblaciones de camarón del Golfo de California.

Los resultados mostrados en la tabla 4 solo indican una relación general entre todas las poblaciones estudiadas. Una interpretación más clara se puede obtener analizando los valores de Φ_{PT} por pares de poblaciones. Estos valores (que se muestran en la tabla 5 para 1000 permutaciones) indican el grado de diferenciación entre cada una de las poblaciones estudiadas: valores cercanos a cero indican poca diferenciación, mientras que valores cercanos a uno indican una alta diferenciación. En la tabla 5 se puede observar que las poblaciones más cercanas genéticamente son las de Salahonda y La Ensenada ($\Phi_{PT} = 0,186$), mientras que la población de Curay presenta la mayor diferenciación entre las poblaciones naturales (Φ_{PT} entre 0,238 y 0,504). La población de cultivo de La Carbonera presenta los mayores índices de diferenciación respecto a las demás poblaciones (Φ_{PT} entre 0,495 y 0,554). Estos resultados permiten inferir que existe una estructura poblacional entre los sitios de procedencia de las muestras. Según Fresneda¹¹⁵, la estructura poblacional resulta de fuerzas evolutivas que actúan sobre las poblaciones aisladas, las cuales pueden ser barreras físicas, estructuras dinámicas o eventos biológicos. Esto se puede relacionar con los resultados mostrados en la tabla 5, los cuales permiten identificar diferencias significativas que separan una población de otra. Respecto a la menor diferenciación entre las poblaciones de Salahonda y La Ensenada (ver figura 2, pág. 36), se puede decir que es consistente con la disposición geográfica de estas poblaciones; esta cercanía geográfica explicaría en parte su cercanía genética, la cual se debe probablemente a un intercambio de genes entre las dos poblaciones.

¹¹³ MEIRMANS y HEDRICK. Op. cit., p. 7

¹¹⁴ VALERIO-GARCIA y GRIJALVA-CHON. Op. cit., p. 667.

¹¹⁵ FRESNEDA. Op. cit. p. 35-39.

Tabla 5. Valores de Φ_{PT} pareados (debajo de la diagonal) para 1000 permutaciones.

	Carbonera	Curay	Ensenada	Salahonda
Carbonera	0,000	-	-	-
Curay	0,554	0,000	-	-
Ensenada	0,495	0,353	0,000	-
Salahonda	0,504	0,238	0,186	0,000

Fuente: esta investigación.

Estos resultados son diferentes a los reportados por Fresneda¹¹⁶ en poblaciones naturales de *L. vannamei* en la costa ecuatoriana obtenidos mediante ISSRs (un marcador dominante al igual que RAPD). En este estudio se reporta valores de F_{st} para pares de poblaciones entre 0,013 y 0,051 indicando escasa diferencia entre las poblaciones estudiadas. El análisis de AMOVA mostro una variación genética del 1% entre poblaciones, mientras que el índice de diferenciación genética de Nei (G_{st}) mostro valores entre 0,02 y 0,036 con elevados índices de flujo genético entre 12,56 y 20,15 indicando que no existía una estructura poblacional entre las muestras estudiadas y que estas pertenecían a un grupo panmíctico (apareamiento aleatorio entre poblaciones). En este estudio se menciona además, que *L. vannamei* se encuentra dentro de especies que tienen un alto potencial de dispersión lo cual se observa en los valores de flujo genético reportados por este autor y probablemente, también explicaría la similitud presente en este estudio entre las poblaciones de Salahonda y La Ensenada. Por otra parte, Pérez¹¹⁷ también reporta un bajo índice de diferenciación (F_{st}) de 0,08 con RAPDs para el mismo tipo de poblaciones que los estudiados por Fresneda, indicando una incipiente estructura poblacional. Por el contrario, en el presente estudio se observó que las poblaciones utilizadas presentaron diferencias significativas (valores de Φ_{PT} entre 0,186 y 0,554), siendo la población natural de Curay la que presentó mayor diferenciación entre las poblaciones naturales, mientras que las poblaciones de Salahonda y La Ensenada presentaron la mayor similitud. También se observó que la población de cultivo de La Carbonera presentó diferencias significativas respecto a las demás poblaciones utilizadas en el presente estudio. Estas diferencias probablemente se deban a la inclusión de progenitores de diferentes fuentes o al entrecruzamiento de las líneas de progenitores generadas en las camaroneras como lo mencionan Freitas y Galleti¹¹⁸, aunque esto es solo una suposición, debido a que las camaroneras no

¹¹⁶ *Ibíd.* p. 32.

¹¹⁷ PÉREZ, F. Generación y manipulación de la diversidad genómica en *Penaeus vannamei* para la acuicultura del Ecuador. Ecuador: Informe ejecutivo BID-FUNDACYT 210, 1999. p. 47-49.

¹¹⁸ FREITAS; CALGARO y GALLETI. *Op. cit.* p. 939-940.

mencionan los procesos que realizan para conservar la variabilidad genética de sus cultivos.

Con RAPDs para otras poblaciones de camarones peneidos se reporta el estudio de Aubert y Lightner¹¹⁹ para *L. stylirostris* en el Golfo de California, en el cual se observó un índice Φ_{st} (índice de diferenciación análogo a F_{st}) de 0,15 entre poblaciones, mostrando una divergencia entre las poblaciones estudiadas. Este resultado es menor al encontrado para *L. vannamei* en el presente estudio, sin embargo, se debe recordar que la comparación se realiza respecto al hecho de que se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones en ambos estudios y no solo en referencia al valor numérico de los índices utilizados.

En las tablas 6 y 7 se muestran los valores para las distancias genéticas de Nei (1978)¹²⁰ con y sin sesgo respectivamente. Los resultados muestran que las poblaciones menos diferenciadas son La Ensenada y Salahonda, mientras que la población más diferenciada es La Carbonera, lo cual es consecuente con lo mostrado en las tablas 4 y 5. La población de Curay presenta la mayor diferenciación entre las poblaciones naturales y se observa que está relacionada de manera más próxima con la población de Salahonda que con la población de La Ensenada, lo cual podría estar relaciona con la ubicación geográfica relativa de estas poblaciones. Los elevados valores de identidad genética entre las poblaciones naturales de Salahonda y La Ensenada, evidencian también su similitud genética. Los resultados mostrados en las tablas 6 y 7 permiten apreciar una diferenciación significativa entre las poblaciones estudiadas, estos resultados son similares a los mostrados por el análisis del estadístico Φ_{PT} en la tabla 6. Según Hedrick¹²¹, los valores de identidad genética varían entre 0 (donde no hay alelos compartidos entre las dos poblaciones) a 1 (donde las dos poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas).

En general, las distancias genéticas de Nei (1978) con y sin sesgo (tablas 6 y 7 respectivamente) muestran resultados similares. Se muestran los dos estimativos como referencia debido a que, como menciona Hedrick¹²², la corrección realizada en las distancias genéticas de Nei sin sesgo puede dar lugar a falsos resultados cuando hay baja homocigosidad y se dispone de pocas muestras.

¹¹⁹ AUBERT, H. y LIGHTNER, D. Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, México. En: Marine Biology. Diciembre, 2000. vol. 137, no. 5-6. p. 875.

¹²⁰ MASATOSHI, Nei. Genetic distance and molecular phylogeny. En: Population genetics and fishery management. Washington: University of Washington Press, 1991. p. 193-224.

¹²¹ HEDRICK, Philip. Genetics of populations. 4 ed. Estados Unidos de America: Jones and Bartlett Publishers Inc., 2011. p. 379.

¹²² Ibid, p. 384.

Tabla 6. Distancias genéticas de Nei (1978) (debajo de la diagonal) e identidades genéticas de Nei (1978) (por encima de la diagonal) entre pares de poblaciones.

	Carbonera	Curay	Ensenada	Salahonda
Carbonera	*****	0,8180	0,8443	0,8354
Curay	0,2009	*****	0,9171	0,9561
Ensenada	0,1692	0,0865	*****	0,9561
Salahonda	0,1798	0,0449	0,0449	*****

Fuente: esta investigación.

Tabla 7. Distancias genéticas de Nei (1978) sin sesgo (debajo de la diagonal) e identidades genéticas de Nei (1978) sin sesgo (por encima de la diagonal) entre pares de poblaciones.

	Carbonera	Curay	Ensenada	Salahonda
Carbonera	*****	0,8202	0,8468	0,8378
Curay	0,1982	*****	0,9194	0,9584
Ensenada	0,1663	0,0841	*****	0,9586
Salahonda	0,1770	0,0425	0,0422	*****

Fuente: esta investigación.

Waldman¹²³ ha señalado que el incremento en la similaridad genética intrapoblacional durante sucesivas generaciones resulta en unas largas distancias genéticas interpoblacionales, lo cual podría estar relacionado con la reducción de la diversidad genética de la población de Curay y su respectiva diferenciación respecto a las poblaciones naturales de La Ensenada y Salahonda. Por otra parte, los estudios de Freitas y Galleti¹²⁴ y Sánchez¹²⁵, demuestran que la variabilidad genética puede ser restaurada usando líneas de reproducción separadas para reproducciones cruzadas (cross-breeding). Esto podría ayudar a explicar la diferencia genética que ha mostrado la población de cultivo de La Carbonera en el presente estudio, indicando que los procesos de conservación de diversidad genética llevados a cabo en esta población han resultado ser eficientes. Sin embargo, se desconocen los detalles sobre los procesos específicos llevados a cabo en esta población para conservar la variabilidad genética.

¹²³ WALDMAN, John. The importance of comparative studies in stock analysis. En: Fisheries Research. Octubre, 1999. vol. 43, no. 1. p. 240-245.

¹²⁴ FREITAS; CALGARO y GALLETI. Op. cit. p. 939-940.

¹²⁵ SÁNCHEZ, Leopoldo; BIJMA, Piter y WOOLLIAMS, John. Minimizing inbreeding by managing genetic contributions across generations. En: Genetics. Agosto, 2003. vol. 164, no. 4. p. 1592-1594.

Las diferencias genéticas reportadas en el presente estudio (distancias genéticas entre 0,04 y 0,20) son ligeramente mayores que las reportadas en otros estudios similares. Freitas *et al*¹²⁶ estudiaron 15 líneas de reproducción de diferentes criaderos de la costa de Brasil mediante RAPDs, reportando distancias genéticas entre 0,0302 y 0,1440 para estas poblaciones. El análisis de diversidad genética dentro de las líneas evidenció pérdida de variación genética debido probablemente a efectos de endogamia y cuello de botella. Por su parte, Gonçalves *et al*¹²⁷ utilizando AFLPs en dos poblaciones de cultivo de *L. vannamei* con líneas de progenitores provenientes en su mayoría de Panamá y Ecuador, obtuvieron identidades genéticas de 0,9947 y distancias de 0,0053, sugiriendo una estructura genética muy similar entre las dos poblaciones estudiadas. El deterioro genético de estas poblaciones fue atribuido a la endogamia y la deriva genética.

Para otros camarones peneidos mediante RAPDs, se han encontrado tanto similitudes genéticas elevadas como diferencias significativas. Klinbunga *et al*¹²⁸ en su estudio de poblaciones naturales de *P. monodon* reportan distancias genéticas desde -0,002 hasta 0,034 indicando una relación genética estrecha entre algunas de las poblaciones estudiadas. Lakra *et al*¹²⁹ en poblaciones naturales de *M. affinis* reportan distancias genéticas sin sesgo (entre pares de poblaciones) entre 0,1345 y 0,2245 que muestran suficiente divergencia para discriminar las muestras de las diferentes poblaciones. Por otra parte, Mishra *et al*¹³⁰, en su estudio para poblaciones naturales de *M. dobsoni* reportan índices de similaridad genética de Nei (1972) (identidad genética) entre poblaciones que van desde 0,8332 a 0,9521 y distancias genéticas de Nei que van desde 0,0491 a 0,1824.

El análisis de varianza molecular AMOVA (figura 11) indica que el 58% de la variación observada se encuentra dentro de las poblaciones mientras que el 42% se debe a la variación entre las poblaciones, es decir, que la mayor proporción de la variación se debe a los individuos y no a las poblaciones analizadas. Si bien, el resultado muestra que la variación entre las poblaciones es menor y que estas presentan cierta similitud genética, este valor es considerable lo que muestra que existe una diferenciación genética entre las mismas y permite inferir una estructura poblacional entre las poblaciones estudiadas. Estos resultados son consecuentes

¹²⁶ FREITAS; CALGARO y GALLETI. Op. cit. p. 939-940.

¹²⁷ GONÇALVES, Michelle, *et al.* Fluorescent amplified fragment length polymorphism (fAFLP) analyses and genetic diversity in *Litopenaeus vannamei* (*Penaeidae*). En: Genetics and Molecular Biology. 2005. vol. 28, no. 2. p. 267-268.

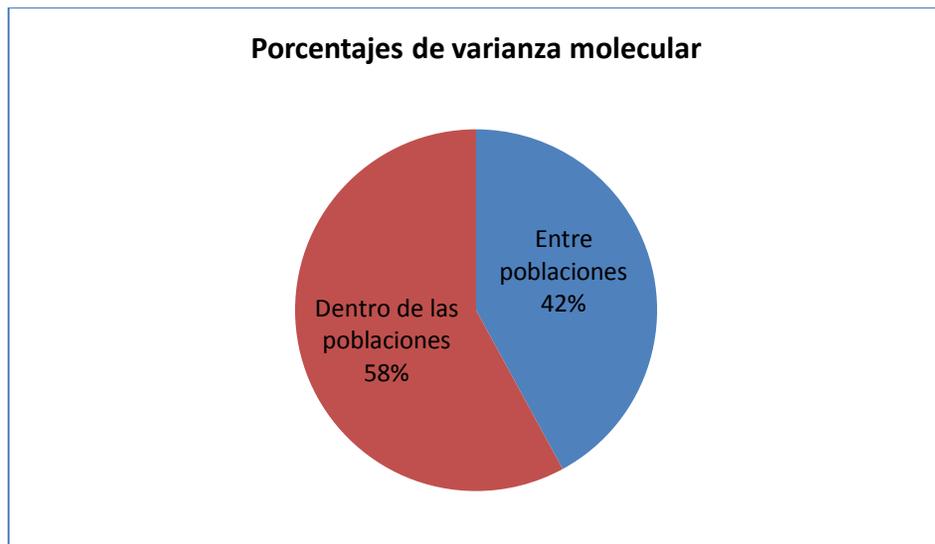
¹²⁸ KLINBUNGA, *et al.* Op. cit. p. 428-435.

¹²⁹ LAKRA, *et al.* Op. cit. p. 3575-3579.

¹³⁰ MISHRA, *et al.* Op. cit. p. 421.

con los mostrados por los estadísticos G_{ST} y Φ_{PT} , indicando que las cuatro poblaciones estudiadas muestran una diferenciación genética considerable. El menor valor para la variación entre poblaciones podría estar ocasionado debido a un intercambio de genes entre las mismas; para la población de cultivo esto puede ser ocasionado por la utilización de progenitores de estas poblaciones, mientras que para las poblaciones naturales esto podría ser debido a que las poblaciones no se encuentran muy separadas geográficamente (ver figura 1, pág. 36) y puede existir un intercambio natural de genes entre ellas lo que permite suponer que existe un flujo genético entre las mismas. Si el flujo de genes entre las poblaciones estudiadas aumenta, la diferenciación entre estas debe disminuir.

Figura 11. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para 4 poblaciones de camarones *Litopenaeus vannamei* de la región de Tumaco.



Fuente: esta investigación.

La figura 12 muestra el árbol filogenético estimado para los 120 individuos de las cuatro poblaciones estudiadas. Este árbol se calculó en base al coeficiente de Jaccard, mediante el método UPGMA (del inglés Unweighted Pair Group Mean Analysis) y se utiliza para evaluar la similitud de los individuos. Se escogió el coeficiente de Jaccard debido a que mostró el mayor valor para el coeficiente de correlación cofenética igual a 0,92 (los otros estimativos utilizados fueron similaridad simple y Dice). Como mencionan Petchey y Gaston¹³¹, este valor indica que tan bien el árbol refleja la estructura de similaridad en los datos originales y se utiliza como una prueba de la fiabilidad del mismo para representar los objetos de estudio. Las ramificaciones principales del árbol se estimaron

¹³¹ PETCHY, Owen y GASTON, Kevin. Dendrograms and measuring functional diversity. *En: Oikos*. Agosto, 2007. vol. 116, no. 8. p. 1424.

utilizando un bootstrap de 2000 repeticiones, con lo cual se pueden evidenciar tres grupos principales: uno correspondiente a la población de La Carbonera (azul), otro correspondiente a la población de Curay (rojo) y finalmente otro correspondiente a las poblaciones de La Ensenada y Salahonda (amarillo), las cuales terminan siendo agrupadas como una unidad. Estos resultados son consistentes con los mostrados por las distancias genéticas de Nei (1987) y los valores de Φ_{PT} entre pares de poblaciones. La distribución observada en las tres agrupaciones (clúster) indica que existe una diferenciación clara de la población de cultivo de La Carbonera (azul) y de la población natural de Curay (rojo). Por otro lado, aunque las poblaciones naturales de Salahonda y La Ensenada parten de la misma rama del dendrograma (amarillo), es posible observar que los individuos de la misma población se mantienen cercanos (la flecha negra en la figura indica el punto de separación), segregándose en dos grupos diferentes aunque muy cercanos entre sí.

Según Holmes¹³² los datos arrojados por el bootstrap pueden ser utilizados como un método para asegurar la fiabilidad de alguna característica filogenética, como la segregación de un grupo particular de especies en su respectiva rama. En el caso del presente estudio, este criterio se utilizó para separar los grupos principales dentro del dendrograma. A un coeficiente de similaridad de 0,22 se observa la separación de los grupos de Curay y La Ensenada-Salahonda. La tercera rama del dendrograma muestra el grupo de La Carbonera, el cual se encuentra separado de los dos grupos mencionados anteriormente. Además, este grupo presenta una mayor similaridad entre los individuos muestreados, los cuales se ubican por encima de un coeficiente de similaridad de 0,42. Esto podría indicar que si bien, la población de La Carbonera posee mayor número de alelos diferentes (como lo muestra la tabla 4, pág. 55), la similitud genética entre los individuos de esta población es mucho mayor que la presentada en las poblaciones de cultivo. Lo anterior podría relacionarse con el hecho de que se trata de una población de cultivo que tiende a maximizar la similitud de sus individuos debido a los efectos de endogamia. Esto es consecuente con lo observado por Vela-Avitúa *et al*¹³³ y Freitas *et al*¹³⁴ en poblaciones cautivas de *L. vannahensis*, ya que si bien esta población se diferencia de las poblaciones naturales, los individuos dentro de la misma parecen presentar una considerable similitud genética. Como una característica notable en el presente estudio, la población de cultivo de La Carbonera presenta diferencias considerables respecto a las poblaciones naturales debido probablemente a esquemas de cultivo adecuados (lo cual no se conoce con exactitud), además de presentar una mayor

¹³² HOLMES, Susan. Bootstrapping phylogenetic trees: theory and methods. En: Statistical Science. Septiembre, 2003. vol. 18, no. 2. p. 244.

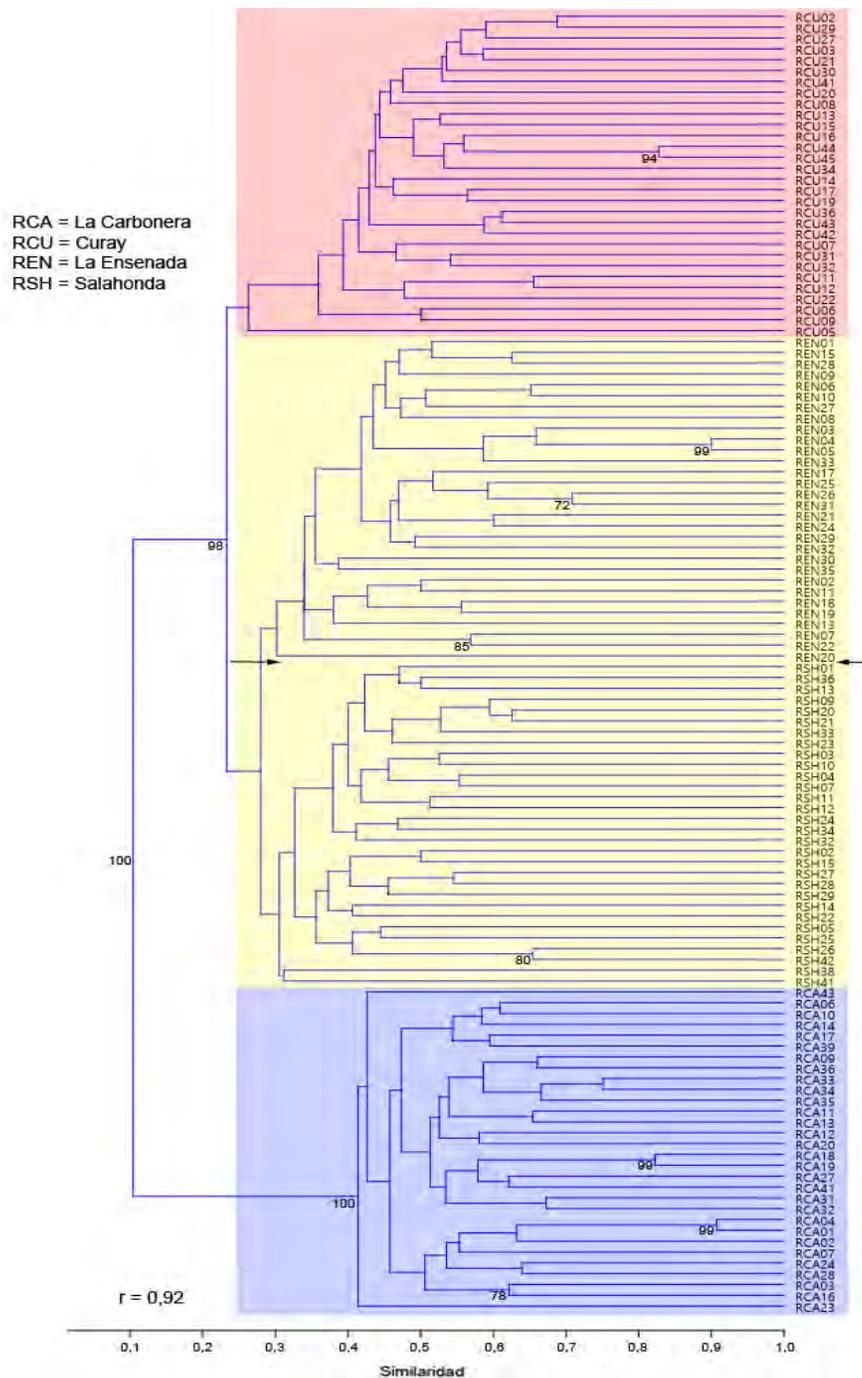
¹³³ VELA-AVITÚA, *et al.* Op. cit., p. 2-6.

¹³⁴ FREITAS; CALGARO y GALLETI. Op. cit., p. 939-940.

variabilidad relativa. Sin embargo, la figura 11 parece indicar que la diferenciación intrapoblacional para este cultivo es menor que el mostrado para las poblaciones naturales y por tanto, se esperaría que con el tiempo sea necesario incluir nuevos progenitores dentro del programa de cultivo para evitar la formación de un cuello de botella y el incremento de la endogamia.

En la figura 12 solo se muestran los valores de bootstrap mayores al 70%, lo cual indica que en las repeticiones aleatorias estas separaciones se mostraron al menos en el 70% de los arboles generados. Se observa también que la rama correspondiente a la población de La Carbonera (azul) conserva el valor más alto para la rama que agrupa a todos sus individuos (100).

Figura 12. Distribución de los 120 individuos de la especie *Litopenaeus vannamei* de la región de Tumaco mediante RAPDs, en función de su similitud genética.



*Árbol filogenético del consenso de los 4 iniciadores realizado mediante el método UPGMA y el empleo del coeficiente de Jaccard ($r = 0,92$). Las zonas sombreadas corresponden a los grupos estimados por el bootstrap de 2000 repeticiones, la flecha negra indica una separación entre los individuos de La Ensenada y Salahonda. Los números encima de cada rama indican el grado de fiabilidad. Fuente: esta investigación.

5.4 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS CON ALOENZIMAS

Esta discusión se presenta como un complemento al trabajo realizado con el marcador molecular RAPD. Al comparar los resultados de variabilidad genética utilizando RAPDs, con los obtenidos para estas poblaciones por Hernandez y Rosales¹³⁵ utilizando aloenzimas como marcador molecular, se debe tener en cuenta que los marcadores RAPDs son de tipo genético mientras que los marcadores de aloenzimas son de tipo bioquímico, y por tanto, no es posible realizar una comparación exacta entre los valores obtenidos para algunos estimativos de variabilidad genética. Además, se aclara que los individuos pertenecientes a los dos estudios corresponden a dos capturas diferentes y también se debe mencionar que el estudio con aloenzimas se realizó con un total de 6 poblaciones (2 de cultivo y 4 naturales), dentro de las cuales se encontraban las 4 poblaciones utilizadas para el presente estudio con RAPDs.

Los resultados consignados en la tabla 8, muestran que mediante aloenzimas se encontraron valores más altos de polimorfismo, lo cual difiere con los resultados esperados para este marcador. Hernandez y Rosales¹³⁶ mencionan que esta elevada tasa de polimorfismo y heterocigosidad se debe probablemente a que se trabajó únicamente con loci polimórficos sin tomar en cuenta los loci monomórficos en las muestras analizadas, lo cual hace que la tasa de polimorfismo y heterocigosidad aumente. En el presente trabajo las bandas monomórficas para RAPD no fueron tenidas en cuenta debido a que, como mencionan Grosberg *et al*¹³⁷ y Alcántara¹³⁸, al ser RAPD un marcador dominante la presencia de una banda puede indicar tanto al heterocigoto como al homocigoto y por tanto los análisis se hacen con base en las diferencias que se presentan entre bandas ausentes y presentes únicamente. El mayor contraste entre los resultados es el elevado polimorfismo de las poblaciones naturales en el estudio con aloenzimas, mientras que en el estudio con RAPDs la heterocigosidad y polimorfismo de las cuatro poblaciones fue considerablemente menor. Además, en el estudio con RAPDs, los resultados muestran cierta similitud entre las cuatro poblaciones, mientras que en el estudio con aloenzimas la población de cultivo de La Carbonera se encuentra muy alejada de las poblaciones naturales y presenta un menor polimorfismo.

¹³⁵ HERNÁNDEZ y ROSALES. Op. cit., p. 51-68.

¹³⁶ *Ibid.*, p. 59-61.

¹³⁷ GROSBER, Richard; LEVITAN, Donald y CAMERON, Brenda. Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR markers: a random primer for the novice and nervous. En: Molecular zoology: advances, strategies, and protocols. New York: Willey-Liss, 1996. p. 72-73.

¹³⁸ ALCÁNTARA. Op. cit., p. 545-547.

Tabla 8. Valores de polimorfismo promedio para cuatro poblaciones de *L. vannamei* de la región de Tumaco, estudiadas mediante ocho sistemas aloenzimáticos y cuatro iniciadores RAPDs.

Población	Aloenzimas	RAPDs
	Polimorfismo %	Polimorfismo %
Ensenada	87,5	55,41
Salahonda	100	52,23
Curay	87,5	49,04
Carbonera	75,0	55,41

Fuente: información adaptada de esta investigación y de Hernandez y Rosales (2009). Caracterización bioquímica y análisis genético en las poblaciones naturales y cautivas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de la costa pacífica nariñense.

La mayor parte de los estudios con aloenzimas para camarones peneidos reportados en la literatura muestran niveles similares de polimorfismo a los obtenidos con RAPD en el presente estudio. Como referencia se mencionan dos trabajos. Soto-Hernandez y Grijalva-Chon¹³⁹ estudiaron 3 poblaciones de cultivo de *L. vannamei* y una población natural utilizando 10 sistemas aloenzimáticos. El polimorfismo encontrado varió entre 40% y 53%, atribuyéndose su elevado valor (reportado así por sus autores) al uso de loci reportados como polimórficos en la literatura. Por otra parte, Espinosa *et al*¹⁴⁰ reportan rangos de polimorfismo en *L. schmitti* con aloenzimas entre 29% y 33%. Al comparar estos resultados con los presentados en este estudio para RAPDs (polimorfismo entre 44% y 55), se puede observar que la literatura presenta valores cercanos de polimorfismo aunque en general son ligeramente menores. Como mencionan Montaña-Perez *et al*¹⁴¹, al ser las aloenzimas una representación fenotípica de la variabilidad genética, suelen sub-representar los estimativos de polimorfismo y variabilidad generando valores menores que los mostrados por marcadores de ADN. Por otra parte Aagaard *et al*¹⁴², remarcan que los resultados de estos dos métodos, si bien pueden diferir en orden de magnitud, aún conservan propiedades similares.

¹³⁹ SOTO-HERNANDEZ y GRIJALVA-CHON. Op. cit. p. 593.

¹⁴⁰ ESPINOSA, G., *et al*. Análisis poblacional del camarón blanco cubano (*Litopenaeus schmitti*) utilizando aloenzimas como marcadores genéticos. En: Revista de Investigaciones Marinas. 2003. vol. 1. p. 11-16.

¹⁴¹ MONTAÑO-PEREZ, *et al*. Op. cit., p. 1.

¹⁴² AAGAARD, Jan; KRUSTOVSKII, Konstantin y STRAUSS, Steven. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. En: Heredity. 1998. vol. 81. p. 75-77.

Como mencionan Holsinger y Weir¹⁴³, los estadísticos F_{st} y Φ_{PT} evalúan las diferencias existentes entre poblaciones mediante diferentes aproximaciones. Si bien, los valores numéricos entre los dos estadísticos presentan algunas diferencias, los resultados indican que tanto en el estudio de aloenzimas como en el de RAPD las poblaciones de Salahonda y La Ensenada presentan poca diferenciación, mientras que la población de Curay presenta la mayor diferenciación entre las poblaciones naturales en ambos estudios. El contraste más notorio en los resultados de las dos técnicas está en la población de La Carbonera (cultivo), la cual en el estudio de aloenzimas está menor diferenciada respecto a las poblaciones de Salahonda y La Ensenada, mientras que la población de Curay presenta la mayor diferenciación (tabla 9). En el caso de RAPDs se observa que la población de La Carbonera es la que presenta la mayor diferenciación. Esto se debe probablemente a que La Carbonera es una población de cultivo, y no se puede asegurar que las muestras analizadas tengan las mismas características (progenie) que las tomadas para el análisis con RAPD, ya que los dos estudios se hicieron en diferentes periodos de tiempo con individuos de diferentes capturas. Sin embargo, se debe notar que los patrones de asociación entre las poblaciones naturales presentan cierta similitud, esto es, que las poblaciones de Salahonda y La Ensenada presentan características similares, mientras que la población de Curay se diferencia de estas dos.

Tabla 9. Estimados de índice de diferenciación (F_{st}) por pares de poblaciones (sobre la diagonal) e índice de diferenciación modificado (Φ_{PT}) (bajo la diagonal) para poblaciones de *L. vannamei*.

	Carbonera	Curay	Ensenada	Salahonda
Carbonera	****	0,489	0,364	0,392
Curay	0,554	****	0,374	0,369
Ensenada	0,495	0,353	****	0,183
Salahonda	0,504	0,238	0,186	****

* Los valores de F_{st} corresponden a ocho sistemas aloenzimáticos mientras que los valores de Φ_{PT} corresponden a cuatro iniciadores RAPD. Fuente: información adaptada de esta investigación y de Hernandez y Rosales (2009). Caracterización bioquímica y análisis genético en las poblaciones naturales y cautivas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de la costa pacífica nariñense.

Los resultados presentados en la tabla 9 (Φ_{PT} entre 0,186 y 0,554; F_{st} entre 0,183 y 0,489), indican una diferencia significativa entre las cuatro poblaciones de *L. vannamei* de la región de Tumaco y son mayores a los rangos reportados para F_{st} en la literatura. Soto-Hernandez y Grijalva-Chon¹⁴⁴ reportan valores de

¹⁴³ HOLSINGER y WEIR. Op. cit., p. 639-643.

¹⁴⁴ SOTO-HERNANDEZ y GRIJALVA-CHON. Op. cit. p. 593.

diferenciación genética (Fst) de 0,086 en poblaciones naturales y de cultivo de *L. vannamei* indicando solo una moderada diferenciación genética. Por otra parte, Rivera-Garcia y Grijalva-Chon obtuvieron un bajo valor de Fst de 0,016, con altos valores de Fis (índice de fijación) en todos los loci, producto de una alta endogamia, evidenciando una pequeña diferenciación entre las poblaciones estudiadas. Con microsatélites Machado¹⁴⁵ reportó estimativos de Fst por pares de poblaciones entre 0,0065 y 0,1145. Por su parte, Valles-Jimenez¹⁴⁶ encontró un valor de Fst significativo global de 0,055 indicando una diferenciación genética substancial para poblaciones de *L. vannamei* de diferentes puntos entre México y Panamá mostrando que estas poblaciones están estructuradas en subpoblaciones.

Las distancias genéticas de Nei entre ambos métodos presentaron similitud en cuanto a las diferencias entre las poblaciones naturales (tabla 10). Sin embargo, se observa que las distancias genéticas reportadas con aloenzimas fueron considerablemente mayores a las reportadas en el presente estudio con RAPDs. Es probable que esta diferencia entre las dos estimaciones se deba al hecho de que en el estudio con aloenzimas solo se utilizaron los loci polimórficos lo cual afectaría a las frecuencias alélicas, así como el mayor número de poblaciones analizado con aloenzimas y el carácter dominante del marcador RAPD.

Tabla 10. Distancias genéticas de Nei (1978) para aloenzimas (sobre la diagonal) y para RAPDs (bajo la diagonal) entre pares de poblaciones de camarón blanco *L. vannamei* de la región de Tumaco.

	Carbonera	Curay	Ensenada	Salahonda
Carbonera	****	0,815	0,380	0,505
Curay	0,198	****	0,661	0,681
Ensenada	0,166	0,084	*****	0,228
Salahonda	0,177	0,042	0,042	*****

* Los valores encima de la diagonal corresponden a ocho sistemas aloenzimáticos y los que se encuentran debajo de la diagonal corresponden a cuatro iniciadores RAPD. Fuente: información adaptada de esta investigación y de Hernandez y Rosales (2009). Caracterización bioquímica y análisis genético en las poblaciones naturales y cautivas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de la costa pacífica nariñense.

Otra importante diferencia es el hecho de que la población de Curay es la más alejada genéticamente en el estudio con aloenzimas (tabla 10). Esto se puede observar mejor en los dendrogramas de las distancias genéticas de Nei (1978)

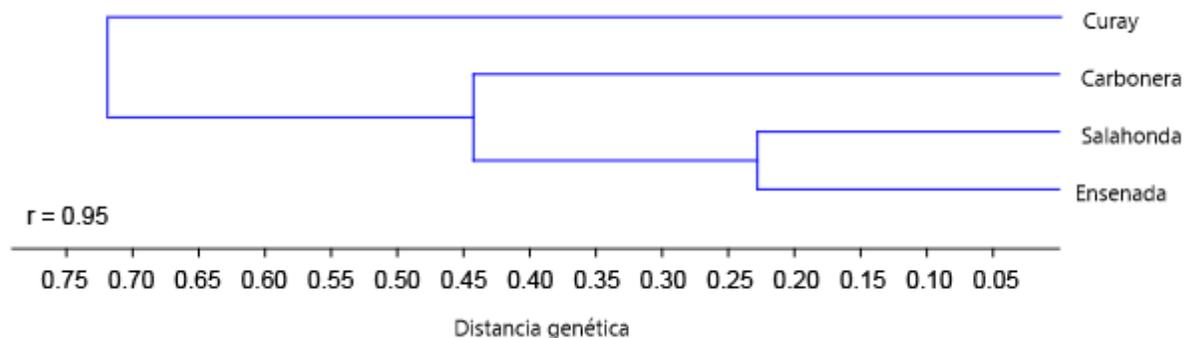
¹⁴⁵ MACHADO, Roman. Assessment of genetic variability in two lots of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) introduced to Cuba. Tesis de Maestría. Noruega: University of Tromsø. Department of Aquatic Biosciences, 2006. p. 19.

¹⁴⁶ VALLES-JIMENEZ, *et al.* Op. cit. p. 476.

(figuras 13 y 14), en los cuales se aprecia que en el estudio con aloenzimas (figura 13), la población más alejada es la población de Curay, mientras que en el estudio con RAPDs (figura 14) la más alejada es la población de La Carbonera. De igual manera, se observa que en ambos estudios las poblaciones de Salahonda y La Ensenada presentan la mayor similaridad genética, mientras que la población de Curay presenta los mayores valores de distancia genética entre las poblaciones naturales. Estos dendrogramas, muestran escalas diferentes debido a la mayor distancia genética reportada en el estudio de aloenzimas, donde las distancias genéticas van desde 0,228 hasta 0,815 a diferencia de las distancias reportadas con RAPD, que van desde 0,042 hasta 0,198, mostrando una mayor similitud entre las poblaciones en este estudio. Se puede apreciar también en estas figuras que el patrón de asociación entre las poblaciones naturales se conserva, a pesar de los mayores valores para las distancias genéticas reportadas en el estudio con aloenzimas.

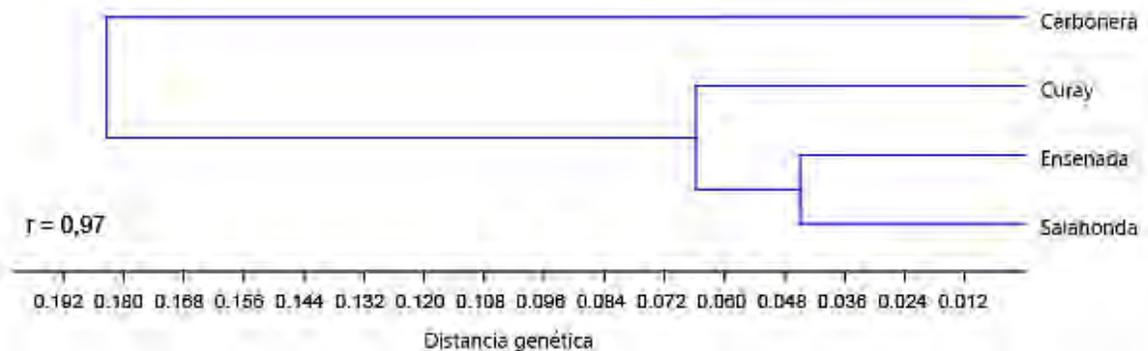
Los resultados mostrados en las figuras 13 y 14 indican que las técnicas de aloenzimas y RAPD presentan patrones similares para las poblaciones de La Ensenada y Salahonda, indicando que estas poblaciones se encuentran estrechamente relacionadas. Si bien las poblaciones de Curay y La Carbonera presentan resultados diferentes, se debe observar que en ambos estudios la población de Curay es la que presenta la mayor diferenciación entre las poblaciones naturales.

Figura 13. Dendrograma de las distancias genéticas de Nei (1978) para poblaciones de *Litopenaeus vannamei* de la región de Tumaco, obtenido a partir de aloenzimas.



* Dendrograma realizado mediante el método UPGMA. Fuente: adaptado de Hernandez y Rosales (2009). Caracterización bioquímica y análisis genético en las poblaciones naturales y cautivas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de la costa pacífica nariñense.

Figura 14. Dendrograma de las distancias genéticas de Nei (1978) para poblaciones de *Litopenaeus vannamei* de la región de Tumaco, obtenido a partir de RAPDs.



* Dendrograma realizado mediante el método UPGMA. Fuente: esta investigación.

En el caso de RAPDs, al comparar los resultados presentados para las poblaciones naturales se podría inferir que la población de Curay probablemente presenta una menor variabilidad genética debido a algún tipo de proceso de aislamiento, lo cual ocasionaría que exista una pérdida de variabilidad y un crecimiento en la diferenciación respecto a las demás poblaciones, tal como lo menciona Waldman¹⁴⁷, mientras que las poblaciones de Salahonda y La Ensenada presentarían una mayor variabilidad debido probablemente al intercambio de genes, lo cual también explicaría en parte las similitudes entre estas dos poblaciones.

Las diferencias que se observan en ambos estudios probablemente se deban a la naturaleza de ambos métodos y también a las diferencias en la forma en que se analizaron los datos. Según Aagaard *et al*¹⁴⁸, diversos estudios indican que existen diferencias entre los valores de los estimativos de diversidad genética calculados con RAPD y aloenzimas, siendo los valores encontrados para RAPD generalmente mayores que los encontrados para aloenzimas. Estos autores explican que esta diferencia en los resultados podría estar influenciada por el carácter dominante de los marcadores RAPD, sobre todo en organismos diploides donde se ha observado que la tasa de desviación aumenta al incrementarse el número de loci de baja frecuencia de alelos nulos. Torres *et al*¹⁴⁹ mencionan además que otra diferencia significativa entre los dos métodos es que las aloenzimas se limitan a regiones codificantes de proteínas mientras que RAPD

¹⁴⁷ WALDMAN. Op. cit., p. 240-245.

¹⁴⁸ AAGAARD; KRUSTOVSKY y STRAUSS. Op. cit., p. 75-77.

¹⁴⁹ TORRES, Elena y PÉREZ, César. Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (*Scrophulariaceae*): allozyme and RAPD analysis. *En*: American Journal of Botany. Enero, 2003. vol. 90, no. 1. p. 90.

utiliza generalmente regiones no codificantes de ADN, de modo que ambos marcadores experimentan diferentes dinámicas de evolución que pueden revelar diferentes patrones de variación genética. Liu *et al*¹⁵⁰ también señalan que los loci aloenzimáticos revelan generalmente menores estimativos de heterocigosidad dentro de una población y bajos estimativos de diferenciación genética entre poblaciones, lo cual mencionan también Hernández y Rosales¹⁵¹ en su estudio.

¹⁵⁰ LIU, Baozhong, *et al.* The comparison between allozyme and RAPD markers for the population genetic structure analysis of scallop *Chlamys farreri*. En: Chinese Journal of Oceanology and Limnology. Septiembre, 2006. vol. 24, no. 3. p. 298.

¹⁵¹ HERNÁNDEZ y ROSALES. Op. cit., p. 24, 69.

6. CONCLUSIONES

Utilizando la técnica RAPD fue posible realizar una estimación de la variabilidad genética de tres poblaciones naturales y una de cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de la región de Tumaco. Por medio de esta técnica se generaron un total de 157 bandas (*loci*), de las cuales 83 resultaron polimórficas. Estos locus fueron generados a partir de 4 iniciadores decaméricos, los cuales mostraron una adecuada amplificación y reproducibilidad en las pruebas piloto.

En las poblaciones estudiadas se observó un polimorfismo entre el 49,04% y el 55,41%, siendo las poblaciones de La Carbonera (cultivo) y La Ensenada (natural) las que mostraron mayor polimorfismo promedio, con un valor de 55,41% para ambas poblaciones. Estos valores se encuentran dentro de los rangos reportados por la literatura para esta especie.

Los valores globales de G_{ST} (0,348) y Φ_{PT} (0,421) encontrados indican que existe una diferenciación considerable entre las poblaciones estudiadas. El análisis del estimativo Φ_{PT} por pares de poblaciones indica que la población más diferenciada es la población de cultivo La Carbonera, presentando valores entre 0,495 y 0,554 respecto a las demás poblaciones, mientras que las poblaciones menos diferenciadas son las poblaciones naturales de Salahonda y La Ensenada con un valor de Φ_{PT} entre pares de 0,186. La población natural de Curay presentó una diferenciación considerable respecto a las poblaciones de Salahonda y la Ensenada con valores de Φ_{PT} entre pares de 0,238 y 0,353 respectivamente. Este patrón fue el mismo que se observó para las distancias genéticas de Nei.

Los resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) indican que la mayor parte de la variabilidad encontrada se halla dentro de los individuos de cada población (58%) mientras que el restante (42%) se debe a diferencias entre las poblaciones, lo cual (en conjunto con los resultados observados para el estadístico Φ_{PT} y el árbol filogenético) permite inferir la presencia de una estructura poblacional entre cada uno de los sitios estudiados, es decir, que es posible diferenciar genéticamente una población de otra.

7. RECOMENDACIONES

Para obtener resultados más detallados se recomienda aumentar el número de iniciadores utilizados, ya que la literatura reporta que como mínimo se deben utilizar 5 iniciadores RAPD para obtener una caracterización adecuada de las especies de estudio. Si bien, el número de ejemplares utilizado en el presente estudio se encuentra dentro de los límites recomendados en la bibliografía, podría ser recomendable el estudio de más poblaciones tanto naturales como cautivas para obtener datos más informativos. Igualmente esta clase de estudios podrían ser complementados con el uso de marcadores codominantes, como los microsatélites, los cuales han reemplazado en la actualidad los estudios con aloenzimas.

BIBLIOGRAFÍA

AAGAARD, Jan; KRUSTOVSKII, Konstantin y STRAUSS, Steven. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. En: Heredity. 1998. vol. 81. p. 69-78.

AGUILERA, María. Los cultivos de camarones en la costa caribe colombiana. En: Documentos de trabajo sobre economía regional. Cartagena: Banco de la Republica – Sucursal Cartagena, 1998. 50 p.

ALCALDÍA DE TUMACO. Nuestro municipio: documentos del municipio [en línea]. [Tumaco]: Alcaldía de Tumaco, 2015. Actualizado 10 de febrero de 2012. Disponible en <http://www.tumaco-narino.gov.co/documentos_municipio.shtml>

ALCALDÍA DE TUMACO. Nuestro municipio: información general [en línea]. [Tumaco]: Alcaldía de Tumaco, 2015. Actualizado 4 de noviembre de 2014. Disponible en <http://www.tumaco-narino.gov.co/informacion_general.shtml>

ALCÁNTARA, Miroslava. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Ecología Molecular. México D. F.: Instituto Nacional de Ecología SEMARNAT, 2007. 608 p.

ALJANABI, Salah y MARTINEZ, Iciar. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. En: Nucleic Acids Research. 1997. vol. 57, no. 22. p. 4692, 4693.

ANDRIANTAHINA, Farafidy, *et al.* Assessment of age genetic correlations for weight in pond reared *Litopenaeus vannamei*. En: Journal of Animal Science Advances. 2012b. vol. 2, no. 4. p. 380-385.

ANDRIANTAHINA, Farafidy, *et al.* Current status of genetics and genomics of reared *Penaeid* shrimp: information relevant to access and benefit sharing. En: Marine Biotechnology. Agosto, 2013. vol. 15, no. 4. p. 399-412.

ANDRIANTAHINA, Farafidy, *et al.* Response to selection, heritability and genetic correlations between body weight and body size in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Marzo, 2012a. vol. 30, no. 2. p. 200-205.

ARGUE, Brad, *et al.* Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura syndrome virus. En: Aquaculture. Febrero, 2002. vol. 204, no. 3-4. p. 447-460.

ARIF, Ibrahim, *et al.* DNA marker technology for wildlife conservation. En: Saudi Journal of Biological Sciences. 2011. vol. 18. p. 219-225.

AUBERT, H. y LIGHTNER, D. Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. En: Marine Biology. Diciembre, 2000. vol. 137, no. 5-6. p. 875-885.

BARDAKCI, Fevzi. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. En: Turkish Journal of Biology. 2001. vol. 25, no. 2. p. 185-196.

BENECKE, M. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophageous insects (diptera, coleoptera) incriminal forensic studies: validation and use in practice. En: Forensic Science International. 1998. vol. 98. p. 157-168.

BENZIE, J. A. Genetic improvement of prawns. En: 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (6: 11-16, enero: Armidale, Australia). Australia: Organising Committee, 1998.

BRANDENBERG, Oliver, *et al.* Biotechnology in animal production. En: Introduction to molecular biology and genetic engineering. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011. p. 57-81.

BRAY, William y LAWRENCE, Addison. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. En: Marine Shrimp Culture: principles and practices. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1992. 855 p.

BÜRGER, R., *et al.* How much heritable variation can be maintained in finite populations by mutation-selection balance? En: Evolution. Diciembre, 1989. vol. 43, no. 8. p. 1748-1766.

CARR, W., *et al.* Genetic variation in weight and survival in a population of specific pathogen-free shrimp, *Penaeus vannamei*. En: Diseases in Asian Aquaculture III. Manila: Asian Fisheries Society, 1997. p. 265-271.

CASALLA, Robin. Medición de distancias genéticas en poblaciones de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en la costa ecuatoriana. Tesis de Magister en Ciencias. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, 2003. 68 p.

CASTILLO-JUÁREZ, Héctor, *et al.* Heritability for body weight at harvest size in the Pacific white shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, from a multi-environment experiment using univariate and multivariate animal models. En: Aquaculture. Noviembre, 2007. vol. 273, no. 1. p. 42-49.

CIMMYT. Quantification and quality control of DNA. En: Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. 3 ed. Mexico D.F.: International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), 2005. p. 11-13.

CRUZ, Pedro., *et al.* Genetic Variability Assessed by Microsatellites in a breeding program of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). En: Marine Biotechnology. Abril, 2004. vol. 6, no. 2. p.157-164.

DE DONATO, Marcos, *et al.* Mass selection and inbreeding effects on a cultivated strain of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in Venezuela. En: Genetics in Aquaculture VIII. June, 2005. vol. 247, no. 1-4. p. 159-167

DELGADO, Flor y REYES, Nancy. Estimación de la variabilidad genética en una población natural y una cautiva del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) de la región de Tumaco mediante la técnica de electroforesis de aloenzimas multilocus. Trabajo de Grado Químico. Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química, 2006. 70 p.

DINESH, K., *et al.* RAPD markers in fishes: an evaluation of resolution and reproducibility. En: Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. 1995. vol. 3, no. 2. p. 112–118.

FREITAS, Patricia y GALLETI, Pedro. Assessment of the genetic diversity in five generations of a commercial broodstock line of *Litopenaeus vannamei* shrimp. En: African Journal of Biotechnology. Diciembre, 2005. vol. 4, no. 12. p. 1362-1367.

ESPINOSA, G., *et al.* Análisis poblacional del camarón blanco cubano (*Litopenaeus schmitti*) utilizando aloenzimas como marcadores genéticos. En: Revista de Investigaciones Marinas. 2003. vol. 1. p. 11-16.

ESPINOSA, G., *et al.* Variación genética y morfológica en poblaciones naturales y cautivas de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en Cuba. En: I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA 2002) (1: 1 junio-30 septiembre, 2002) I. España: Universidad de Zaragoza, 2002. p. 778-784.

EXETER SOFTWARE. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System [programa de computador]. Version 2.1. New York: Applied Biostatistics Inc., 2000.

FAO. Programa de información de especies acuáticas: *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) [en línea]. Roma: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Actualizado 7 de abril 2006 [citado 10 de febrero 2015]. Disponible en <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es#tcNA00D9>

FENUCCI, J. Manual para la cría de camarones peneidos [en línea]. Brasil: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1988.

[consultado 15 dic. 2014]. Disponible en <<http://www.fao.org/3/contents/9c1078d6-7837-5588-a4d7-de54c2519536/AB466S00.htm>>

FRANCO, Tito e HIDALGO, Rigoberto. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Roma: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, 2003. 94 p.

FREITAS, PD; CALGARO, MR. y GALLETI junior, PM. Genetic diversity within and between broodstocks of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (*Decapoda, Penaeidae*) and its implication for the gene pool conservation. En: Brazilian Journal of Biology. Diciembre, 2007. vol. 67, no. 4. p. 939-943.

FRESNEDA, Adriana. Determinación de la estructura poblacional de *Litopenaeus vannamei* mediante ISSRs a lo largo de la costa ecuatoriana. Tesis de Magister en Ciencias. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, 2003. 60 p.

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

GARCIA, D., *et al.* Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. En: Molecular Marine Biology and Biotechnology. Octubre, 1994. vol. 3, no. 5. p. 270-280.

GITTERLE, Thomas. Genetic (co)variation in resistance to white spot syndrome virus (WSSV) and harvest weight in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. En: Aquaculture. 2005. vol. 246. p. 139-149.

GONÇALVES, Michelle, *et al.* Fluorescent amplified fragment length polymorphism (fAFLP) analyses and genetic diversity in *Litopenaeus vannamei* (*Penaeidae*). En: Genetics and Molecular Biology. 2005. vol. 28, no. 2. p. 267-270.

GOYARD, Emmanuel, *et al.* Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. En: Aquatic Living Resources. Diciembre, 2003. vol. 16, no. 06. p. 501-508.

GROSBER, Richard; LEVITAN, Donald y CAMERON, Brenda. Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR markers: a random primer for the novice and nervous. En: Molecular zoology: advances, strategies, and protocols. New York: Willey-Liss, 1996. p. 67-100.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. y RYAN, P. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. En: Palaeontologia Electronica. 2001. vol. 4, no. 1. 9 p. Disponible en: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>

HARTL, D. y CLARK, A. Genetic and phenotypic variation. En: Principles of population genetics. 4 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2007. 565 p.

HEDRICK, Philip. Genetics of populations. 4 ed. Estados Unidos de América: Jones and Bartlett Publishers Inc., 2011. 675 p.

HERNÁNDEZ, Ana María y ROSALES, Álvaro. Caracterización bioquímica y análisis genético en las poblaciones naturales y cautivas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de la costa pacífica nariñense. Trabajo de Grado Químico. Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química, 2009. p. 68. (90 p.)

HOLMES, Susan. Bootstrapping phylogenetic trees: theory and methods. En: Statistical Science. Septiembre, 2003. vol. 18, no. 2. p. 241-255.

HOLSINGER, Kent y WEIR, Bruce. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. En: Nature Reviews Genetics. Septiembre, 2009. vol. 10. p. 639-650.

IBARRA, Ana Maria, *et al.* Progress on the genetics of reproductive performance in penaeid shrimp. En: Aquaculture. Agosto, 2007. vol. 268. p. 23-43.

IBARRA, Ana y FAMULA, Thomas. Genotype by environment interaction for adult body weights of shrimp *Penaeus vannamei* when grown at low and high density. En: Genetics Selection Evolution. Septiembre, 2008. vol. 40, no. 5. p. 541-551.

KLINBUNGA, S., *et al.* Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and Mitochondrial DNA RFLP analyses. En: Marine Biotechnology. Septiembre, 2001. vol. 3, no. 5. p. 428-438.

KOCHER, T., *et al.* Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. En: Proceedings of the national academy of sciences. 1989. vol. 86. p. 6196-6200.

KOSMAN, E. Nei's gene diversity and the index of average differences are identical measures of diversity within populations. En: Plant Pathology. Octubre, 2003. vol. 52, no. 5. p. 533

LABASENA, M.; TORRES, M. y ESPINOSA, G. Variabilidad y distancia genética en especies de *Penaeus*. En: Revista de Investigaciones Marinas. Marzo, 1994. vol. 15, no. 1. p. 80-87

LAKRA, W. *et al.* Genetic characterization of *Metapenaeus affinis* (H. M. Edwards, 1837) using RAPD markers. En: Molecular Biology Reports. Diciembre, 2010. vol. 37, no. 8. p. 3757-3761.

LARSON, Allan; WAKE, David y YANEV, Kay. Measuring gene flow among populations having high levels of genetic fragmentation. En: Genetics. Febrero, 1984. vol. 106, no. 2. p. 193-308.

LAY, Ching-Yi; CHENG, Winton y KUO, Ching-Ming. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. En: Fish & Shellfish Immunology. Mayo, 2005. vol. 18, no. 5. p. 417-430.

LAZAR, Istvan. GelAnalyzer 2010 [programa de computador]. Versión 2010a. Istvan Lazar, 2010. Disponible en <<http://www.gelanalyzer.com/>>

LIU, Baozhong, *et al.* The comparison between allozyme and RAPD markers for the population genetic structure analysis of scallop *Chlamys farreri*. En: Chinese Journal of Oceanology and Limnology. Septiembre, 2006. vol. 24, no. 3. p. 295-299.

LIU, Bo, *et al.* A genetic linkage map of marine shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* based on AFLP, SSR, and RAPD markers. En: Chinese Journal of Oceanology and Limnology. Julio, 2010. vol. 28, no. 4. p. 815-825.

LIU, Zhao-Wei, *et al.* Genetic relationships and variation among ecotypes of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) determined by random amplified polymorphic DNA markers. En: Genome. Diciembre, 1994. vol. 37, no. 6. p. 1011-1017.

MACHADO, Roman. Assessment of genetic variability in two lots of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) introduced to Cuba. Tesis de Maestría. Noruega: University of Tromsø. Departament of Aquatic Biosciences, 2006. 42 p.

MAGALHÃES, Marcelo; MARTINEZ, Romari y GALOTTO, Fernanda. Genetic diversity of *Litopenaeus vannamei* cultivated in Bahia State, Brazil. En: Pesquisa Agropecuária Brasileira. Agosto, 2007. vol. 42, no. 8. p. 1131-1136.

MASATOSHI, Nei. Genetic distance and molecular phylogeny. En: Population genetics and fishery management. Washington: University of Washington Press, 1991. p. 193-224.

MEIRMANS, Patrick y HEDRICK, Philip. Assessing population structure: Fst and related measures. En: Molecular Ecology Resources. Octubre, 2010. vol. 11, no. 1. p. 5-18.

MISHRA, Prem Sagar, *et al.* Genetic diversity in *Metapenaeus dobsoni* using RAPD analysis. En: Biochemical Genetics. Junio, 2009. vol. 47, no. 5-6. p. 421-426.

MONTAÑO-PEREZ, Karla, *et al.* Ventajas del uso de marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético en camarón. Panorama Acuícola [en línea]. Enero, 2005. vol. 18, no. 22 [citado 10 de febrero 2015]. Disponible en <http://www.panoramaacuicola.com/noticias/2005/01/01/ventajas_del_uso_de_marcadores_moleculares_en_los_programas_de_mejoramiento_genetico_en_camaron.html>

NEWTON C. y GRAHAM, A. Instrumentation, reagents and consumables. En: PCR (Introduction to biotechniques series). Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 1994. p. 9-12.

NUEZ, Fernando y CARRILLO, José. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 2000. 579 p.

O'CONNELL, M.; SKIBINSKI, D. y BEARDMORE, J. Mitochondrial DNA and allozyme variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations in Wales. En: Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 1995. vol. 52, no 1. p. 171-178.

PAN, Y. *et al.* Analysis of primer-derived, nonspecific amplification products in RAPD-PCR. En: Biotechniques. Junio, 1997. vol. 22, no. 6. p. 1071-1077.

PEAKALL, R y SMOUSE, P. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel [programa de computador]. Versión 6.5. Peakall and Smouse, 2012. Disponible en <<http://biology-assets.anu.edu.au/GenAIEx/Welcome.html>>

PÉREZ, F. Generación y manipulación de la diversidad genómica en *Penaeus vannamei* para la acuicultura del Ecuador. Ecuador: Informe ejecutivo BID-FUNDACYT 210, 1999. 57 p.

PÉREZ, Franklin., *et al.* A sex-specific linkage map of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* based on AFLP markers. En: Aquaculture. Septiembre, 2004. vol. 242. p. 105-118.

PÉREZ-FARFANTE, I. y KENSLEY, B. *Penaeoid* and *Sengestoid* shrimp and prawns of the World: Keys and diagnoses for the families and genera. Leiden: Universal Books Services, 1997. 233 p.

PEREZ-HENRIQUEZ, Ricardo; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, Fidencio y CRUZ, Pedro. Genetic diversity status of White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico. En: Aquaculture. Diciembre, 2009. vol. 297, no. 1-4. p. 44-50.

PETCHEY, Owen y GASTON, Kevin. Dendrograms and measuring functional diversity. En: Oikos. Agosto, 2007. vol. 116, no. 8. p. 1422-1426.

QUELLER, David; STRASSMAN, Joan y HUGHES, Collin. Microsatellites and kinship. En: Trends in Ecology & Evolution. Agosto, 1993. vol. 8, no. 8. p. 285-288

RIENESL, J. y WAGNER, G. Constancy and change of basipodial variation patterns: a comparative study of crested and marbled newts - *Triturus cristatus*, *Triturus marmoratus* - and their natural hybrids. En: Journal of Evolutionary Biology. Marzo, 1992. vol. 5, no. 2. p. 307-324.

SÁNCHEZ, Leopoldo; BIJMA, Piter y WOOLLIAMS, John. Minimizing inbreeding by managing genetic contributions across generations. En: Genetics. Agosto, 2003. vol. 164, no. 4. p. 1589-1595.

SBORDONI, V., *et al.* Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (*Crustacea, Decapoda*). En: Aquaculture. 1986. vol. 57. p. 239-251.

SHAHJAHAN, R., *et al.* Lower incubation-temperature increases yield of insect genomic DNA isolated by the CTAB method. En: Biotechniques. 1995. vol. 19. p. 332-334.

SKROCH, P. y NIENHUIS, P. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. En: Theoretical and Applied Genetics. Noviembre, 1995. vol. 91, no. 6-7. p. 1086-1091.

SMITH, P. Random amplified Polymorphic DNA (RAPD). En: Stock identification methods: applications in fishery science. [s.l.] Elsevier Inc., 2005. p. 371-387.

SONG, L., *et al.* Study of population genetic structure in *Penaeus japonicus* with RAPD markers. En: Oceanologia et Limnologia sínica. 1999. vol. 30. p. 261-266.

SOTO-HERNANDEZ, J. y GRIJALVA-CHON, J. Genetic differentiation in hatchery strains and wild white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone, 1931) from northwest Mexico. En: Aquaculture International. 2004. vol. 12. p. 593-601.

STURTEVANT, A. A history of Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 173 p.

SUNDEN, Sara y DAVIS, Scott. Evaluation of genetics in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. En: Aquaculture. Septiembre, 1991. vol. 97, no. 2-3. p. 131-142.

TASSANAKAJON, Anchalee, *et al.* Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. En: Molecular Marine Biology and Biotechnology. Junio, 1997. vol. 6, no. 2. p. 110-115.

TORRES, Elena y PÉREZ, César. Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (*Scrophulariaceae*): allozyme and RAPD analysis. En: American Journal of Botany. Enero, 2003. vol. 90, no. 1. p. 85-92.

UNITED STATES OF AMERICA. National Center for Biotechnology Information. Base de datos de publicaciones científicas [base de datos en línea]. Disponible en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>

UNIVERSITY OF ALBERTA y CENTER FOR INTERNATIONAL FORESTRY RESEARCH. POPGENE 1.32: population genetic analysis [programa de computador]. Versión 1.32 (32-bit). Molecular Biology and Biotechnology Centre, 2000. Disponible en <http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html>

UTTER, Fred, AEBERSOLD, Paul y WINANS, Gary. Interpreting genetic variation detected by electrophoresis. En: Population genetics and fishery management. Washington: University of Washington Press, 1991. p. 24-46.

VALERIO-GARCIA, Roberto y GRIJALVA-CHON, Jose. Random-amplified Polymorphic DNA analysis in hatchery populations and wild Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* from the Gulf of California. En: Aquaculture Research. Abril, 2008. vol. 39, no. 6. p. 666-669.

VALLES-JIMENEZ, R.; CRUZ, P. y PEREZ-ENRIQUEZ, R. Population genetic structure of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA variation. En: Marine Biotechnology. Agosto, 2004. vol. 6, no. 5. p. 475-484.

VELA-AVITÚA, Sergio, *et al.* Decline of genetic variability in a captive population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using microsatellite and pedigree information. En: Electronic Journal of Biotechnology. Julio, 2013. vol. 16, no.4. 10 p.

WAGNER, P. G. Adaptation and the modular design of organisms. En: Lecture notes in computer science. Junio, 1995. vol. 929. p. 315-328.

WALDMAN, John. The importance of comparative studies in stock analysis. En: Fisheries Research. Octubre, 1999. vol. 43, no. 1. p. 237-246.

WALKER, J. y RAPLEY, R. Molecular biometrics handbook. 2 ed. [s.l.] Humana Press, 2008. 1124 p.

WALLACE, Lisa. Methods available for the analysis of data from dominant molecular markers [en línea]. [Ohio]: Ohio State University, 2003. Disponible en <<http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/dominant.marker.pdf>>

WILLIAMS, J., *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. En: Nucleic Acids Research. Noviembre, 1990. vol. 18, no. 22. p. 6531-6535.

YANG, Y., *et al.* Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. En: Journal of Biological Chemistry. Septiembre, 2003. vol. 278. p. 36859–36867.

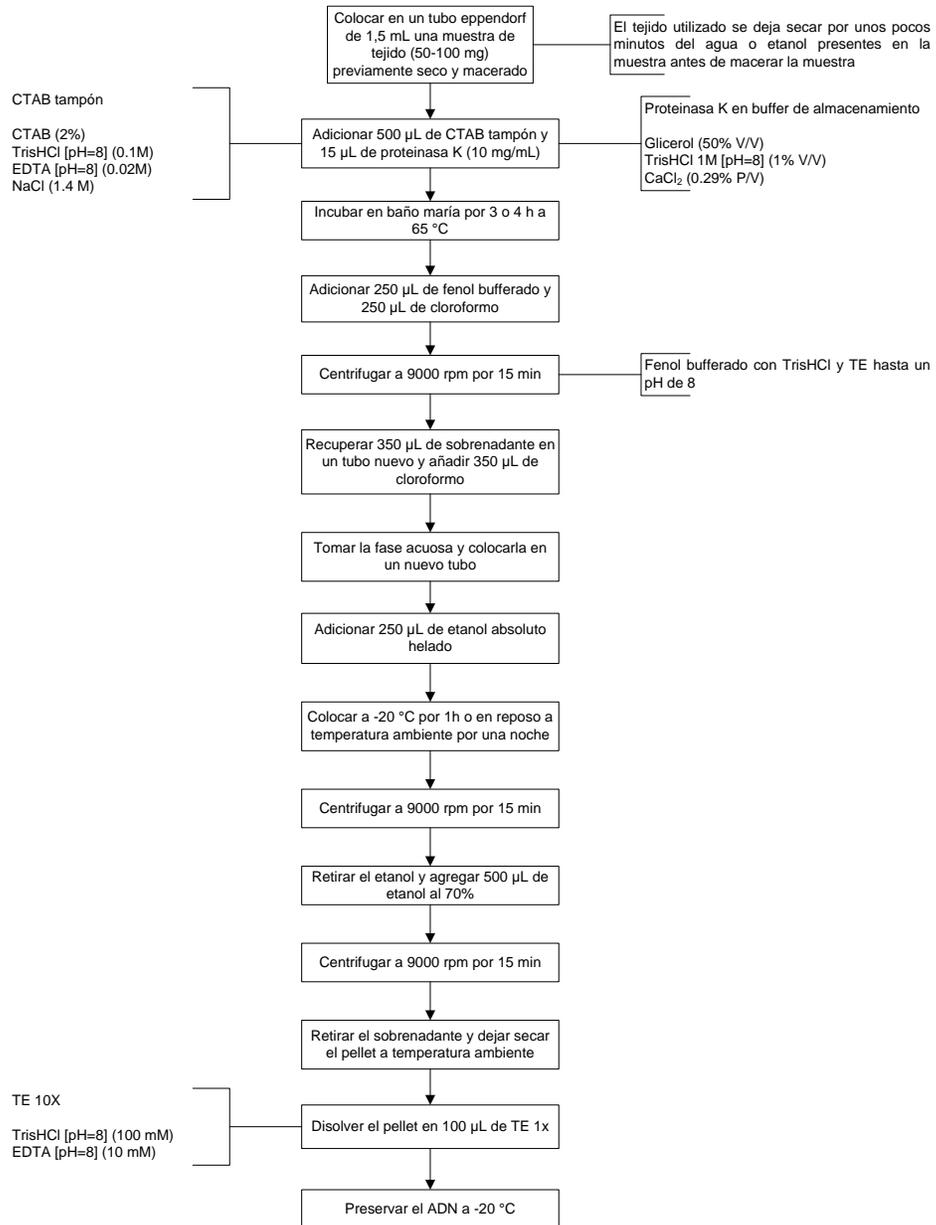
YOUSSEF, Muhammad. Khirshyat 1.0 [programa de computador]. Versión 1.0. Youssef Muhammad, 2012. Disponible en: <http://www.researchgate.net/publication/237090169_Khirshyat_1.0_a_Simple_Micro-Program_for_Some_Molecular_Biology_Protocols>

ZHANG, Liusuo, *et al.* A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates. En: Genetica. Septiembre, 2007. vol. 131, no. 1. p. 37-49.

ZHUANG, Zhimeng, *et al.* Genetic diversity in *Penaeus chinensis* shrimp as revealed by RAPD technique. En: Progress in Natural Science. 2001. vol. 11, no. 6. p. 432-438.

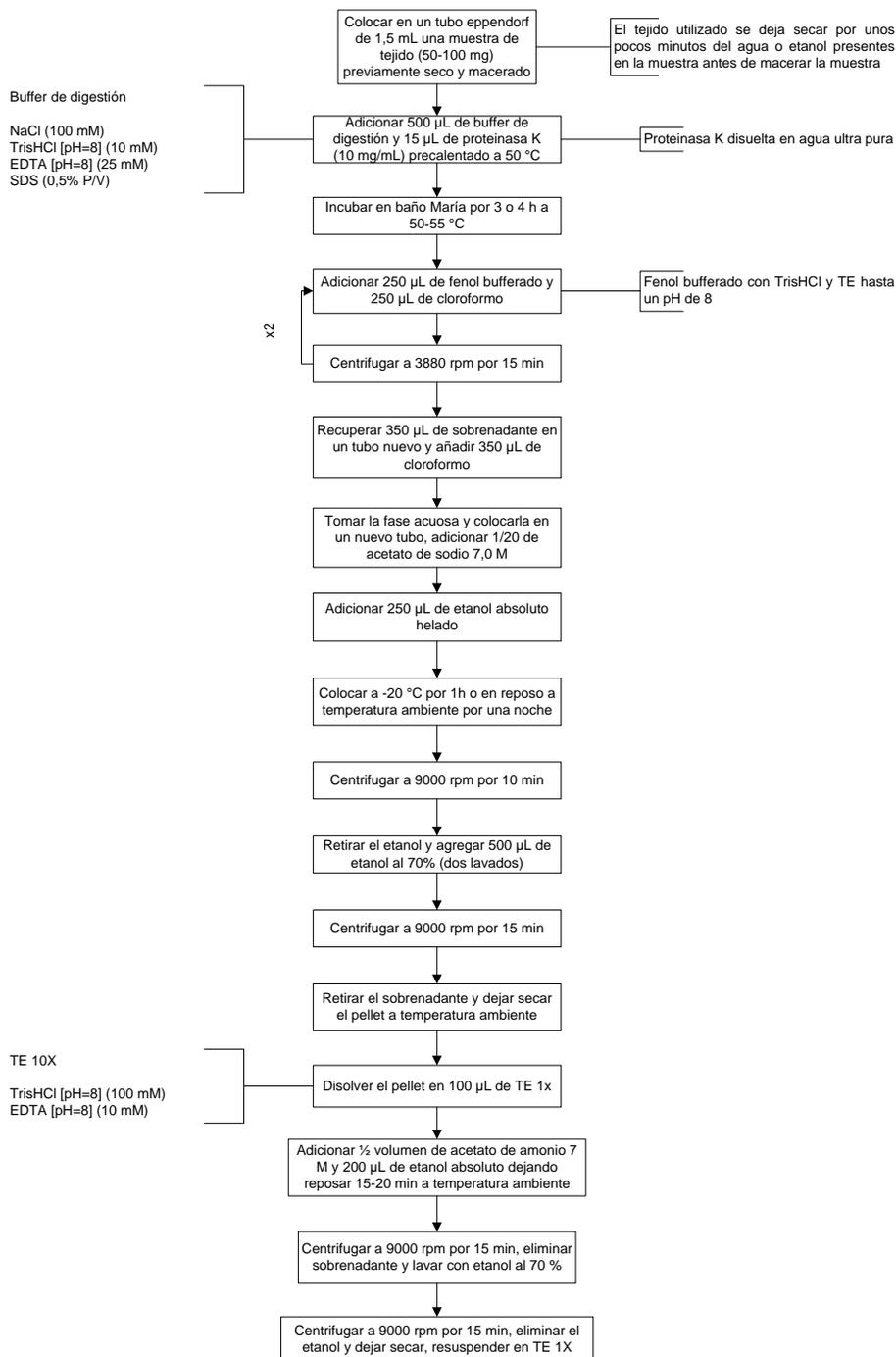
ANEXOS

Anexo A. Extracción de ADN con CTAB (Modificado Shahjahan *et al*¹⁵²).



¹⁵² SHAHJAHAN, R., *et al.* Lower incubation-temperature increases yield of insect genomic DNA isolated by the CTAB method. *En: Biotechniques*. 1995. vol. 19. p. 332-334.

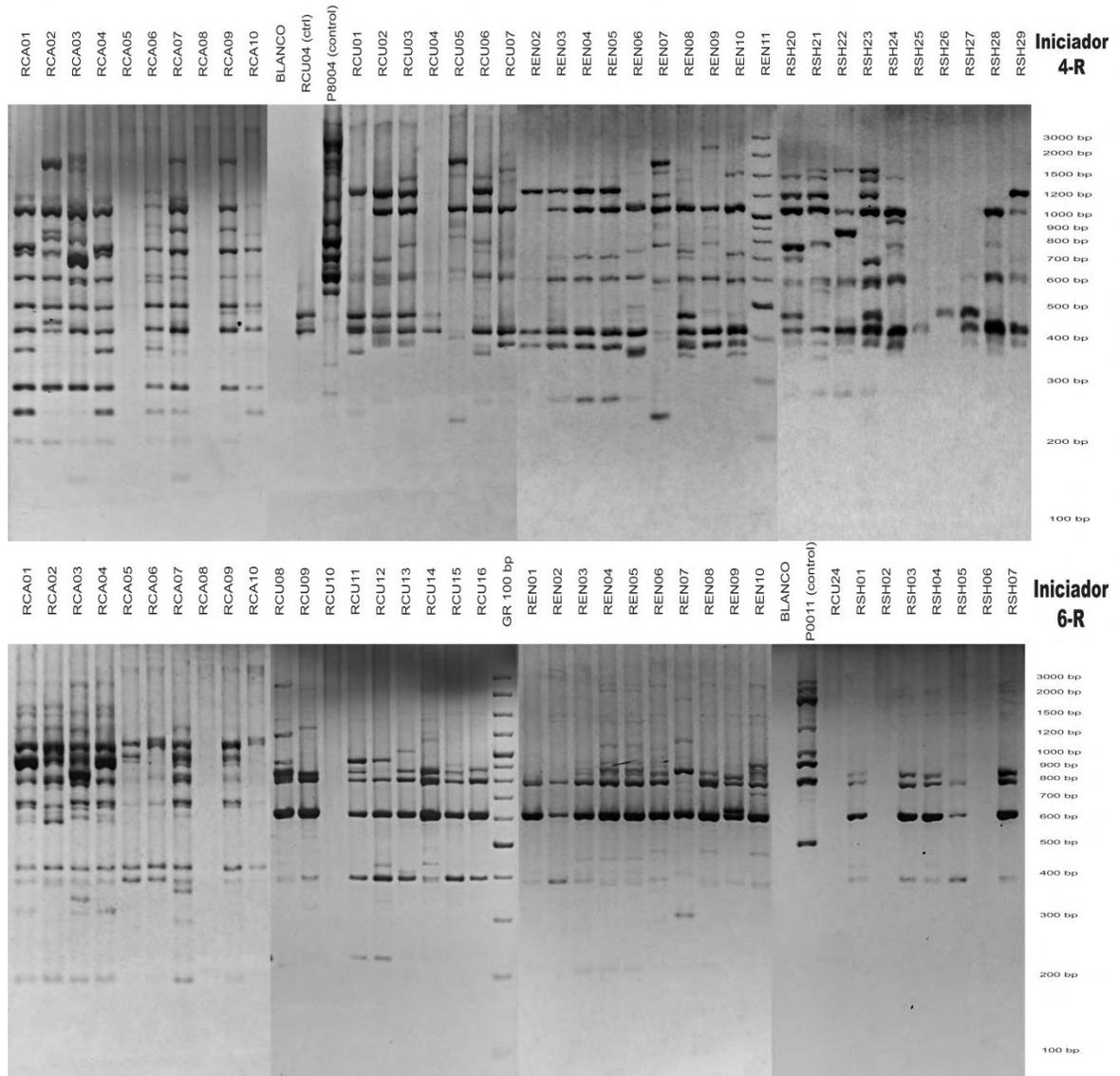
Anexo B. Extracción de ADN con fenol-cloroforno (Modificado Kocher *et al*¹⁵³).



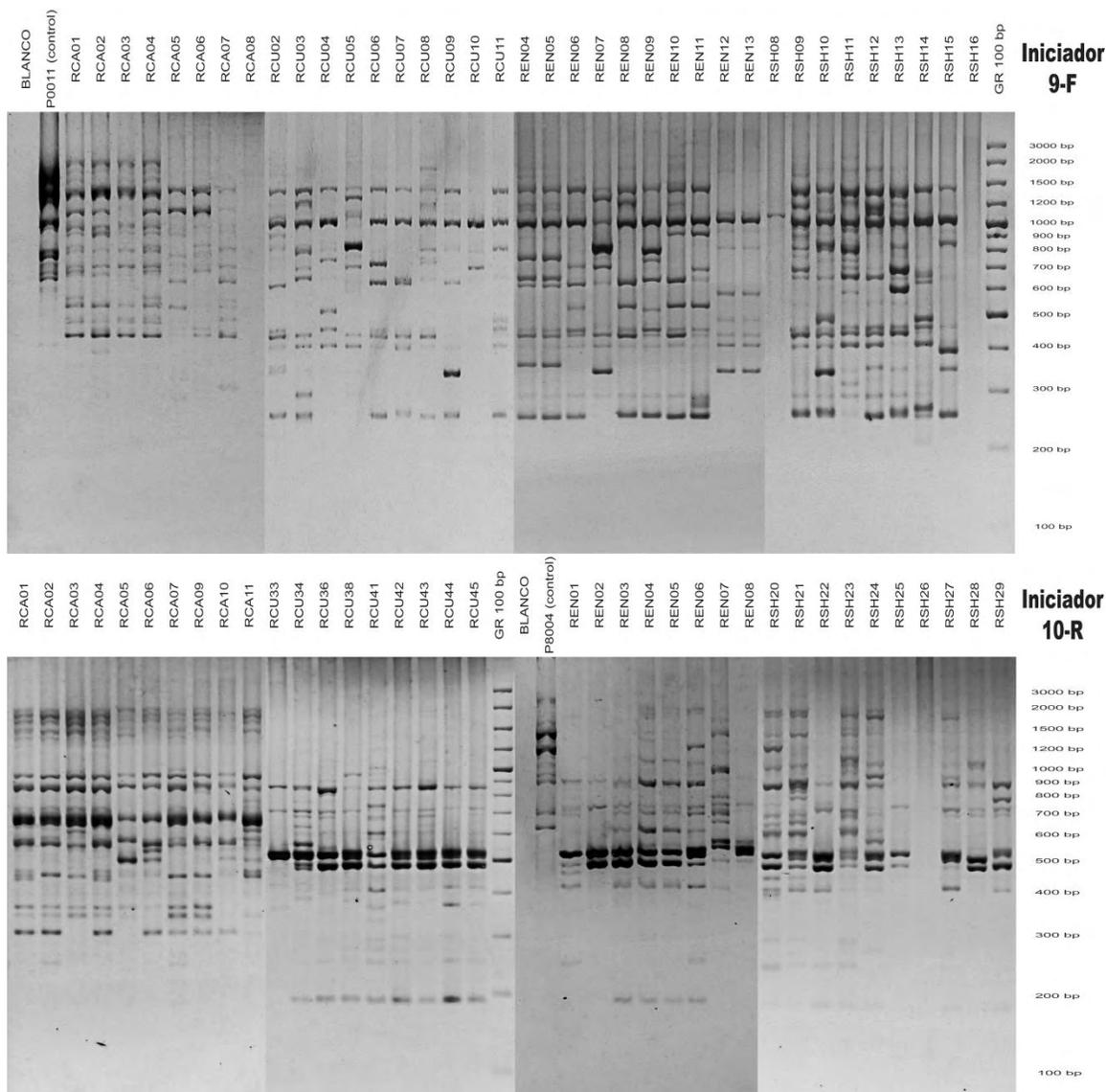
Fuente: esta investigación.

¹⁵³ KOCHER, T., *et al.* Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *En: Proceedings of the national academy of sciences.* 1989. vol. 86. p. 6196-6200.

Anexo C. Perfil de RAPDs para cada población de *L. vannamei* de la región de Tumaco, generado con cada uno de los cuatro iniciadores utilizados en este estudio.



* Electroforesis en gel de agarosa al 2% (5 V/cm) utilizando bromuro de etidio para la tinción de las muestras. P8004 y P0011 corresponden a una muestra de control adicional de ADN de *Colletotrichum spp.* GR 100bp es el marcador de peso molecular. La fotografía se muestra en colores invertidos para facilitar la identificación y asignación de bandas. Solo se muestra una fracción del total de individuos estudiados. RCA = La Carbonera; RCU = Curay; REN = Ensenada, RSH = Salahonda. Fuente: esta investigación.



* Electroforesis en gel de agarosa al 2% (5 V/cm) utilizando bromuro de etidio para la tinción de las muestras. P8004 y P0011 corresponden a una muestra de control adicional de ADN de *Colletotrichum spp.* GR 100bp es el marcador de peso molecular. La fotografía se muestra en colores invertidos para facilitar la identificación y asignación de bandas. Solo se muestra una fracción del total de individuos estudiados. RCA = La Carbonera; RCU = Curay; REN = Ensenada, RSH = Salahonda. Fuente: esta investigación.