

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y ANÁLISIS GENÉTICO EN LAS
POBLACIONES NATURALES Y CAUTIVAS DEL CAMARÓN BLANCO
(*Litopenaeus vannamei*) DE LA COSTA PACÍFICA NARIÑENSE

ANA MARÍA HERNÁNDEZ ROJAS
ÁLVARO RICARDO ROSALES PALACIOS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2010

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y ANÁLISIS GENÉTICO EN LAS
POBLACIONES NATURALES Y CAUTIVAS DEL CAMARÓN BLANCO
(*Litopenaeus vannamei*) DE LA COSTA PACÍFICA NARIÑENSE

ANA MARÍA HERNÁNDEZ ROJAS
ÁLVARO RICARDO ROSALES PALACIOS

Trabajo de grado presentado al comité curricular y de investigaciones del
Departamento de Química como requisito parcial para optar al título de Químico

Director

Msc. JESUS ADRIANO ROMO RAMOS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUIMICA
SAN JUAN DE PASTO
2010

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”

“Artículo 1 del acuerdo No. 234 de Octubre 11 de 1966, emanada por el honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño”

Nota de aceptación

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, 19 de Agosto de 2010

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirnos alcanzar esta meta tan importante.

A nuestros padres y hermanos por sus sacrificios y apoyo constante.

Al Msc. JESUS ROMO, por la dirección y orientación en el desarrollo de este trabajo de grado.

A los profesores Álvaro Burgos y Jesús Cabrera por su colaboración como jurados de nuestro trabajo de investigación.

A la VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES, POSGRADOS Y RELACIONES INTERNACIONALES DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO (VIPRI) por la financiación de este trabajo.

A los profesores y laboratoristas del Departamento de Química de la Universidad de Nariño por su colaboración.

RESUMEN

La implementación de programas de mejoramiento apoyados con herramientas moleculares promete acelerar las ganancias genéticas por ciclo de selección en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, especie que se tiene poca información acerca de los índices genéticos. En el presente trabajo se planteó caracterizar genéticamente seis poblaciones de la especie de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de la costa pacífica de Nariño, sur de Colombia, cuatro poblaciones naturales y dos de cultivo, utilizando ocho *loci* electroforéticos, que se resolvieron de ocho sistemas de proteínas. La población más variable fue la de La Chorrera. ($H_n.b=0.49$) con un promedio de 3.12 alelos por *locus* y las menos variables son las de cultivo ($H_n.b=0.31$) con un promedio de 2.3 alelos por *locus*. El porcentaje promedio de polimorfismo fue del 93.5% para las poblaciones naturales y del 68.7% para las de cultivo, siendo las poblaciones de la Chorrera y Salahonda las que presentaron mayor variabilidad genética. Existe alguna diferenciación genética entre las poblaciones naturales con F_{st} 0.35 e igualmente las distancias genéticas son considerables entre las poblaciones.

ABSTRACT

The implementation of breeding programs supported by molecular tools promises to accelerate genetic gains per selection cycle in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, a species that little is known about the genetic indices. In the present study were to genetically characterize six populations of the species of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Coast of Nariño, southern Colombia, and two four natural populations growing, using eight electrophoretic loci, which resolved in eight sets of proteins. The population variable was that of La Chorrera. ($H_n.b = 0.49$) with an average of 3.12 alleles per locus and the variables are less culture ($H_n.b = 0.31$) with an average of 2.3 alleles per locus. The average percentage of polymorphism was 93.5% for wild populations and 68.7% for culture, with the populations of the Chorrera and Salahonda that have the highest genetic variability. There is some genetic differentiation among natural populations and also 0.35 F_{st} genetic distances between populations are significant.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION	20
1. OBJETIVOS	23
1.1. OBJETIVO GENERAL	23
1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
2. ANTECEDENTES	24
3. MARCO TEORICO	27
3.1. CARACTERÍSTICAS DEL CAMARÓN BLANCO <i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i> .	27
3.1.1 Ciclo vital	28
3.2. CAMARON DE CULTIVO	29
3.3. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE POBLACIONAL	30
3.4. MARCADORES GENÉTICOS	33
3.5. ELECTROFORESIS DE ALOENZIMAS	35
3.6. ALOENZIMAS EN CAMARONES	37
4. METODOLOGÍA	39
4.1. DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE MUESTREO	39
4.2. MATERIAL BIOLÓGICO	40
4.2.1. Poblaciones Naturales	41
4.2.2. Poblaciones de Cultivo	41
4.3. ELECTROFORESIS	41
4.3.1. Preparación del material biológico	41

4.3.2. Corrida electroforética	42
4.3.3. Visualización de los sistemas enzimáticos	45
4.3.3.1. Tinción para Malato Deshidrogenasa (<i>MDH</i>)	45
4.3.3.2. Tinción para Alanina Deshidrogenasa (<i>ADH</i>)	46
4.3.3.3. Tinción para Carboxilesterasa (<i>EST</i>)	46
4.3.3.4. Tinción para Fosfatasa Alcalina (<i>PA</i>)	47
4.3.3.5. Tinción para Glutamato Deshidrogenasa (<i>GDH</i>)	47
4.3.3.6. Tinción para Amilasa (<i>AMI</i>)	48
4.3.3.7. Tinción para Peroxidasa (<i>PER</i>)	48
4.3.3.8. Tinción para Lactato Deshidrogenasa (<i>MDH</i>)	49
4.4. ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS GENÉTICOS	49
4.4.1. Frecuencias alélicas para cada loci por población	50
4.4.2. Número promedio de alelos por locus (<i>A</i>)	50
4.4.3. Polimorfismo	50
4.4.4. Los valores de heterocigosidad esperada (<i>H_{exp.}</i>) y corregida (<i>H_{n.b.}</i>).	50
4.4.5. El estadístico índice de fijación de Wright según adecuación Weir y Cockerhan (1984)	51
4.4.6. Distancia genética de Nei (1978)	51
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5.1. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	52
5.2. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	53
5.2.1. Movilidades electroforéticas de los sistemas enzimáticos	53
5.3. ESTIMACIÓN DE ÍNDICES GENÉTICOS	56

5.3.1. Variabilidad genética	56
5.3.2. Diversidad genética	58
5.3.2.1. Frecuencias alélicas	58
5.3.2.2. Polimorfismo o tasa de polimorfismo Pj	60
5.3.2.3. Heterocigosidad	62
5.3.2.4. Índice de fijación de Wright	64
5.3.2.5. Distancias genéticas de Nei (1978)	66
6. CONCLUSIONES	69
7. RECOMENDACIONES	70
BIBLIOGRAFIA	71
ANEXOS	77

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Tinción de MDH	46
Esquema 2. Tinción de ADH	46
Esquema 3. Tinción de Carboxilesterasa	47
Esquema 4. Tinción de Fosfatasa alcalina	47
Esquema 5. Tinción de GDH	48
Esquema 6. Tinción de Amilasa	48
Esquema 7. Tinción de peroxidasas	49
Esquema 8. Tinción de LDH	49
Gráfica 1. Número total de alelos por locus para las poblaciones naturales y de cultivo.	57

LISTA DE TABLAS

Página

- Tabla No. 1. Estadios larvales, forma de Alimentación y Comportamiento.
- Tabla No. 2. Sitios de muestreo y número de individuos.
- Tabla No. 3. Clasificación, características y condiciones de corrida de los sistemas enzimáticos estudiados.
- Tabla No. 4. Promedios de peso y talla de poblaciones naturales y de cultivo.
- Tabla No. 5. Frecuencias alélicas bajo la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg¹ ($H_{exp.}$) y heterocigosidades corregidas para la inclinación de muestreo ($H_{n.b}$)
- Tabla No. 6. Valores de heterocigosidad y polimorfismo de las poblaciones estudiadas en camarones *Litopenaeus vannamei* de la costa Nariñense
- Tabla No. 7. Estimados de índice de diferenciación (F_{st}) por pares de poblaciones (sobre la diagonal) y flujo genético (Nem) (bajo la diagonal) para las poblaciones de *L. vannamei* estudiadas, con base en 8 loci aloenzimáticos.
- Tabla No. 8. Estimados de índice de diferenciación (F_{st}) por pares de poblaciones (sobre la diagonal) y flujo genético (Nem) (bajo la diagonal) para las poblaciones de *L. vannamei* estudiadas, con base en 8 loci aloenzimáticos.
- Tabla No. 9. Distancias genéticas de Nei 1978, entre pares de poblaciones de camarón blanco *L. vannamei* de la región pacífica nariñense.

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura No. 1. Camarón blanco *Litopenaeus vannamei*
- Figura No. 2. Ciclo vital de un camarón peneido
- Figura No. 3. Ubicación geográfica de la zona de muestreo de la población natural y de cultivo del camarón *L. vannamei*.
- Figuro No. 4 Cámara y fuente utilizados en la electroforesis de proteínas.
- Figura No. 5. Diagrama de preparación de los geles de poliacrilamida.
- Figura No. 6 Actividad enzimática de Malato Deshidrogenasa en hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* en geles de poliacrilamida
- Figura No. 7. Actividad enzimática de alanina deshidrogenasa en hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* en geles de poliacrilamida.
- Figura No. 8. Actividad enzimática de Esterasa en músculo de *Litopenaeus vannamei* en geles de poliacrilamida
- Figura No. 9. Actividad enzimática de Fosfatasa alcalina en músculo de *Litopenaeus vannamei* en geles de poliacrilamida.
- Figura No. 10. Actividad enzimática de glutamato deshidrogenasa en músculo de *Litopenaeus vannamei* en geles de poliacrilamida.
- Figura No. 11. Actividad enzimática de Amilasa en músculo de *Litopenaeus vannamei* en geles de poliacrilamida
- Figura No. 12. Actividad enzimática de Peroxidasa en músculo de *Litopenaeus vannamei* en geles de poliacrilamida.
- Figura No. 13. Actividad enzimática de lactato deshidrogenasa en músculo de *Litopenaeus vannamei* en geles de poliacrilamida
- Figura No. 14. Dendrograma que relaciona los Valores de distancia genética de Nei (1978), calculados sobre la base de 8 loci enzimáticos en la especie de *L. vannamei* según el método UPGMA.

LISTA DE ANEXOS

Página

Anexo A. pesos y tallas de las muestras de camarón *L. vannamei* de poblaciones naturales de la costa Pacífica de Nariño.

Anexo B pesos y tallas de las muestras de camarón *L. vannamei* de poblaciones de cultivo de la región de Tumaco.

Anexo C. pesos y tallas ponderadas de las muestras de camarón *L. vannamei* de poblaciones naturales de la costa Pacífica de Nariño.

Anexo D. Matriz de alelos para las Poblaciones Naturales y de cultivo

ABREVIATURAS

ADN. Ácido desoxiribonucleico

ALD. Alanina Deshidrogenasa

ALP. Fosfatasa Alcalina.

AMI. Amilasa

EST. Carboxilesterasa

Fst. Grado de diferenciación genética entre poblaciones en función de las frecuencias alélicas

GDH. Glutamato Deshidrogenasa

Hexp. Heterocigosidad esperada bajo la hipótesis de equilibrio de Hardy – Weinberg

Hn.b. Heterocigosidad corregida para la inclinación de muestreo

ISSRs. Inter – secuencias repetitivas simples

LDH. Lactato Deshidrogenasa

MDH. Malato Deshidrogenasa

MLEE. Electroforesis de aloenzimas multilocus

MTT. Dimetiltiazol tetrazolio

NAD. α – Nicotinamida adenina dinucleótido

PA. Persulfato de amonio

PAGE. Electroforesis en gel de poliacrilamida

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

PER. Peroxidasa

Pj. Polimorfismo o tasa de polimorfismo

PMS. Metosulfato de fenazina

RAPD. Amplificación al azar de *ADN* polimórfico

RFLP. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

TEMED. N, N, N', N', - Tetrametil etilendiamina

GLOSARIO

Aloenzimas. Empleado para referirse a las distintas formas moleculares de una misma enzima producida por los distintos alelos de un mismo *locus*.

Alelo. Una de dos o más formas alternativas de un gen, cada uno con una secuencia de nucleótidos única. El término es usado también para denotar las variantes de los marcadores moleculares genéticos codominantes como las aloenzimas.

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

Electroforesis. Migración a distinta velocidad, de moléculas cargadas en solución debido a la aplicación de un campo eléctrico.

Fenotipo. Descripción de todos los caracteres de un individuo respecto a su morfología, fisiología, relaciones ecológicas y comportamiento.

Flujo génico. 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. Unidad hereditaria que contiene información genética (*ADN*) que es transcrita a *ARN* y traducida a una cadena polipeptídica (proteína). En el genoma de un organismo, una secuencia de nucleótidos a la que se le puede asignar una función específica.

Genética. Rama de la Biología en la que se estudia la herencia y variación de los caracteres, así como la estructura y función del material genético (*ADN*)

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 moleculares, 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.

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 aún cuando no se conozca el lugar en el genoma.

Loci. Plural de *locus*.

Marcador molecular. Genes, proteínas o fragmentos de *ADN* polimórficos que permiten distinguir entre individuos, familias, poblaciones o especies.

Población. Grupo de organismos de la misma especie que habitan en una determinada área geográfica y que por ende se entrecruzan y comparten un acervo común de genes.

Polimorfismo. Ocurrencia de diferentes variantes alélicas para un *locus* específico para una población. Se considera que un *locus* será polimórfico cuando en la muestra poblacional la frecuencia del alelo más común no rebase el 95%.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del camarón ha tenido un gran éxito comercial durante los últimos 20 años a nivel mundial, llegando a nivelarse con la producción de la pesca extractiva que se ha estancado por los altos costos de las faenas de pesca. La camaronicultura es una industria bien establecida en muchos países tropicales de Asia y América. Entre 1999 y 2007 la producción mundial de camarón de cultivo se dobló de aproximadamente un millón de toneladas métricas a dos millones, que representa el 54% de toda la producción mundial¹. Países como Tailandia, Indonesia, Vietnam, China, India, Ecuador, México, Perú y Panamá han reforzado su producción camaronera tanto para consumo interno como para exportación².

De acuerdo a los reportes de ACUANAL, en el año 2007, 22.400 toneladas métricas de camarón blanco con destino a la unión Europea, para el año 2008 Colombia exportó 19.292 toneladas métricas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), de las cuales el 38% se produjeron en el primer semestre y el 62% en el segundo semestre; el departamento de Nariño para este año reportó una producción total de 235 toneladas y para el año 2009 un total de 499 toneladas; como único departamento productor de camarón en el pacífico Colombiano. (Fuente: ENA, 2008; cadena acuícola – ACUANAL, 2008).

El desarrollo de la camaronicultura ha dado lugar a nuevas problemáticas, como las enfermedades bacterianas y virales que han diezmando la industria del camarón³, las importantes para la región de las Américas, en términos de impacto económico, son de origen infeccioso causado por virus tales como la enfermedad de la mancha blanca y amarilla, síndrome de Taura – TSV que en *Litopenaeus vannamei* causó mortalidades superiores al 70%⁴ y en menor grado la enfermedad denominada Necrosis hipodérmica hematopoyética, las cuales le han ocasionado a la industria camaronera pérdidas en los cultivos, empleos e ingresos por exportaciones.

Las sucesivas generaciones de la cría en cautiverio, las diversas actividades humanas y eventos naturales que han afectado los ecosistemas naturales;⁵ han

¹ ROSENBERRY, B. World Shrimp Farming 2004. Shrimp news international.

² MARTINEZ, COVALENA, H. La cadena de camarón de cultivo en Colombia. Bogotá, 2005, pp 5 – 6

³ HASSON, K., LIGHTNER, V., POULOS, T., REDMAN, M., WHITE, L., BROCK, J. Y BONAMI, J. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. Diseases of Aquatic Organisms, (1995), pp 23, 115-126.

⁴ ALONSO, B.M., JOO, L. Y ESPINOSA, G. Análisis Electroforético y caracterización bioquímica de las esterasas del músculo en *Penaeus notialis* y *Penaeus schmitti*. 1987, pp 21, 74.

⁵ SBORDONI, V., DE MATTHAIES, M., COBOLLI, G., LA ROSA, G. Y MATTOCIA, M. Genetics changes in seven generations of hatchery stock of the kumura prawn *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). Selec. Hybr. and Genet. Engin. In Aquac. (1987), pp 1, 143-155.

provocado La disminución de la variabilidad genética de las poblaciones, además en muchas regiones, la captura de lotes silvestres en muchas especies acuáticas, incluyendo los camarones peneidos, está por encima de los máximos rendimientos sostenibles, hechos que han ocasionado la destrucción de los hábitats naturales, demostrando la vulnerabilidad de esta industria. Por tanto la necesidad y oportunidad para el mejoramiento genético para estas especies son considerables.

Los estudios genéticos tienen una gran importancia en la industria del camarón, para determinar el nivel de variabilidad genética de las poblaciones tanto naturales como de cultivo, y establecer el momento de enriquecer estas últimas con nuevos ejemplares^{6,7}.

De igual manera, es importante conocer la estructura de la población natural de donde se tomarán éstos ejemplares y disponer de los marcadores indicados que permitan realizar el estudio de las poblaciones y familias⁸.

En la Costa Pacífica Colombiana se han encontrado varias especies del camarón marino del género *Litopenaeus* (camarón blanco), *Xiphopenaeus* (camarón tití), *Protrachypene* (camarón pomadilla) y *Trachypenaeus* (camarón tigre), siendo los camarones blancos los más apreciados por su alto valor en el mercado. Entre los camarones blancos se consideran los géneros *L. stylirostris*, *L. vannamei*, *L. occidentalis*, *L. californiense*, siendo más abundante *L. vannamei* en la región de Tumaco; la cual presenta excelentes características de manejo en los procesos de cultivo en cautiverio y además existe escaso conocimiento sobre la estructura genética de sus poblaciones.

En el presente trabajo se planteó ampliar el conocimiento que se tiene sobre los parámetros genéticos para el camarón *Litopenaeus vannamei* en la región del litoral pacífico nariñense (Tumaco), tanto en poblaciones naturales como en las poblaciones de cultivo, lo cual se realizó mediante la Técnica de Electroforesis de Aloenzimas Multilocus (MLEE), técnica que ha sido muy utilizada en estudios de caracterización y variabilidad genética de muchas especies.⁹ La mayoría de los análisis desarrollados en peneidos han sido documentados utilizando aloenzimas, de esta forma, las aloenzimas pueden utilizarse como marcadores genéticos de individuos y poblaciones, y sirven de herramienta para el estudio de la estructura genética de las poblaciones de camarones.

⁶ LIGHTNER, D. V. Disease of cultured penaid shrimp. In Crustacean Acuaculture . Boca Ratón, Florida. 1992, pp 289, 540.

⁷ GARCIA, D.K., FAGGART, M.A., RHOADES, L. y ALCÍVAR-WARREN A. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. 1994. pp 270, 349.

⁸ DAVIS, D.J. Electroforesis parte II. Ann N. Y. Academia Sci 1964, pp 121, 402, 687.

⁹ WARD, R Y GREWE, P. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. Molecular Genetics in Fisheries. Chapman and Hall, edits. London. 1995, pp 29, 346.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar bioquímicamente las poblaciones naturales y cautivas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de la Costa Pacífica Nariñense determinando la variabilidad genética mediante la técnica de electroforesis de Aloenzimas Multilocus (MLEE)

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Estandarizar la técnica de Electroforesis de Aloenzimas Multilocus en poliacrilamida para ocho sistemas *loci* enzimáticos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Estimar los índices genéticos básicos de las poblaciones naturales y cautivas a partir de los datos suministrados por la técnica MLEE.

Realizar un estudio comparativo de la variabilidad genética presente entre las poblaciones naturales de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* entre éstas y las cautivas con los diferentes sistemas *loci* enzimáticos estudiados.

2. ANTECEDENTES

La electroforesis de proteínas se ha utilizado mucho en estudios de caracterización de variabilidad genética de muchas especies de animales y permite obtener estimaciones de las frecuencias génicas. La aplicación de esta técnica conllevó al desarrollo de la metodología de la electroforesis de aloenzimas multilocus (MLEE), que rápidamente se utilizó de forma estandarizada en los estudios de genética de poblaciones.

Los primeros estudios acerca de la estructura poblacional de las especies de peneidos se realizaron sobre la base del polimorfismo aloenzimático, evidenciando bajos niveles de diversidad genética y de subdivisión poblacional a grandes escalas geográficas (Lester, 1979; Mulley y Latter, 1981). El análisis de estos marcadores, de manera general, dio lugar a que se considerara las poblaciones de las especies estudiadas como un grupo indiferenciado a lo largo de su área de distribución^{10 11 12}.

Awise y Queller, utilizaron la electroforesis de proteínas en estudios intraespecíficos de poblaciones y de especies estrechamente relacionadas. Richardson, et al¹³, utilizaron esta técnica para determinar si los individuos de una muestra son sacados de una gran población apareada al azar con frecuencias genotípicas en equilibrio, o si comprende una reunión de muestras de unidades distintas genéticamente.

Algunos estudios realizados en poblaciones de camarón han mostrado resultados discrepantes en cuanto a variabilidad y diferenciación genética. Una buena cantidad de trabajos se basan en la técnica de aloenzimas en los cuales se ha observado en general bajos niveles de variación genética. Dentro de las especies estudiadas se encuentran: *Farfantepenaeus aztecus*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Farfantepenaeus duorarum*, *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Litopenaeus schmitti*, *Litopenaeus vannamei*, *Farfantepenaeus californiensis* y *L. stylirostris*.^{14 15 16 17 18}

¹⁰ LESTER, L.J. Population genetics of Peneids shrimps from de Gulf of México. J. Hered. 1979, pp 175, 480.

¹¹ GARCIA, D.K., FAGAR, M.A., RHOADES, L. y ALCÍVAR-WARREN A. Op.cit, pp 340.

¹² KING, J.D Y OHTA, T.H. Polyallelic mutational equilibrium. Genetics. 1975, pp 79, 215

¹³ RICHARDSON, B.U., BAVERSTOCK, P.R. Y ADAMS, M. A handbook for animal systematics and population studies. Academic Press. New York. 1986, pp 87, 258.

¹⁴ TAM, Y.K, Y CHU, K.H. Eletrophoretic study on the phylogenetic relation shirimps of some species of *Penaeus* and *metaPenaeus* from the south China sea. Journal crustacea biology. 1993, pp 697,705.

¹⁵ LESTER, L.J Y PANTE M.J. Genetcs of *Penaeus* species. 1992, pp 29, 152.

¹⁶ MULLER, J.C Y LATER, B.D. Genetic variation and evolutionary relation shrimps within a group of thirty species of *Penaeid* prawns. 1980, pp 904, 1916.

Los trabajos de electroforesis en camarones, han sido importantes, para evaluar la variabilidad genética de las poblaciones y se han constituido en una herramienta muy importante en trabajos de mejoramiento genético en el desarrollo de la camaronicultura. Sin embargo, al evaluar el grado de variabilidad genética en el género *Litopenaeus* con aloenzimas, se demuestra que este ha sido bajo tanto en estudios intra como interespecíficos. Los bajos niveles de polimorfismo mostrados por las aloenzimas, han llevado a los autores a utilizar técnicas como RFLP, RAPD y en los últimos años marcadores mini y microsátélites para abordar la genética poblacional de los peneidos.

Estas secuencias presentan una serie de características que las hacen muy atractivas para los estudios poblacionales: son altamente polimórficas, están distribuidas por todo el genoma, son codominantes y, de forma general, selectivamente neutrales. Se han descrito numerosos *loci* microsátélites para diferentes especies de peneidos (García 1994, 1996; Bagshaw 1997; Wolfus 1997; Espinosa 2001 y Cruz 2002), sin embargo, solo unos pocos han resultado útiles para el estudio genético de sus poblaciones. Los resultados obtenidos del análisis de los *loci* microsátélites han mostrado disímiles patrones de diferenciación, corroborando en algunos casos los generados por las aloenzimas (Benzie, 2000; Borrell et al. 2004). La electroforesis de proteínas sigue siendo una técnica muy importante en el estudio de variabilidad genética y caracterización de poblaciones, principalmente por su rapidez y bajo costo,¹⁹ pero especialmente porque analiza la estructura fenotípica del organismo que son sus proteínas.

Para garantizar un mayor desarrollo tecnológico y mejorar los niveles de productividad, control de calidad y prevención de enfermedades de las especies acuícolas, en 1993 se construyó en Cartagena la corporación Centro de Investigación de Acuicultura Colombiana, CENIACUA, entidad mixta con el apoyo y recursos del sector privado y del presupuesto nacional a través del Inpa y Colciencias, CENIACUA cuenta con un Programa de Mejoramiento Genético de que se inició en 1997 con la Asesoría de AKVAFORSK Genetic Center. El objetivo de este programa es la producción de camarones con mayores tasas de crecimiento y resistencia a enfermedades mediante selección familiar e individual con el fin de incrementar la competitividad y productividad del sector camaronicultor Colombiano; allí se ha establecido un centro de semillas mejoradas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* que surte a varios países de

¹⁷ ESPINOSA, G.U., BECKER, U., BORELL, Y., ROMO, J., DIAZ, R., AZANZA, J. Y DE DIOS, R. Variación genética y morfológica en poblaciones naturales y cautivas de camarón blanco *Litopenaeus schimitti* en Cuba. 2002, pp 778, 984.

¹⁸ DE LA ROSA-VELEZ, J., ESCOBAR-FERNANDEZ, R. CORREA, F. Genetic structure of two commercial *Penaeids* from the gulf of California, as revealed by allozyme variation. 2000, pp 674, 883.

¹⁹ WARD, R Y GREWE, P. Op. Cit. pp. 213

Latinoamérica, sin embargo los estudios a nivel del pacífico Colombiano continúan teniendo una deficiencia considerable.²⁰

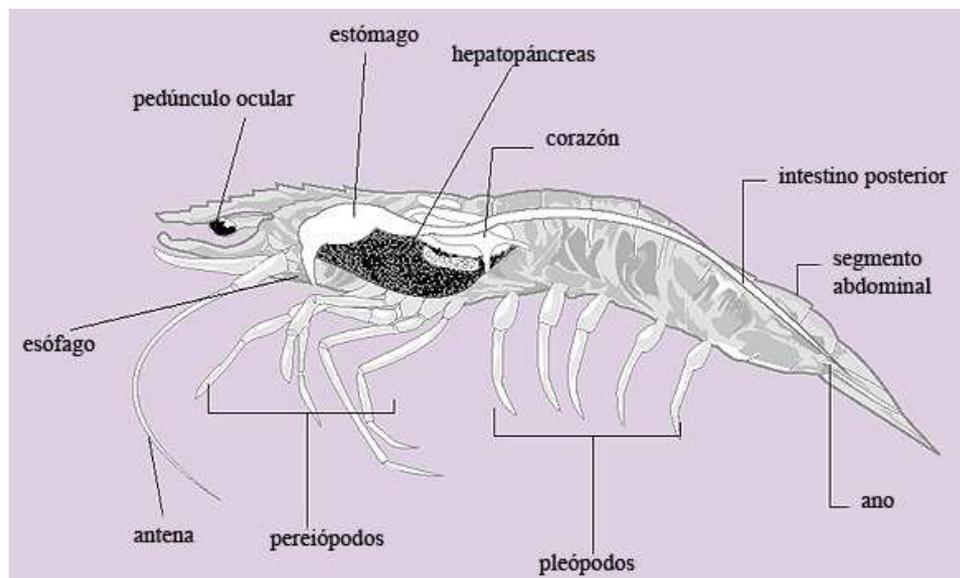
²⁰ COLCIENCIAS. Agenda y novedades. www.Colciencias.Com. Septiembre 18 del 2003.

3. MARCO TEORICO

3.1 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 Peneidos²¹ y según Perez-Farfante y Kensley²² pertenece al género *Litopenaeus*, el cual lo describen 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.

Figura N° 1. Camarón blanco *Litopenaeus vannamei*²³



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

²¹ ALVARADO. R, COVEL. C, FRIEDEL. H Y RINGUELET, R. Enciclopedia El mundo de los animales. Madrid. 1989, pp 129.

²² PEREZ-FARFANTE, I. Y KENSLEY, B. *Penaeoids and Sengestoid* shrimp and prawns of the World. Keys and diagnoses for the families and genera. Leiden: universal books services, 1997, pp 157

²³ ALVARADO. R, COVEL. C, FRIEDEL. H Y RINGUELET, R Op. Cit. pp. 9, 118

salinidad, copulan en aguas estuarinas o generalmente en aguas de poca profundidad, durante la madrugada.²⁴

La especie *Litopenaeus 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. Se lo encuentra en aguas costeras en profundidades desde 0 hasta 72 metros, en fondos fangosos, en aguas estuarinas en las etapas de postlarva y/o juveniles, y en aguas marinas en su vida adulta²⁵.

3.1.1 Ciclo vital: La maduración y reproducción de esta especie se realiza en aguas profundas, entre 15 y 60 m; las hembras fecundadas ponen huevos en cantidades variables (entre 150.000 y 1.000.000). Al cabo de un tiempo, estos eclosionan en una serie de estadios denominados larvales, cada uno de los cuales tiene características morfológicas determinadas y diferentes requerimientos nutricionales (Tabla N° 1).

Tabla N° 1. Estadios larvales, forma de Alimentación y Comportamiento.

ESTADÍO	ALIMENTACION PRINCIPAL	COMPORTAMIENTO
Huevo	_____	Flota, tendencia a depositarse en el fondo
Nauplios	Sus propias reservas	Locomoción por antenas, planctónicas
Protozoa	Filoplancton	Planctónicas, natación por apéndices cefálicos
Mysis	Zooplancton	Planctónicas, natación por apéndices del tórax
Postlarvas	Zooplancton y posteriormente alimentación omnívora	Los primeros estadios son planctónicos, luego de hábitos bentónicos, natación por pleópodos

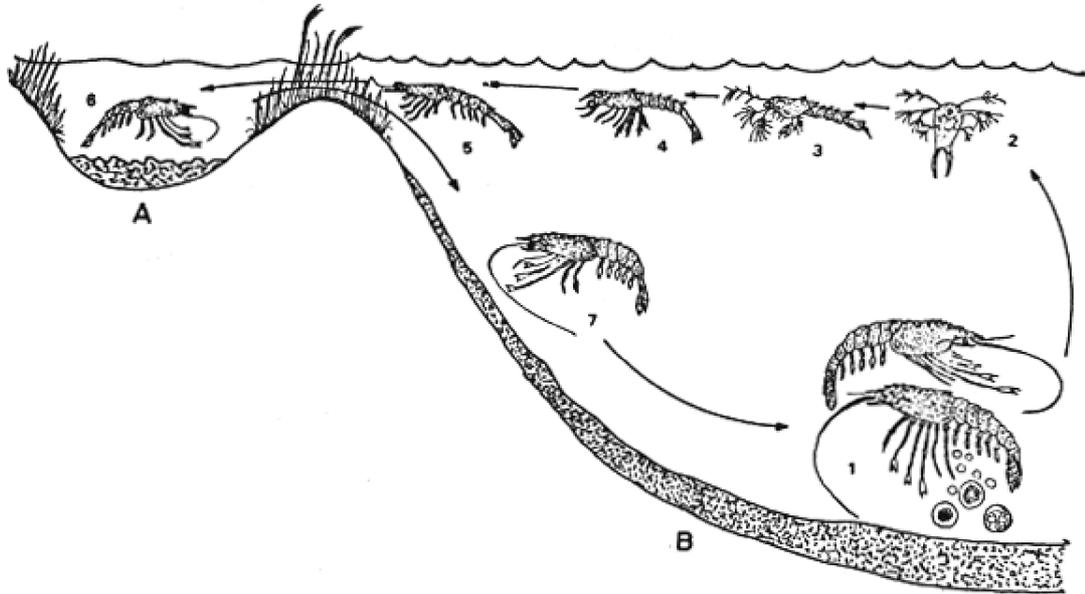
En la etapa de postlarvas tienen tallas entre 6 y 14 mm de longitud total, las postlarvas pasan a formar parte del bentos de las zonas litorales, alcanzando muy rápido el estado juvenil, e iniciando así la salida a las zonas de pesca, donde llegan a la edad de reproducción, para iniciar nuevamente su ciclo (Figura N° 2). La mayoría de los camarones de este género en las zonas de reproducción, son menores de un año de edad.²⁶

²⁴ FENUCCI J. Manual para la Cria de Camarones Peneidos Depósitos de documentos de la FAO.1988

²⁵ Ibid., pp. 25.

²⁶ Ibid., p. 26.

Figura N° 2. Ciclo vital de un camarón peneido: 1. maduración y reproducción; 2. nauplio; 3. protozoeas; 4. mysis; 5. postlarvas; 6. juveniles; 7. adultos. (Modificado de Boschi, 1977)²⁷.



3.2. CAMARÓN DE CULTIVO.

Los camarones se crían en grandes estanques, de por lo menos un metro de profundidad, y los diques se construyen a mano o empleando maquinaria de excavación. El sitio suele estar situado en un estuario o cerca de la costa, para asegurar una fuente cercana de agua salada. Un estanque de camaronicultura puede situarse sobre planicies salinas costeras o en sitios excavados luego de talar artificialmente un manglar²⁸.

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-larvas. Ocurre en un laboratorio que utiliza tanques de 8 a 15 toneladas de capacidad, donde se siembran de 80 a 150 nauplios por litro de agua de mar, con una sobrevivencia entre 50% y 70%.²⁹

²⁷ BOSCHI, E.E., M.A. SCELZO Y B. GOLDSTEIN. Desarrollo larval de dos especies de crustáceos Decápodos en el laboratorio *Pachycheles haigae* Rodrigues Da Costa (Porcellanidae) y *Chasmagnathus granulata* Dana (Grapsidae). Bol. Inst. Biol. Marina, Mar del Plata, 1967, pp 57 – 61.

²⁸ AGUILERA MARÍA. Los Cultivos de Camarones en la Costa Caribe Colombiana. Cartagena, 1998, pp 22.

²⁹ LIGHTNER, D. V. Op. Cit. p. 167.

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 en 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, consume básicamente microalgas. La siguiente fase es la mysis que tiene tres subestadios, dura aproximadamente cuatro días, son herbívoros y carnívoros ya que se alimentan con algas y con animales más pequeños que ellos, principalmente de artemia salina. Finalmente aparece la post-larva, forma a partir de la cual el animal ya no se transforma sino solamente crece.

El proceso de engorde comprende el crecimiento del camarón hasta llegar al tamaño comercial que es de 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 climáticas³⁰.

Entre las principales industrias camaroneras Colombianas se puede mencionar AGROCALAO Ltda (Itaguí Antioquia); AGROMARINA Y BALBOA TUMACO Ltda., AGROSOLEDAD S.A (Cartagena); AGROTIJOS S.A, AQUACULTIVOS DEL CARIBE S.A , ACUACULTURA DEL MAR "AQUAMAR S.A", CARTAGENA DE ACUACULTURA S.A, VIKINGO DE COLOMBIA S.A, POST-LARVAS DEL PACIFICO, PRODUMAR³¹.

3.3 ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA POBLACIONAL

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.³² 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. Por ello, estos estudios tratan de explicar cuáles son los mecanismos por los cuales evoluciona una especie, y de responder a cuestiones específicas sobre la historia particular de esa especie y de sus poblaciones³³.

Dentro de una determinada especie no existe una absoluta homogeneidad genética, sino que distintas poblaciones de una misma especie pueden presentar

³⁰ INSTITUTO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA –INPA-Camarón de cultivo.2000.

³¹ COLCIENCIAS. Op. Cit. pp. 29

³² VÁZQUEZ, A. Ecología y Formación Ambiental. 1993., pp 64, 211.

³³ HARTL, D.L Y CLARK, A.G.. Principles of Population Genetics. Associates, Massachusetts.1997, pp 110.

ligeras diferencias genéticas. Los cambios en la composición genética de las poblaciones son debidos 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.

Las variantes genéticas generadas por los procesos de mutación, recombinación, migración y deriva genética pueden aumentar o disminuir de 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.^{34, 35}

Desde los inicios del estudio de la genética de poblaciones se ha constatado la existencia de una gran variación genética en las poblaciones naturales. En un principio, esta variabilidad genética se observó, principalmente, estudiando caracteres morfológicos (variabilidad de forma, tamaño, etc.) y citológicos (polimorfismos por inversiones, translocaciones, etc.). Las primeras aproximaciones experimentales llegaron con los trabajos de selección de mutantes, que confirmaban la presencia de variación genética en las poblaciones. Sin embargo, mediante este tipo de experimentos no era posible cuantificar de una manera precisa la proporción de variabilidad genética existente. Se observaban los distintos fenotipos pero no se podía saber cuales eran las frecuencias génicas de cada uno de ellos. Otra importante limitación de estos estudios era el desconocimiento de la importancia relativa de los *loci* invariantes, ya que únicamente se detectaban los *loci* polimórficos, los que representaban variación genética. Al no conocerse la relación de los *loci* polimórficos respecto de monomórficos era imposible una cuantificación correcta de la variabilidad genética.^{36,37}

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 un stock 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 stock cultivado.

³⁴ STURTEVANT, A.H.A. History of Genetic. 2001, pp 187, 690.

³⁵ HARTL Y CLARK. Op. Cit. pp. 115.

³⁶ RYMAN, N. Genetic Population Structure. 1997, pp 210, 538.

³⁷ STURTEVANT, A.H.A. Op. Cit. pp. 136

El deterioro genético aumenta con la disminución del tamaño poblacional y ocurre principalmente por dos causas: endogamia y deriva génica³⁸. Hartl y Clark³⁹ definen la diversidad o variabilidad genética como “la variedad de diferentes genes en una población reproductiva, dentro de una especie o dentro de todas las especies encontradas en un área dada” y por ende, la capacidad 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. Al evaluar esta variabilidad a través de estudios de poblaciones silvestres se ha llegado a la caracterización e identificación de grupos base para especies que tienen una importancia comercial, determinando la presencia de stock de poblaciones con los cuales se pueden crear esquemas de manejo del recurso y mejorar a largo plazo la sostenibilidad⁴⁰.

Estos estudios de poblaciones de animales son una herramienta útil para los programas de conservación, que en los últimos años han tomado un gran auge. La importancia de la biodiversidad y su conservación quedó patente a partir de la cumbre de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo realizada en Río de Janeiro en 2002. La pérdida de diversidad genética merma nuestra capacidad para mantener y mejorar la producción pecuaria y reduce la aptitud para hacer frente a nuevas condiciones ambientales. Adicionalmente, el monitoreo de la diversidad genética es esencial para poder mejorar los programas de selección con el fin de mostrar que tan bien las poblaciones domésticas representan las variaciones naturales de las especies. Los datos de diversidad genética pueden proveer información a cerca de alelos raros, decrecimiento de la heterocigosidad e incremento en los niveles de entrecruzamiento dentro de los programas de cría^{41,42}.

En algunos países, las poblaciones silvestres de camarón han sido afectadas por la explotación pesquera, la actividad camaronera y eventos naturales. En estudios realizados se ha observado la disminución de la población de reproductores de camarón. También se ha encontrado que fenómenos como “la Niña” están relacionados con dicha disminución, desestabilizando las poblaciones naturales de camarón. Lo anterior, unido a la incidencia de enfermedades en animales de cultivo, conduce a la necesidad de establecer una industria más estable desde el punto de vista productivo, por lo cual se ha impulsado la implementación de programas de mejoramiento genético en camarón⁴³.

³⁸ LABASENA, M.E., TORRES, M. Y ESPINOSA, G. Variabilidad y distancia genética en especie de *Penaeus*. Revista de investigación. Vol 1. Marzo 15. 1994, pp 36, 60.

³⁹ HARTL, D.L., y CLARK A.G. Op cit. pp. 201.

⁴⁰ PHILIPP, D.P., J.M. EPIFANIA, y M.J.. Point/counterpoint: conservation genetics and current stocking practices- are they compatible? Aquatic Fisheries Sciences. 1993, pp 15, 369.

⁴¹ SUNDEN, S.L.Y DAVIS, S.K. Evaluation of genetics in a domestic population of *Penaeus Vannamei* (Boone): A comparison with three natural populations. Aquaculture. 1991, pp 131, 772.

⁴² LESTER. J. L. Op. Cit. pp. 35

⁴³ LIGHTNER, D. V. Op. Cit. pp. 230

Para lograr un programa genético con buenas probabilidades de éxito es necesario generar una estructura genética y una variabilidad amplia en las poblaciones base de selección. La implementación de programas adecuados permitiría desarrollar stocks domésticos libres de enfermedades o resistente a ellas^{44,45}. Para ello es necesario tener poblaciones stock de animales silvestres, cuya caracterización en cuanto a variabilidad y estructura genética sea conocida y así poder tener material disponible para aumentar variabilidad genética en el caso que se encuentre una disminución de ésta durante el programa de mejoramiento. Además, la caracterización y determinación de la estructura de los camarones silvestres apoyaría el sector pesquero, al crear programas de optimización del recurso al identificar poblaciones y optimizar el recurso.

3.4 MARCADORES GENÉTICOS

A mediados del siglo XX surge el concepto de marcador genético para aquellos caracteres hereditarios que permiten diferenciar a un individuo de otro, los que pueden ser expresados como un rasgo físico o por diferencias demostrables en algunos de los constituyentes del organismo (enzimas y proteínas). La variabilidad genética puede estimarse aplicando diferentes técnicas con marcadores moleculares tanto con enzimas como con ADN.

Todo marcador genético es controlado por un gen localizado en un cromosoma determinado. Los genes se sitúan a lo largo del cromosoma en un orden lineal, donde cada uno ocupa una posición conocida como su “*locus*”, y las formas alternativas que se presenten para cada gen en un mismo *locus* se denominan alelos. Para organismos diploides cada cromosoma contiene solo un alelo para cada *locus* particular, por lo que solamente dos alelos podrán estar involucrados en la formación de una característica específica en un organismo: uno proveniente del cromosoma materno y el otro aportado por el cromosoma paterno⁴⁶. Cuando el individuo presenta el mismo alelo se considera homocigoto para ese carácter, mientras que cuando son diferentes es considerado heterocigoto.

Los atributos ideales de un marcador son:

a. Polimorfismo: ‘La 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.

⁴⁴ WYBAN, J.A., J.S. SWINGLE, J.N. SWEENEY, y G.D. Specific pathogen-free *Penaeus vannamei*. 1993, pp 39, 145.

⁴⁵ CARR. W.K, FJALESTAD, D. GODIN, J. SWINGLE, J. SWEENEY, y GJEDREM, T. Genetic variation in weight and survival in a population of specific pathogen-free shrimp. 1996, pp 114, 526.

⁴⁶ THOMPSON, J. S Y THOMPSON, M. W. Genética Médica. 1975, 36, 1120.

b. Herencia mendeliana: Es la transmisión de características hereditarias que ocurre en fundamental acuerdo con las leyes formuladas por Mendel (1822-84).

c. Insensibilidad a la influencia y efectos ambientales.

d. 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

e. Simplicidad en la identificación y análisis.

En ocasiones, el uso de marcadores permite seleccionar los individuos aun antes de que expresen el rasgo de interés; los marcadores son zonas del genoma cuya posición se conoce con exactitud. A veces los individuos de una población que tienen alguna variante de estos marcadores presentan también una producción superior de algún determinado carácter. La idea de la selección asistida por marcadores (MAS) consiste en determinar en una población seleccionada cuáles de ellos están asociados a caracteres productivos, y utilizar esta información junto a la información fenotípica para seleccionar. Gracias al empleo de marcadores ha sido posible mejorar muchas especies que son la base de la alimentación a nivel mundial⁴⁷.

Los métodos moleculares han sido parte esencial de las herramientas de la Biología Evolutiva, para conseguir deducciones sobre la descendencia. Para estudios recientes de poblaciones o de parentesco, se han usado una gran variedad de marcadores de segregación genética: aloenzimas, RFLP, (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), ADN mitocondrial, multilocus y *locus* simples minisatélites, RAPD (amplificación al azar de DNA polimórfico), SSR; MP - PCR (*loci* microsatélites o secuencias simples repetidas), AFLPs (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados) y RAMs (microsatélites amplificados al azar). La calidad de información que brindan los marcadores genéticos, depende de cómo los productos pueden ser marcados consistente y objetivamente, de cómo reflejan la variación genética y de si son representativos. El primer requerimiento es que las bandas que aparezcan en una electroforesis deben ser marcadas consistentemente y puedan ser comparables⁴⁸.

⁴⁷ NUEZ, F. Y CARRILLO, J.M.. Los Marcadores Genéticos en el Mejoramiento Vegetal Y Animal. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 2000, pp 45

⁴⁸ QUELLER, D.C., STRASSMAN J.E. y HUGHES C.R. Microsatellites and kinship. Elsevier Science publishers. Ltda. 1993, pp 21.

3.5 ELECTROFORESIS DE ALOENZIMAS.

La electroforesis es la migración a distinta velocidad, de moléculas cargadas en solución debido a la aplicación de un campo eléctrico. La técnica de electroforesis de proteínas detecta las variaciones en la secuencia de aminoácidos que afectan a la movilidad electroforética de enzimas metabólicas; se basa en someter a electroforesis, en condiciones no desnaturizantes, los extractos crudos citoplasmáticos de los individuos a estudiar, y seguidamente, teñir los geles para detectar la actividad enzimática de una única proteína⁴⁹.

Las aloenzimas, no son más que las formas o variantes alélicas de una enzima producto de un mismo locus y que pueden ser distinguidas por electroforesis. El proceso de electroforesis de aloenzimas comienza con la separación de estas en un campo eléctrico en un medio sólido, ya sea un gel de almidón, acetato de celulosa o acrilamida de acuerdo al tamaño y forma de las mismas. La técnica electroforética más utilizada por los bioquímicos es la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) la cual requiere de un equipo simple y relativamente no muy costoso y permite separar mezclas complejas⁵⁰. El revelado de las aloenzimas puede ser por medio de una tinción histoquímica especial para cada sistema enzimático o generando una catálisis de la enzima al utilizar un sustrato específico^{51,52}.

El gran cambio en el estudio de la variabilidad genética se produce en 1966 con la introducción de la técnica electroforética (Huby y Lewontin, 1966; Harris, 1966). La electroforesis permite obtener estimaciones de las frecuencias génicas y de la variabilidad genética existente en las poblaciones. La aplicación de esta técnica conllevó al desarrollo de la metodología de la electroforesis de aloenzimas multilocus (MLEE), que rápidamente se utilizó de forma estandarizada en los estudios de genética de poblaciones.

Con la técnica MLEE se estudia el polimorfismo de los productos génicos, es decir, se detecta la variabilidad a nivel proteico. Esta técnica detecta las variaciones en la secuencia de aminoácidos que afectan a la movilidad electroforética de enzimas metabólicas. En los estudios de genética de poblaciones, la técnica MLEE se aplica a enzimas metabólicas, por que los genes que codifican estas enzimas están sometidos a una fuerte selección estabilizadora y, por consiguiente, la variación detectada es selectivamente neutra. En cambio, no es adecuado aplicarlo a productos génicos codificados por genes sometidos a selección diversificadora, por que la velocidad de cambio de estos *loci*, ya sea

⁴⁹ GRIFFITHS A.J., MILLER J., SUZUKI D., LEWONTIN R., GELBART W. Genética. Introducción al Análisis Genético. 5a. edición, McGraw-Hill -Interamericana, 1997. 7ª. edición, 2003, pp 21

⁵⁰ LUQUE, E. Bioquímica estructural. Universidad de Nariño. Pasto. 1995, pp 245, 268.

⁵¹ KREITMAN, M., y AKAHI, H. Molecular evidence fir natural selection. Annual Review of Ecology Systematic 1995, pp 403, 422.

⁵² HOELZEL, A.R. Molecular Genetic Analysis of Populations, a Practical Approach. 1998, pp 236, 612.

originada por mutación, recombinación o ambas, no reflejaría la divergencia del genoma entero.

El polimorfismo bioquímico o genético de las proteínas se refiere a diferentes tipos de una misma aloenzima, que difieren en su composición de aminoácidos y que son controlados por alelos diferentes. Estos se detectan mediante bandas con distintas movilidades en la electroforesis lo que constituye un determinado fenotipo, y se designan por letras; **a** para la banda rápida, **b** para la lenta⁵³. Cuando todos los individuos de una población tienen la misma banda, la hipótesis más sencilla es que un *locus* monomórfico simple codifica la proteína y todos los individuos son homocigotos para un mismo alelo. Cuando los individuos muestran diferencias, los fenotipos usualmente se conforman con el patrón de bandas esperado sobre la base de la expresión codominante de los alelos en un *locus* simple y el número de subunidades de las proteínas en estudio. Los fenotipos heterocigóticos presentan un número variable de bandas dependiendo de las características de la enzima activa⁵⁴.

La técnica de electroforesis de proteínas tiene ciertas limitaciones. Su resolución no es siempre adecuada para detectar diferencias entre poblaciones o individuos debido a la redundancia en el código de ADN que dicta la secuencia proteica, donde todos los cambios en un gen pueden no resultar en un cambio en la carga neta de la proteína expresada⁵⁵. Así muchas variantes genéticas pueden no ser detectadas por electroforesis de proteínas. Además, está limitada a detectar los cambios genéticos que afectan genes que expresan proteínas sensibles a tintes histoquímicos⁵⁶. Estos genes constituyen solo un pequeño porcentaje del genoma total de un organismo. Alrededor del 29% de las mutaciones que ocurren en el genoma no se pueden detectar por los cambios en la secuencia de aminoácidos⁵⁷. Otra limitación es que se requiere de tejido fresco o congelado, y más material que muchos métodos de ADN⁵⁸.

La existencia de una base de datos de aloenzimas en muchas especies representa una fuente más práctica de información genética, ante la falta de datos

⁵³ KING, J.D Y OHTA, T.H. Polyallelic mutational equilibrium. *Genetics*. 1975, pp 243.

⁵⁴ BEROVIDES, V. y ALFONSO, M. *Biología Evolutiva*. 1995, pp 114, 680.

⁵⁵ GRANT W. S. Y UTTER, F. M. Biochemical genetic variation in walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) and population structure in the southern Bering Sea and Gulf of Alaska. *Can.* 1980, pp 1093, 1100.

⁵⁶ MORIZOT, D. C. y SCHMIDT, M. E. Starch gel electrophoresis and histochemical visualization of proteins. *Electric and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management*. U.S.A. 1990, pp 25, 218.

⁵⁷ NEI, M. Estimation of heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. 1978, pp 583.

⁵⁸ ESTOUP, A., ROUSSET, F., MICHALAKIS, Y., COURNUET, J. M., ADRIAMANGA, M. y GUYOMARD, R. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: un case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). 1998, pp 339, 553.

de ADN⁵⁹. La electroforesis de proteínas sigue siendo una técnica muy importante en el estudio de variabilidad genética y caracterización de poblaciones, principalmente por su rapidez y bajo costo⁶⁰

3.6 ALOENZIMAS EN CAMARONES.

Los trabajos de electroforesis de proteínas en camarones, han sido importantes para evaluar la variabilidad genética de las poblaciones y se han constituido en una herramienta muy importante en trabajos de mejoramiento genético, en el desarrollo de la camaronicultura. Algunos trabajos en especies de camarones como el de García, *et al*⁶¹, encuentran en *L. vannamei* que de 13 *loci* analizados, 7 fueron polimórficos. No obstante, la variación total fue muy baja; mucho más bajas que con la técnica de RAPD, donde el porcentaje de *loci* polimórficos está en el orden del 39 - 77 %. Labacena *et al*⁶² trabajando en varias especies de camarones *peneidos*, analizaron 10 sistemas enzimáticos cuyos resultados coinciden con lo informado en la literatura, con algunas excepciones; donde los valores de variabilidad están entre 0.20 y 0.28 y el promedio de *loci* polimórficos va entre 28 y 38 %. Los trabajos de Mato⁶³ y Santana⁶⁴ en camarón blanco *L. schmitti*, han mostrado datos más altos de heterocigosidad. Lester en 1979 al realizar un estudio electroforético en tres especies de camarones *peneidos* del Golfo de México, encontró para 24 *loci* enzimáticos que no existían diferencias significativas entre las frecuencias génicas de dichos *loci*.

El estudio de Santana (1994) sobre estructura genética de poblaciones de *L. schmitti* en el Golfo de Guacanayabo (Cuba), mostró valores que indican un bajo grado de diferenciación entre ellas. Lo mismo muestra Mato (1992) al comparar 3 poblaciones de esta misma especie, lo cual sugiere la poca diferenciación que se consigue en estudios con aloenzimas en poblaciones muy cercanas de la misma especie.

En estudios realizados en camarón blanco cubano *Litopenaeus schmitti* utilizando aloenzimas como marcadores genéticos, Espinosa *et al*⁶⁵ caracterizaron genéticamente 5 poblaciones de la especie y utilizaron 21 *loci* electroforéticos, que

⁵⁹ PARK, L. Y MORAN, P. Op. Cit. pp.4

⁶⁰ WARD, R Y GREWE, P. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. Molecular Genetics in Fisheries. Chapman and Hall, edits. London. 1995, pp 29, 346.

⁶¹ GARCIA, D.K., FAGGART, M.A., RHOADES, L. y ALCÍVAR-WARREN A. Op. Cit. pp 330.

⁶² LABACENA, M. E., TORRES, M. Y ESPINOSA, G. (1994) Variabilidad y distancia genética en especies de *Penaeus*. Rev. Invest. Mar. pp 15(1).

⁶³ MATO, J. L. Distancia y variabilidad genética entre poblaciones de *Penaeus schmitti*. Trabajo de Diploma. Univ. de La Habana. 1992

⁶⁴ SANTANA, M.O. Evaluación de la estructura genética entre poblaciones naturales y de cultivo del camarón blanco *Penaeus schmitti* del Golfo de Guacanayabo. 1994. Trabajo de Diploma. Univ. de La Habana.

⁶⁵ ESPINOSA, G.U., BECKER, U., BORELL, Y., ROMO, J., DIAZ, R., AZANZA, J. Y DE DIOS, Op. Cit. P 980.

se resolvieron de nueve sistemas de proteínas. Todos los valores de heterocigocidad esperada se encuentran hacia el límite superior referido por Benzie⁶⁶, que establece un intervalo de 0.006 – 0.089 en su revisión de la estructura poblacional del género *Penaeus*.

Estudios realizados por M Rivera – García, JM Grijalva – Chon (2006) en camarón blanco *Litopenaeus Vannamei* cultivado en el golfo de México mostró que de dieciocho *loci* analizados siete fueron polimórficos. No se encontraron diferencias significativas entre las heterocigosis pero si tuvieron una diferente estructura genética poblacional.

Los estudios realizados en el Litoral Caribe Colombiano sobre variabilidad genética se encuentran reportados en CENIACUA (2007) realizados sobre una base fenotípica en camarones blancos de cultivo, se han producido 15 lotes de familias hasta el momento. Las poblaciones bases se establecieron después de la introducción de material genético de ocho países americanos para alcanzar una gran variabilidad genética y evitar problemas de endogamia, y en el Litoral Pacífico Colombiano el único estudio reportado es el de Delgado y Reyes (2006) el cual estudió la variación genética de una población natural y una de cultivo de camarón blanco *Litopenaeus Vannamei* de la región de Tumaco mediante la técnica MLEE; este análisis demostró que las dos poblaciones poseen una alta variación genética. Los resultados muestran un valor de heterocigocidad de 0.1951 para la población natural y 0.1761 para población de cultivo considerando los seis sistemas enzimáticos analizados.

⁶⁶ BENZIE, J.A.H.. Genetic improvement of prawns. 1998. pp 201, 425.

4. METODOLOGÍA

4.1. DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE MUESTREO.

Al extremo sur de la costa Pacífica colombiana se encuentra el litoral del Departamento de Nariño. En él se destaca la bahía de Tumaco que se constituye en la mayor entrante de la costa Pacífica colombiana y está ubicada en cercanías de la frontera con Ecuador entre las latitudes 1° 45' y 2° 00'N y las longitudes 78° 30' y 78° 45'0, comprendiendo un área de, aproximadamente 350 km² y sus aguas presentan profundidades que varían entre 0 y 50 metros. Posee características muy particulares gracias a su posición geográfica, como su alta lluviosidad, con bosque húmedo tropical y bosque pluvial premontano. El bosque de manglar es el principal medio de asociación vegetal, propio de la región, que se interrelaciona con la gran variedad de fauna silvestre acuícola⁶⁷

Tumaco es un municipio colombiano del Departamento de Nariño, localizado sobre una isla de origen aluvial, con una altura de 2 m y una temperatura cuyo promedio es de 28 °C. Esta población se encuentra a 304 km de Pasto, capital departamental. La base económica de la región la constituye en primer lugar la explotación forestal, seguida de la actividad agropecuaria, la minería, el comercio, la pesca industrial y la actividad portuaria, ya que se trata del segundo puerto más importante que tiene el país en el océano Pacífico⁶⁸.

En la Bahía de Tumaco y en zonas cercanas a ella, se escogieron como sitios de muestreo los sitios más comunes de pesca de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Entre estos sitios existe una distancia geográfica aproximada de 13 a 24 millas náuticas⁶⁹. Son ellos; La Ensenada (de Tumaco), Salahonda, Bocas de Curay y La Chorrera (Figura N° 3).

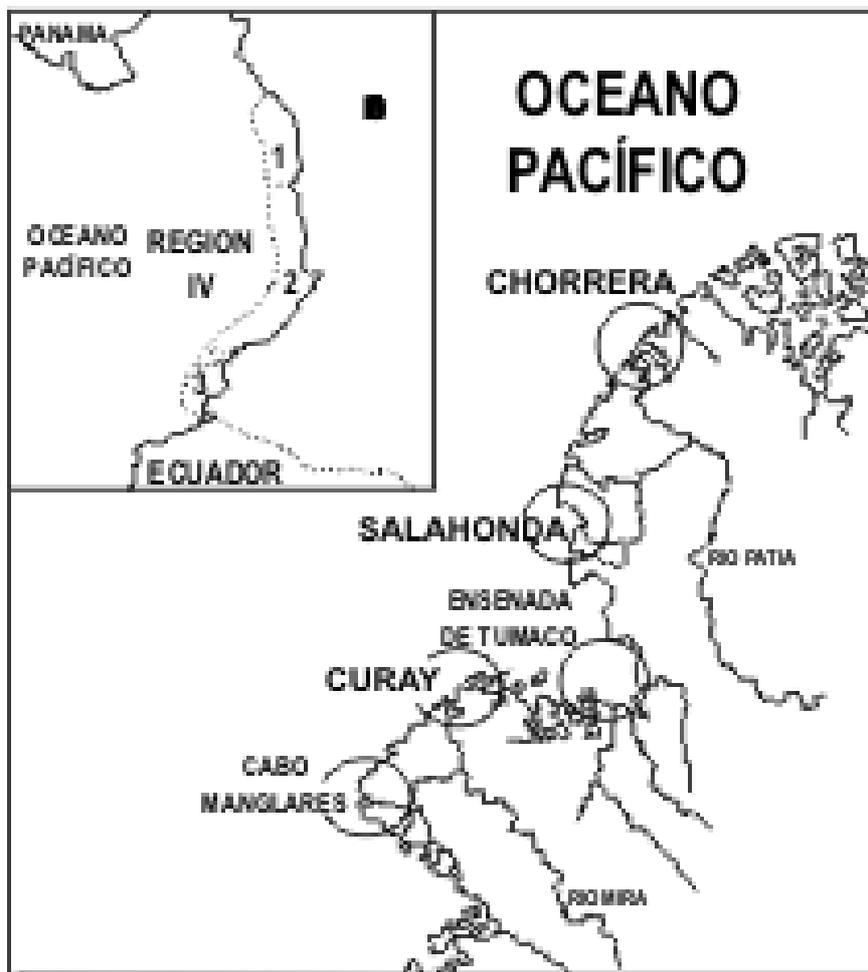
Las poblaciones de cultivo se obtuvieron de las camaroneras Agromarina y La Carbonera situada en la Vereda La Carbonera, que se encuentra ubicada a 15 minutos de Tumaco. Estas fincas cuentan con varias piscinas de aproximadamente 1 hectárea cada una, construidas mediante excavación de alrededor de 3 metros de profundidad en el centro, los cuales son abastecidos con agua proveniente del mar a través de canales.

⁶⁷ Centro Control y Contaminación del Pacífico CCCP. Bahía de Tumaco. 1994

⁶⁸ TAVERA, H. En cercanías de Tumaco crudos indicios de contaminación. AUPEC- Univalle. Cali Colombia. 1999, pp 42

⁶⁹ Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Colombia. Mapa de Ensenada de Tumaco.

Figura N° 3. Ubicación geográfica de la zona de muestreo de la población natural y de cultivo del camarón *L. vannamei*.



4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

En el presente estudio se muestrearon ejemplares de la especie *Litopenaeus vannamei*, de cuatro poblaciones naturales y dos poblaciones de cultivo (Tabla N° 2).

Tabla N° 2. Sitios de muestreo y número de individuos muestreados en cada población.

Poblaciones	Tipo	(n)
Bahía de Tumaco	Natural	21
Salahonda	Natural	40
Bocas de Curay	Natural	40
La Chorrera	Natural	38
Agromarina	De cultivo	40
La Carbonera	De cultivo	40

4.2.1 Poblaciones Naturales: La captura de las muestras de las poblaciones naturales se llevó a cabo durante los meses de julio de 2007 y abril de 2008. Esta se realizó con lanchas pesqueras pertenecientes a la Camaronera El Chajal, con colaboración del personal de dicha empresa. Las muestras, inmediatamente se obtuvieron, se conservaron en hielo y posteriormente se pesaron y midieron en el sitio de desembarque. Se tomó muestra de músculo y hepatopáncreas de cada ejemplar en tubos de 1.5 mL los cuales se conservaron en hielo hasta transportarlos al Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno perteneciente a la sección de Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño, donde se almacenaron a - 10°C hasta su posterior procesamiento.

4.2.2 Poblaciones de Cultivo: La población de cultivo de Agromarina se muestreó durante el mes de julio de 2007 y la población cautiva de La Carbonera se muestreó en el mes de abril de 2008. El muestreo se realizó con redes y el proceso de conservación fue similar al de las poblaciones naturales. Los individuos capturados en la camaronera Agromarina tenían un tiempo de cría de 11 semanas y los de La Carbonera de 9 semanas.

4.3 ELECTROFORESIS

4.3.1 Preparación del material Biológico: Se tomaron 0.3 g de músculo abdominal de cada muestra y se homogeneizaron utilizando un agitador mecánico en tampón Tris-ácido fosfórico (Tris hidroximetil aminometano 0.46 mol/L y ácido fosfórico 0.27 mol/L, pH 6.7 – 7.0), en una relación 1:1 (p/v), sobre un tubo de reacción de 1,5mL. El hepatopáncreas y los pedúnculos oculares se homogeneizaron en frío, agregando 2 gotas de agua destilada. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 12000 r.p.m. Se extrajeron 60 µL de sobrenadante en un tubo y se le agregó una solución de azul de bromofenol y glicerol en proporción de 1:2 (v/v), lo cual proporciona densidad a la muestra y marca el frente de la corrida en la electroforesis. Los homogenizados siempre se conservaron a -10°C. Para

posteriores corridas se extrajo una parte de los homogenizados y se realizó nuevamente la extracción con buffer de muestra y adición de azul de bromofenol y glicerol.

4.3.2 Corrida Electroforética.

Aspectos importantes en el desarrollo de la técnica MLEE.

Para llevar a cabo la técnica de Electroforesis de Aloenzimas Multilocus (MLEE), se tuvo en cuenta algunos aspectos dentro del procedimiento, lo que garantizó su reproducibilidad en similares condiciones:

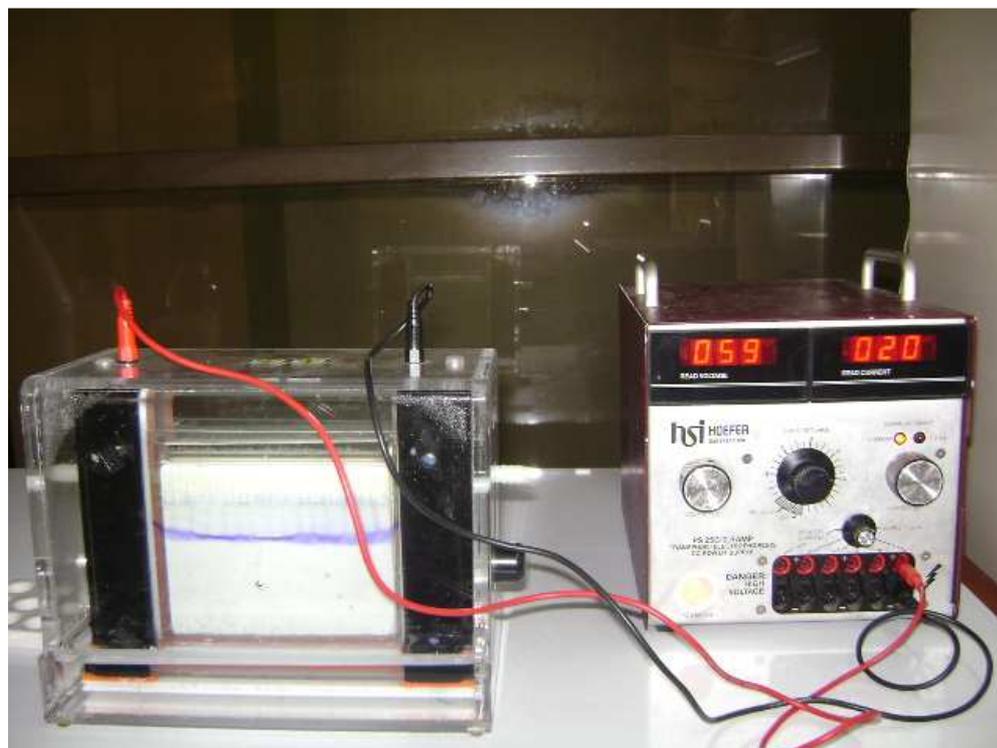
- Los cristales donde se hace el gel deben estar completamente limpios antes de ser utilizados para evitar interferencias que afecten los resultados y para facilitar el desmonte del gel después de la corrida y realizar la tinción.
- Es necesario que los reactivos sean de carácter analítico, totalmente puros y las soluciones se deben conservar en refrigeración. El persulfato de amonio que sirve de catalizador en la gelificación de la poliacrilamida, debe ser preparado en el instante en que se va a usar.
- Las soluciones para obtener los geles deben prepararse en el momento en que se van a verter a los vidrios, estas soluciones deben agitarse muy bien en la plancha de agitación para lograr un gel uniforme.
- El buffer de la cámara debe renovarse continuamente para lograr una corriente eléctrica y un voltaje óptimo y así garantizar que el frente de corrida alcance la distancia adecuada, en un tiempo estándar.
- La aplicación de las muestras en el gel debe realizarse cuidadosamente para evitar la contaminación de un pozo con otro y con la mayor rapidez posible para impedir que la muestra se difunda en el buffer de cámara.
- Las tinciones deben realizarse siguiendo estrictamente la metodología descrita para asegurar la aparición de las bandas y la uniformidad de las mismas.

La separación de las proteínas se realizó por medio de electroforesis discontinua con geles de poliacrilamida (PAGE), con gel concentrador y separador, siguiendo la técnica de Davis⁷⁰. Se empleo un equipo de Trueller y Nefyoduf con capacidad

⁷⁰ DAVIS, B. J. DISC. Electroforesis, Parte II". Ann N. Y. Acad. Sci. 1964, pp 121: 402-421.

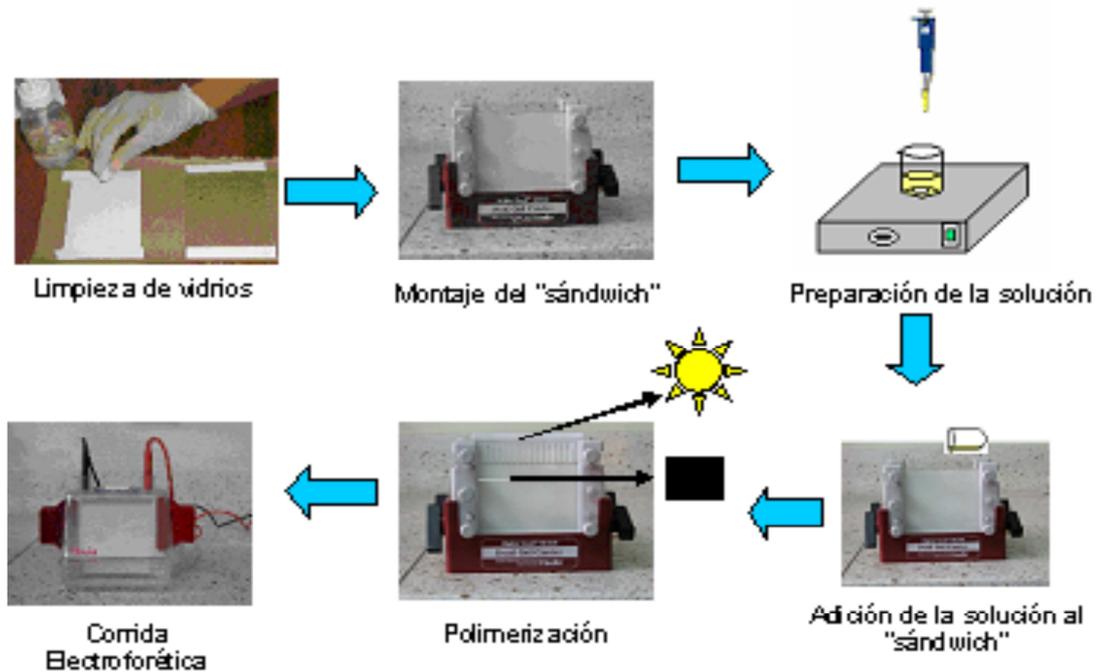
para procesar 30 muestras simultáneamente y una fuente de poder Hoefler con seis terminales para electrodos (Figura N° 4).

Figura. N° 4 Cámara y fuente utilizados en la electroforesis de proteínas.



Para la preparación de los geles, primero se acondicionaron los vidrios del equipo de electroforesis, los cuales se lavaron con detergente y con bastante agua destilada y por ultimo se secan y se limpian con etanol al 96%. Una vez secos totalmente se procedió a armar el “sándwich” en el molde para dos geles. Primero se prepara el gel separador que va en la parte inferior del “sándwich”, dejándolo a 4 cm. del borde superior. Una vez gelificado se adiciona encima y hasta el borde la solución de gel concentrador, procediendo luego a colocar el “peine” para elaborar los pozos donde se aplican las muestras a correr (Figura N° 5).

Figura N° 5. Diagrama de preparación de los geles de poli(acrilamida)



La concentración empleada para el gel separador fue de 7,5%, por ser el que mejor discriminaba las bandas, el cual se preparó con buffer Tris-HCl pH 8,8 (0.1M), solución de acrilamida / Bis-acrilamida al 30% en agua bidestilada (7.5%), TEMED 0.23 %, solución de persulfato de amonio 10% (0.054%) y se completó con agua destilada para obtener la concentración adecuada.

Para preparar el gel concentrador se mezclaron buffer Tris-HCl pH 6,8 (0,03 M) solución de acrilamida bis-acrilamida (5%) TEMED 40 μ L, Persulfato de amonio (0,04%) solución de riboflavina 0.006 % (0,02%) y se completó con agua destilada.

Para la corrida electroforética se usó un tampón de Tris-Glicina pH 8.3 (0.1/0,78 M). Inicialmente se realizó una pre-corrida de los geles sin muestras a 20 mA durante 15 minutos para que el persulfato de amonio utilizado en la polimerización migre por delante de las muestras y así evitar que las desnaturalice, como también para que migren otros iones que puedan interferir en la corrida.

Después de la pre-corrida, se aplica en cada pozo las muestras preparadas. La cantidad de muestra aplicada varía entre 30 a 60 μ L. Para iniciar la corrida, se parte con una corriente de 20 mA y un voltaje de 60 V y una temperatura promedio de 15°C hasta que el frente de corrida que lo marca el azul de bromofenol entra al

gel separador, donde se aumenta la corriente a 40 mA y con un voltaje de 120V, por espacio de 2 a 4 horas dependiendo del sistema enzimático a revelar.

4.3.3 Visualización de los sistemas Enzimáticos: Para visualizar las bandas de los sistemas enzimáticos estudiados, se incubaron los geles con soluciones de tinte específicas para cada sistema. Posteriormente se los colocó sobre una solución de ácido acético al 7.5% para su conservación. De estos sistemas se analizaron ocho (8) *loci* enzimáticos, todos reportados como polimórficos por Labacena *et al.*⁷¹ (Tabla N° 3).

Las bandas de la tinción se apreciaron visualmente con facilidad. A las diferentes movilidades electroforéticas se les asignó una letra para su identificación, empezando por "a" para la que más corrió y siguiendo el orden alfabético para las más retrasadas. En ausencia de banda por falta de actividad enzimática se asignó el cero.

Tabla N° 3. Clasificación, características y condiciones de corrida de los sistemas enzimáticos estudiados.

Nombre de la enzima	Clasificación	Locus	Tejido	Tiempo en concentrador	Tiempo de Corrida Final
Malato Deshidrogenasa	1.1.1.37	MDH	Hepatop.	60 min	2 h 30 min
Alanina Deshidrogenasa	1.4.1.1	ALD	Hepatop.	60 min	2 h 30 min
Carboxilestera	3.1.1.1	EST	Músculo	30 min	2 h
Fosfatasa alcalina	3.1.3.1	PA	Músculo	30 min	2 h
Glutamato Deshidrogenasa	1.4.1.2	GDH	Músculo	60 min	2 h 30 min
Amilasa	3.2.1.1.	AMI	Músculo	60 min	4 h
Peroxidasa	1.11.1.7	PER	Músculo	60 min	4 h
Lactato Deshidrogenasa	1.1.1.27	LDH	Músculo	60 min	2 h 30 min

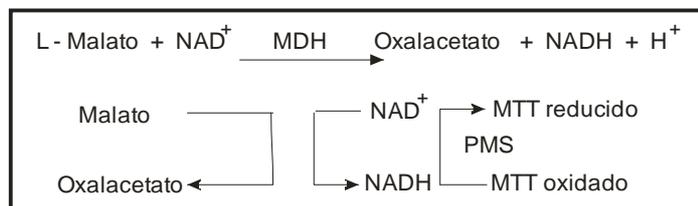
* El Comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) describe cada tipo de enzima caracterizada y le suministra un número de la EC (Comisión de la enzima)

4.3.3.1 Tinción para Malato Deshidrogenasa (MDH)⁷²: La tinción del gel se realizó disolviendo L-ácido málico (0.19%) en buffer tris/HCl pH 7.1 (0.15 M), posteriormente se adicionaron el agua destilada (60mL), NaCN (0.01M), NAD (0.019%), MTT (0.012%) y PMS (0.01%) con agitación magnética, y seguidamente se adicionó la mezcla a los geles.

⁷¹ LABACENA, M. E., TORRES, M. Y ESPINOSA, G. Op. Cit pp. 23.

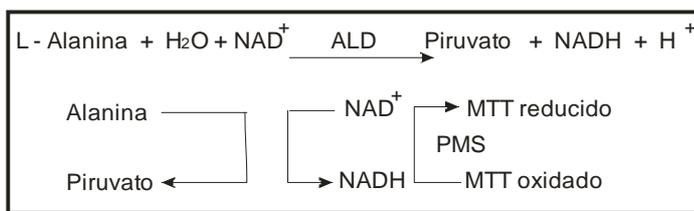
⁷² FARFÁN MARIBEL., Estudio de la Estructura Genética de Poblaciones de *Vibrio cholerae*. Barcelona 2002, pp 72

Esquema 1. Tinción de *MDH*



4.3.3.2 Tinción para Alanina Deshidrogenasa (*ADH*)⁷³: Se disolvió alanina sólida (0.48%) en buffer fosfato pH 7, (0.19 M) seguidamente se adicionó el NAD (0.019%), MTT (0.012%) y PMS (0.01%) hasta un volumen final de 104 mL y se añadió la mezcla a los geles. Al cabo de 30 minutos aparecieron las bandas.

Esquema 2. Tinción de *ADH*

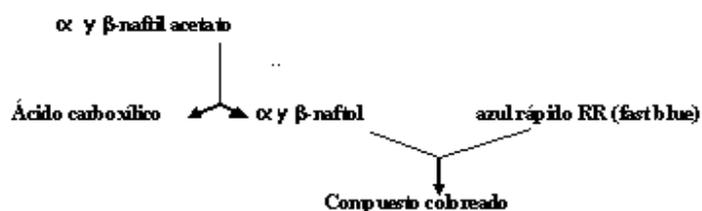


4.3.3.3 Tinción para Carboxilesterasas (*EST*)⁷⁴: La corrida electroforética se realizó durante 20 minutos más, después que el frente de corrida llegó al final del gel. Se incubó el gel durante 40 min en ácido bórico al 3% a 37°C para neutralizar su alcalinidad. Se decantó el ácido bórico y se lavó sucesivamente con agua destilada. Se dejó secar un poco y posteriormente se agregó una solución de 0.01% de α -naftil acetato y 0.01% de β -naftil acetato disueltos en acetona con 100 mL de tampón fosfato 0.02 mol/L, pH 7. Por último se adicionó azul rápido RR (Fast blue) al 0.6% y se esperó hasta que aparecieron las bandas. La reacción que ocurre durante la tinción es la siguiente:

⁷³ FARFÁN MARIBEL., Op. Cit pp. 74

⁷⁴ GARCIA, M., GRIJALVA, M. Variabilidad y diferenciación genética en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de bajo y alto crecimiento, Ciencias marinas, Universidad Autónoma de Baja California, México, 2006, pp 66

Esquema 3. Tinción de Carboxilesterasa



4.3.3.4 Tinción para Fosfatasa alcalina (ALP)⁷⁵: Se preparó la solución en el momento de la tinción. Se disolvieron 100 mL de tampón Tris – HCl (0,4M) a un PH de 8,5, 0.05 gr de naftil fosfato de sodio y 0.05 gr de fast blue RR. Se dejó hasta que aparecieron las manchas. La reacción que cataliza es la siguiente:

Esquema 4. Tinción de Fosfatasa alcalina

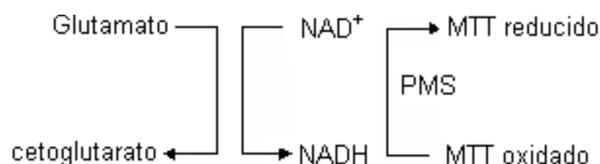


4.3.3.5 Tinción para Glutamato Deshidrogenasa (GDH)⁷⁶: Se disolvieron 23 mg de glutamato monosódico (0.96%) en buffer fosfato pH 7 (0.19M). Después se agregó en el siguiente orden NAD (0.019%), MTT (0.012%) PMS (0.01%), para un volumen final de 104 mL. Esta solución se adicionó al gel. Se realizó la tinción dentro de una estufa a 37°C en oscuridad hasta que aparecieron las bandas.

⁷⁵ GARCIA, M., GRIJALVA, M, Op. Cit pp 68

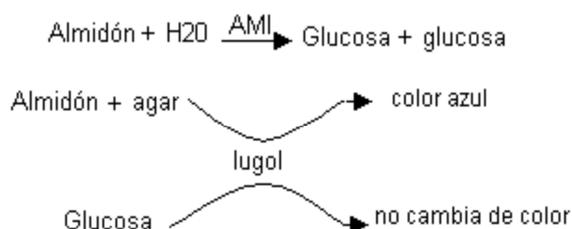
⁷⁶ FARFÁN MARIBEL., Op. Cit pp. 23

Esquema 5. Tinción de *GDH*



4.3.3.6 Tinción para Amilasas (*AMI*)⁷⁷: Se incubó el gel en una solución de agar: almidón al 1% en buffer fosfato pH 6 (0,2M), la cual se llevó previamente a ebullición y se dejó enfriar a 40°C para ser utilizada. La capa de agar – almidón se dejó actuar por 30 minutos, luego se retiró y se lavó el gel con agua destilada. Para revelar las bandas se adicionó lugol en ácido acético 10:1, con agitación constante durante 20 minutos hasta la aparición de las bandas.

Esquema 6. Tinción de Amilasa



4.3.3.7 Tinción para Peroxidasas (*PER*)⁷⁸: Se adicionó al gel después de la corrida electroforética, una solución recién preparada de:

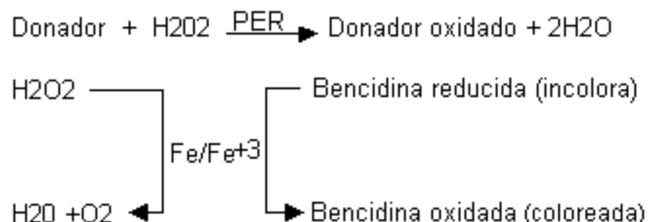
- | | |
|--|----|
| Solución A: Bencidina en solución alcohólica al 50% | 2% |
| Solución B: Agua oxigenada en buffer acetato /acido acético
0.5M pH 4.6 | 7% |

Se mezclaron las dos soluciones (A y B) y luego se dejó en agitación durante 20 minutos hasta la aparición de las bandas.

⁷⁷ DELGADO FLOR., 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. 2006, pp 43

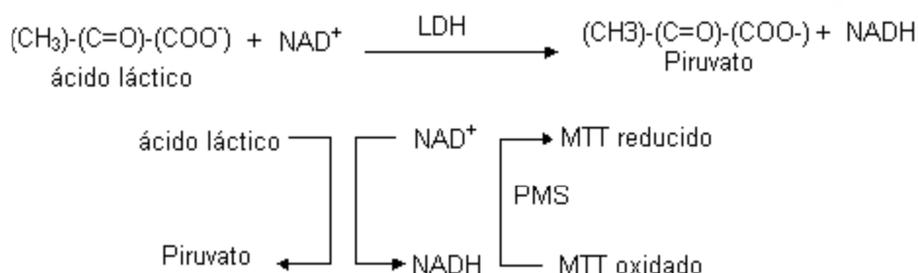
⁷⁸ DELGADO FLOR., REYES NANCY., Op. Cit pp. 46

Esquema 7. Tinción de *PER*.



4.3.3.8 Tinción para Lactato Deshidrogenasa (*LDH*)⁷⁹: Se disolvió lactato de sodio (0.57%) en solución de buffer fosfato pH 7, (0.19M) y seguidamente se adicionó el NAD (0.019%), MTT (0.012%) y PMS (0.01%) hasta un volumen final de 104 mL. Se colocaron los geles en esta solución y se incubó a 37°C en oscuridad hasta la aparición de las bandas en aproximadamente 30 minutos

Esquema 8. Tinción de *LDH*



4.4 ESTIMACIÓN DE LOS ÍNDICES GENÉTICOS

Con la información de las movilidades electroforéticas se creó una matriz general con la que se estimaron los índices genéticos, siguiendo las metodologías tradicionales de la genética cuantitativa establecida para estos fines⁸⁰. Las frecuencias alélicas fueron analizadas mediante el programa GENETIX v. 4.03 1998 (Laboratoire Génome et Populations. Université de Montpellier, Montpellier, Francia)⁸¹ para obtener los siguientes índices genéticos: número promedio de alelos por *locus*, índice de polimorfismo, heterocigosidad, índice de fijación de Wright según adecuación Weir y Cockerham (1984) y los estimados de distancia genética de Nei (1978).

⁷⁹ FARFÁN MARIBEL., Op. Cit pp. 71

⁸⁰ FALCONER, D Y MACKAY. Introduction to quantitative genetics. 1996, pp 2110, 4646.

⁸¹ BELKIR, K., BORSA, P., GOUDET, J., CHIKNI, L., Y BONHOMME, F. GENETIX, logiciel soud Window TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier (France). 1998.

4.4.1 Frecuencias alélicas para cada *loci* por población: Este índice es una medida de la presencia de un alelo en una población y se calcula mediante la fórmula:

$$P(A) = [2(AA) + (Aa)/2n].$$

Donde 2AA (Homocigoto dominante) es dos veces el número de genotipos homocigotos con ese alelo, más el número de genotipos heterocigotos (Aa) con ese alelo, dividido por dos veces el número total de individuos en la muestra (2n) porque cada individuo porta dos alelos por *locus*⁸².

4.4.2 Número promedio de alelos por *locus* (A).

$$A = (1/k) = \sum nj.$$

Donde k = número de *loci* y nj = número de alelos detectados por *locus*. Esta medida brinda información complementaria a la información sobre polimorfismo. Requiere únicamente el conteo del número de alelos por *locus* y el cálculo del promedio⁸³.

4.4.3 Polimorfismo: Mide la presencia de más de un alelo por *locus*. La frecuencia de los alelos de un *locus* debe ser menor o igual a 0.95.

$$P_j = q \leq 0,95$$

Siendo **P_j** la tasa de polimorfismo y **q** la frecuencia alélica. Con esta medida se puede saber si un gen presenta variación o no, este criterio de polimorfismo es totalmente arbitrario y su valor es fijado para ver en que genes es más frecuente la variación alélica.

4.4.4 Los valores de heterocigosidad esperada (H_{exp.}) y corregida (H_{n.b.}).

$$H_{exp} = 1 - \sum q^2$$

Donde la heterocigosidad promedio (H_{exp}) de todos los *loci* es una estimación del grado de variabilidad genética en la población y q = frecuencia alélica.

4.4.5 El estadístico índice de fijación de Wright según adecuación Weir y Cockerham⁸⁴ (1984): Este estadístico permite medir la diferenciación genética

⁸² Ibid., p. 251.

⁸³ LYNCH, M y MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. 2002, 241.

⁸⁴ WEIR, B. C. Y COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. 1984, pp 1358, 1370.

entre poblaciones. Puede ser estimado como la correlación de pares de alelos entre individuos dentro de una subpoblación. Es útil para estudiar la estructura genética de las poblaciones de una misma especie. Tiene un intervalo teórico de 0 a 1, donde un número cercano a 1 indica una subdivisión entre las poblaciones comparadas. En el uso del estimado F_{st} algunas veces resultan valores levemente negativos, que no son diferentes en significación que cero⁸⁵. Su cálculo es como sigue:

$$F_{st} = H_t - H_s / H_t$$

donde, $H_t = 2 (q - q^2)$

q = frecuencia promedio del i -ésimo alelo

Se empleó el índice F_{st} para el cálculo del flujo genético entre las poblaciones, mediante la fórmula:

$$Nem = [(1 / F_{st}) - 1] / 4$$

donde, N_e : tamaño efectivo de la población

m : es el porcentaje de migración

En general, los valores de Nem menores que 1 nos dan idea de alta diferenciación entre poblaciones, valores sobre 5 muestran diferenciación mediana y solo hay diferenciación leve, cuando los valores se muestran mayores que 50⁸⁶.

4.4.6 Distancia genética de Nei⁸⁷ (1978): Las distancias genéticas son interpretadas como el número promedio de sustituciones del codón por *locus*, corregidos para múltiples aciertos, a partir del momento de separación de dos poblaciones⁸⁸ y pueden tomar valores entre cero e infinito.

Se utilizó la metodología UPGMA⁸⁹ para obtener el dendrograma de las poblaciones naturales y de cultivo elaborado a partir de los datos de las distancias genéticas de Nei (1978), utilizando el paquete estadístico BIOSYS-1

⁸⁵ SUNDEN, S.L.Y DAVIS, S.K, .Op. cit. pp. 520.

⁸⁶ Ibid., p. 521

⁸⁷ NEI, M. Op. Cit. 114.

⁸⁸ AVISE, J.C. Op. Cit. p. 158.

⁸⁹ Sneath, P. H. y Sokal, A. Numerical Taxonomy. San Francisco. (1973) Freeman.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.

En las muestras de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de las poblaciones naturales y de cultivo se observaron las características mas relevantes en esta especie: poseen un color blanquecino, antenas de color rojo, un rostro corto con dientes en el borde dorsal y uno o dos en el borde ventral y diez patas en el cefalotórax.

Se observa a simple vista que los ejemplares de las poblaciones naturales son mucho más grandes que las de cultivos en general, se diferencian tanto en el peso como en la talla. Al hacer el análisis de promedio de pesos y tallas se corrobora lo expresado (Tabla N° 4).

Existe una variación alta de pesos y tallas entre las poblaciones naturales, ya que es imposible en estas condiciones, determinar la edad de los ejemplares, por lo que el muestreo se hizo indiscriminadamente entre animales de gran talla y peso y otros de menor tamaño. El análisis muestra claramente que los ejemplares de estas poblaciones, en su mayoría superan la talla y peso promedio del camarón que es comercializado en el mercado interno y externo, lo cual indica que las poblaciones naturales no son una fuente propicia para obtener camarones *L. vannamei* que cumplan con las exigencias del mercado. Estas poblaciones en cambio, si podrían ser utilizadas para obtener de ellas los progenitores para iniciar poblaciones en cautiverio, lo cual posibilita el control de variables para producir un camarón que cumpla con los requisitos exigidos en el mercado.

El peso y la longitud promedio de las poblaciones de cultivo es menor que el de la poblaciones naturales, debido en parte, a que las de cultivo tenían entre 9 - 11 semanas de haberse sembrado por tanto estos ejemplares no alcanzaron el peso máximo (12-17g); no obstante en comparación con la alta desviación que tuvieron las poblaciones naturales, las poblaciones de cultivo tuvieron pesos cercanos entre los individuos.

Tabla N° 4. Promedios de peso y talla de poblaciones naturales y de cultivo

POBLACIONES	TALLA PROMEDIO (cm)			PESO PROMEDIO PONDERADO (g)
	CEFALOTORAX	ABDOMEN	TOTAL PONDERADO	
ENSENADA	8,95±1,6	13,31±1,7	22,32±4,7	60,76±7,8
SALAHONDA	6,27±1,04	10,85±2,1	17,08±4,1	31,93±5,7
CURAY	7,40±1,4	9,28±2,05	15,62±4,0	35,68±6,0
LA CHORRERA	7,77±1,4	12,54±1,3	20,29±4,5	47,70±6,9
AGROMARINA	2,73±1,07	9,4±1,5	12,10±1,4	8,84±1,2
LA CARBONERA	2,51±0,5	8,18±1,08	10,70±0,9	7,89±1,4
Promedio de pesos ponderados de poblaciones naturales (g)			44,02±6,6	
Promedio de tallas ponderados de poblaciones naturales (cm)			18,83±4,3	
Prom. de cefalotórax poblaciones naturales (cm)			7,59±1,4	
Prom. de abdomen poblaciones naturales (cm)			11,60±1,7	
Promedio de pesos de poblaciones cultivo (g)			8,4±1,3	
Promedio de tallas de poblaciones cultivo (cm)			11,4 ±1,2	
Prom. de cefalotórax poblaciones cultivo (cm)			2,62±0,8	
Prom. de abdomen poblaciones cultivo (cm)			8,79±1,3	

En el trabajo realizado por Fresnada⁹⁰ en la costa Ecuatoriana con poblaciones naturales de *Litopenaeus vannamei*, se ha encontrado promedios de peso entre 45,8 g ± 15,8 g, que es similar al obtenido en esta investigación (44,02±6,6), ya que ambos muestreos se hicieron de forma aleatoria, lo que indica que las poblaciones vecinas conservan la misma tasa de crecimiento. La alta desviación nos está indicando que se presentaron diferenciación en cuanto a peso y tamaño de las muestras recolectadas, a pesar de que para poblaciones naturales se realizó un promedio de pesos y tallas ponderado, lo que evita que las desviaciones sean más altas.

5.2. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.

5.2.1 Movilidades electroforéticas en los sistemas enzimáticos: Con la tinción de los geles de poliacrilamida, aparecieron una serie bandas con una o varias movilidades según el sistema enzimático revelado. En cada gel se utilizó una muestra de un individuo que actuó como patrón o guía para determinar las movilidades. Las fotografías que se muestran a continuación indican algunas movilidades de bandas de los distintos sistemas enzimáticos revelados.

⁹⁰ FRESNEDA, R.A. "Determinación de la estructura poblacional de *Litopenaeus vannamei* mediante ISSRs a lo largo de la costa ecuatoriana". Guayaquil. Ecuador. 2003, pp 15, 69.

Figura N° 6 Actividad enzimática de Malato Deshidrogenasa en hepatopáncreas de *Penaeus vannamei* en geles de poliacrilamida

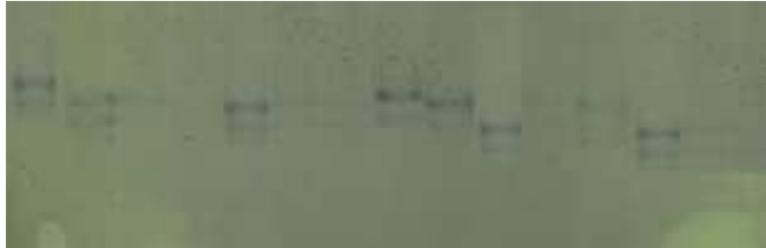


Figura N° 7. Actividad enzimática de alanina deshidrogenasa en hepatopáncreas de *Penaeus vannamei* en geles de poliacrilamida.

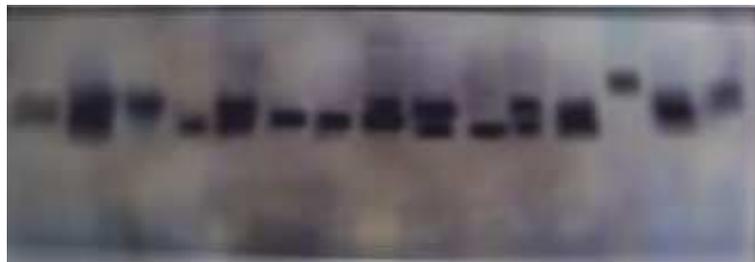


Figura N° 8. Actividad enzimática de Esterasa en músculo de *Penaeus vannamei* en geles de poliacrilamida



Figura N° 9. Actividad enzimática de Fosfatasa alcalina en músculo de *Penaeus vannamei* en geles de poliacrilamida.



Figura N° 10. Actividad enzimática de glutamato deshidrogenasa en músculo de *Penaeus vannamei* en geles de poliacrilamida.



Figura N° 11. Actividad enzimática de Amilasa en músculo de *Penaeus vannamei* en geles de poliacrilamida

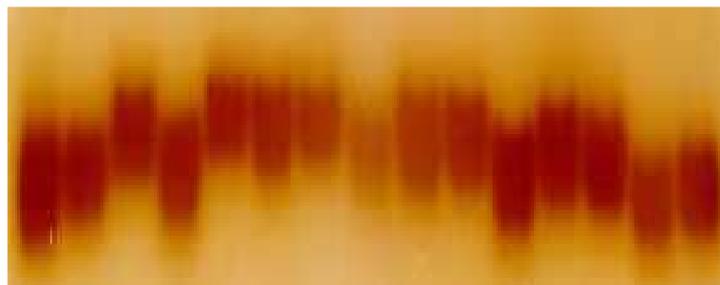


Figura N° 12. Actividad enzimática de Peroxidasa en músculo de *Penaeus vannamei* en geles de poliacrilamida.

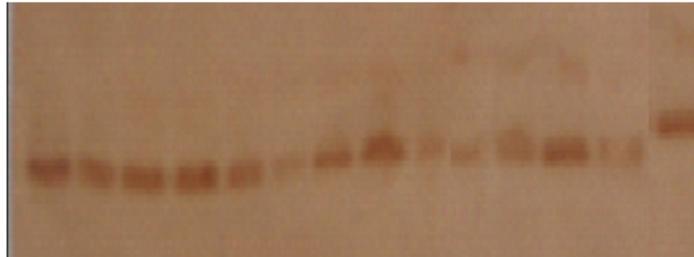
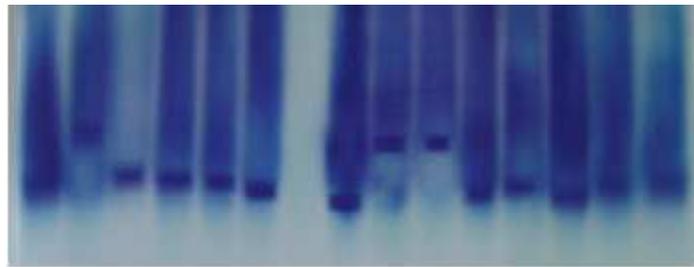


Figura N° 13. Actividad enzimática de lactato deshidrogenasa en músculo de *Penaeus vannamei* en geles de poliacrilamida



5.3 ESTIMACIÓN DE ÍNDICES GENÉTICOS

5.3.1 Variabilidad genética: Se corrieron un total de 219 muestras de individuos de *L. vannamei*, que generaron un total de 30 movilidades, revelando 8 *loci* aloenzimáticos que codifican para 8 enzimas, todas las cuales resultaron polimórficas y presentaron suficiente actividad y definición en los tejidos analizados. Los datos obtenidos en las corridas electroforéticas fueron la base para construir las matrices de las movilidades aloenzimáticas en las poblaciones de estudio. Las movilidades generadas fueron introducidas en el software GENETIX versión 4.03⁹¹.

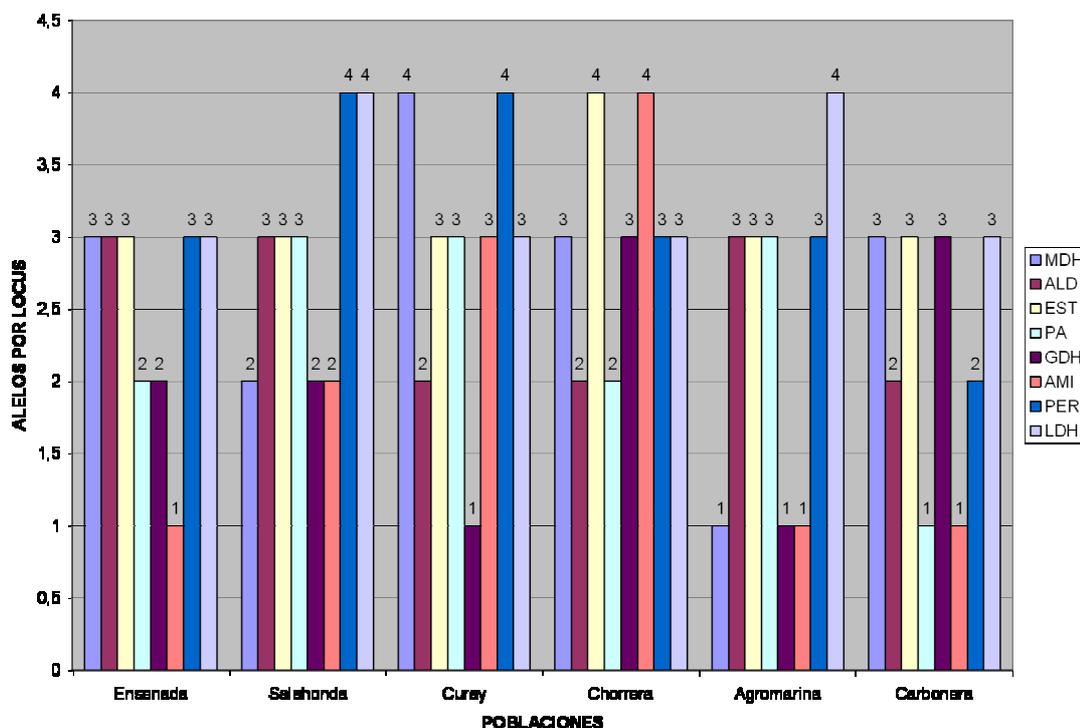
En el gráfico N° 1 se observa el número de alelos por *locus* en cada población, mostrando que los *loci* más variables son los de esterasas (*EST*) y Lactato Deshidrogenasa (*LDH*), presentando entre 3 y 4 alelos en todas las poblaciones, con un promedio de 3,3 alelos. Igualmente se aprecia que la población de La Chorrera presenta la mayor variación de alelos por *locus*, mostrando un promedio de 3,12 alelos, superando el promedio en las poblaciones naturales que es de 2,8

⁹¹ BELKIR, K., BORSA, P., GOUDET, J., CHIKNI, L., Y BONHOMME, F. GENETIX, Op. Cit.

alelos por *locus*. Las poblaciones de cultivo presentan un promedio de alelos por *locus* de 2,3, el cual es menor que en las poblaciones naturales para los 8 *loci* analizados.

La población de cultivo de Agromarina mostró que los *loci* MDH, GDH y AMI son monomórficos, en tanto que la población de La Carbonera presentó como monomórficos los *loci* PA y AMI. Las poblaciones naturales de La Ensenada y de Curay no presentaron polimorfismo en AMI y GDH respectivamente. Todos los *loci* analizados presentan más de un alelo en las otras poblaciones naturales.

Gráfica N° 1. Número total de alelos por *locus* para las poblaciones naturales y de cultivo. **MDH**: malato deshidrogenasa, **ALD**: alanina deshidrogenasa, **EST**: esterases, **PA**: Fosfatasa alcalina, **GDH**: glutamato deshidrogenasa, **AMI**: amilasa **PER**: peroxidasa, **LDH**: lactato deshidrogenasa.



5.3.2. Diversidad genética.

5.3.2.1. Frecuencias alélicas: Las frecuencias alélicas obtenidas indican la proporción de todos los alelos presentes en el gen que codifica cada una de las aloenzimas. Además sirve como base para la determinación del polimorfismo presente en una población.

Tabla N° 5 Frecuencias alélicas y promedio de frecuencias de poblaciones naturales y de cultivo *Litopenaeus vannamei* mediante *loci* aloenzimáticos.

Locus/Alelos	Ensenada N= 21	Salahonda N= 40	Curay N= 40	La Chorrera N=40	Agromarina N=38	La Carbonera N=40	Promed de frecuec.
MDH							
a	0,1429	0,1750	0,0750	0,0750	1,0000	0,0000	0,245
b	0,7143	0,8250	0,1000	0,8250	0,0000	0,9000	0,561
c	0,1429	0,0000	0,7000	0,1000	0,0000	0,1000	0,174
d	0,0000	0,0000	0,1250	0,0000	0,0000	0,0000	0,021
ALD							
a	0,1905	0,1000	0,6500	0,5250	0,1842	0,5750	0,371
b	0,7619	0,5500	0,3500	0,4750	0,6316	0,4250	0,532
c	0,0476	0,3500	0,0000	0,0000	0,1842	0,0000	0,097
d	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,000
EST							
a	0,1000	0,3000	0,0000	0,0750	0,0789	0,0000	0,091
b	0,6000	0,6000	0,6750	0,4000	0,3684	0,5500	0,519
c	0,3000	0,1000	0,3000	0,3500	0,5526	0,4250	0,346
d	0,0000	0,0000	0,0250	0,1750	0,0000	0,0250	0,038
PA							
a	0,7143	0,0000	0,0000	0,0000	0,5789	1,0000	0,382
b	0,2857	0,3500	0,0250	0,9000	0,3947	0,0000	0,326
c	0,0000	0,5750	0,8000	0,1000	0,0263	0,0000	0,250
d	0,0000	0,0750	0,1750	0,0000	0,0000	0,0000	0,042
GDH							
a	0,2381	0,0750	0,0000	0,0750	0,0000	0,0250	0,035
b	0,7619	0,9250	0,0000	0,6000	1,0000	0,9500	0,695
c	0,0000	0,0000	1,0000	0,3250	0,0000	0,0250	0,225
d	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,000
AMI							
a	0,0000	0,0000	0,0000	0,0250	0,0000	0,0000	0,004
b	0,0000	0,4250	0,2500	0,4250	1,0000	1,0000	0,517
c	1,0000	0,5750	0,6750	0,4250	0,0000	0,0000	0,446
d	0,0000	0,0000	0,0750	0,1250	0,0000	0,0000	0,033
PER							
a	0,1905	0,2500	0,0500	0,1250	0,4211	0,0000	0,173
b	0,5238	0,5250	0,3000	0,6250	0,5000	0,0000	0,412
c	0,2857	0,1750	0,3000	0,2500	0,0789	0,4500	0,257
d	0,0000	0,0500	0,3500	0,0000	0,0000	0,5500	0,158
LDH							
a	0,3810	0,0250	0,1538	0,1750	0,1053	0,2308	0,178
b	0,3333	0,1000	0,6154	0,6000	0,6316	0,6410	0,487
c	0,2857	0,7000	0,2308	0,2250	0,2368	0,1282	0,301
d	0,0000	0,1750	0,0000	0,0000	0,0263	0,0000	0,034

El *locus MDH* mostró 4 alelos en la población de Curay y en las demás poblaciones naturales mostró 3 y 2 alelos, siendo el más frecuente el alelo **b** en todas ellas con promedio de frecuencia de 0,561. En la población de cultivo de Agromarina este *locus* resultó monomórfico con el alelo **a**. Para este sistema se calculó un promedio de alelos de 2,66 para todas las poblaciones analizadas.

Para *ALD* todas las poblaciones resultaron polimórficas mostrando hasta 3 alelos en las poblaciones de Ensenada, Salahonda y Agromarina, y dos alelos en las demás poblaciones. El alelo más frecuente resultó el **b** con promedio de 0,532 de frecuencia. La frecuencia promedio para este sistema es de 2,5 alelos para todas las poblaciones analizadas.

Para Esterasas (*EST*), la población de La Chorrera presentó cuatro alelos. El alelo más frecuente resultó el alelo **b** con una frecuencia promedio de 0,519. Para las demás poblaciones este *locus* presentó 3 alelos resultando igualmente más frecuente el alelo **b**. La frecuencia promedio para este sistema es de 3,16 alelos para todas las poblaciones analizadas.

En el sistema de fosfatasa alcalina, el *locus PA* en las poblaciones de Salahonda, Curay, y Agromarina presentan 3 alelos, mientras que las poblaciones de La Ensenada y La Chorrera tienen 2 alelos en este *locus*. La población de La Carbonera resultó monomórfica para este *locus*, presentando todas ellas al alelo **a** como el más frecuente, con un promedio de frecuencia de 0,382.

El *locus GDH* presenta polimorfismo en la mayoría de poblaciones a excepción de la población natural de Curay y la de cultivo de Agromarina. Las poblaciones de La Chorrera y La Carbonera presentan tres alelos en el *locus GDH*, mientras que las de La Ensenada y Salahonda muestran dos alelos. El alelo más frecuente resultó el alelo **b** con 0,695 de frecuencia alélica promedio.

En el sistema de amilasa, el *locus AMI* mostró cuatro alelos en la población de La Chorrera donde el alelo **b** resultó el más frecuente. La población de Curay presenta 3 alelos mientras que Salahonda solamente presenta 2 alelos siendo el más frecuente el alelo **c**. Por su parte las poblaciones de cultivo de Agromarina y La carbonera para este *locus* son monomórficas lo mismo que la población natural de La Ensenada. La frecuencia más alta es la del alelo **b** con una frecuencia promedio de 0,517.

En la enzima Peroxidasa, en el *locus PER* las poblaciones de Salahonda y Curay presentaron cuatro alelos. La Ensenada, Chorrera y Agromarina por su parte muestran 3 alelos para este *locus* y la población de La Carbonera solamente dos. Podemos decir que este *locus* presenta polimorfismo en todas las poblaciones. Para el alelo más frecuente que es el **b**, aparece con una frecuencia promedio de 0,412.

En el sistema Lactato deshidrogenasa, el *locus LDH* mostró buena variación con 3 o cuatro alelos en las poblaciones naturales y de cultivo. Salahonda y Agromarina mostraron una variación de 4 alelos y las demás poblaciones 3 alelos. El alelo más frecuente fue el alelo **b** con una frecuencia promedio de 0,487.

En estudios realizados de diferenciación genética en tres linajes de camarón blanco, *penaeus vannamei*; Hernández y Grijalva (2003), encontraron que de diez *locus* analizados, solo nueve fueron polimórficos. El *locus EST* fue el más variable con 4 Alelos, GDH con 3 alelos; y con solo 2 alelos se presentaron PA y LDH. En el caso del número promedio de alelos por *locus*, el valor disminuyó en los tres linajes. El más bajo fue 1,8 para el linaje No 1, seguido de 1,87 del linaje No 2; y 2,13 de la muestra silvestre. En otros estudios realizados por García y Rivera (2006) con *Litopenaeus vannamei* de alto y bajo crecimiento en las costas de México muestra que el promedio de número de alelos por *locus* para los de bajo crecimiento fue de 1,5 y de 1,7 para los grandes. Estos resultados son comparables a los obtenidos en esta investigación ya que en la población de la Chorrera se obtuvieron 4 alelos para el *locus EST*, las poblaciones de la Chorrera y la Carbonera presentaron 3 alelos para el *locus GDH* y las poblaciones de La Chorrera y la Ensenada con 2 alelos para el *locus PA*; además en este estudio se encontró que el número promedio de alelos por *locus* más alto fue para la población natural de la chorrera con 3 alelos y el más bajo fue para la población de cultivo la carbonera con 2,25 alelos por *locus*.

5.3.2.2 Polimorfismo o tasa de polimorfismo Pj: Teniendo en cuenta que todos los *loci* analizados presentaron más de un alelo por *locus* se considera que todos son polimórficos ya que para que un gen sea polimórfico en una población debe existir más de un alelo, además la frecuencia de uno de sus alelos debe ser menor o igual a 0.95. $P_j = q \leq 0.95^{92}$.

Con los datos de frecuencias alélicas y número promedio de alelos por *locus* se encontró que el porcentaje de polimorfismo en las poblaciones naturales es mayor (93,75%) que en las de cultivo (68,75%), lo que es completamente lógico ya que estas últimas no están expuestas a muchos factores cambiantes en las regiones naturales. Esta afirmación se explica con base a la dependencia de la variación genética con la historia y el medio ambiente, es decir que se espera que una población natural por estar expuesta a un mayor número de condiciones cambiantes, presente mayor polimorfismo como respuesta a los cambios generados en su entorno. Las poblaciones de cautiverio también están expuestas a algunos factores naturales, sin embargo, en este lugar se puede hacer un mayor control de ellos y por tanto estas poblaciones tenderán a tener un menor polimorfismo.

⁹² LYNCH, M y MILLIGAN, B.G. Op. Cit. pp. 169.

En la Bahía de Tumaco y las regiones cercanas los factores más relevantes que han influido en la diversidad genética son la sobreexplotación, la destrucción y contaminación de los hábitats naturales como la ocurrida el 3 de julio de 1998 donde fueron vertidos al Océano Pacífico 18 mil barriles de crudo tras una ruptura en el Oleoducto Transandino Ecuatoriano⁹³.

También se ha notado una disminución notable de especies que eran tradicionales en la zona costera, como por ejemplo el camarón tití (*Xiphopenaeus riveti*), el camarón tigre (*Trachypenaeus byrdi*), jaibas (*Callinectes sapidus*) peces como el pargo rojo (*Lutjanus peru*), la lisa (*Mugil cephalus*), la sierra (*Scomberomorus sierra*) y el canchimala (*Arius jordanii*). En este tipo de accidentes se sabe que usualmente se ven afectados desde huevos y larvas hasta animales adultos, pero es necesario un estudio más detallado para conocer la magnitud exacta del daño⁹⁴. Una presumible hipótesis para que no se haya evidenciado una disminución en la variabilidad genética de las poblaciones naturales de la Costa Pacífica Nariñense es que en Tumaco existen ensenas e islotes que pudieron proteger a esta especie creando nichos que no fueron afectados por el desastre.

Un estudio realizado por Fresneda⁹⁵ con *L. vannamei* en la costa Ecuatoriana reporta un porcentaje de polimorfismo entre 50 y 85,1% utilizando dos marcadores ISSRs. Estudios realizados en *L. vannamei*, *P. monodom* y *L. schmitti* utilizando RAPDs^{96, 97, 98, 99, 100, 101} reportaron entre 39% y 77% de bandas polimórficas.

Tassanakajon¹⁰² *et al*, reportaron 57.1% y Espinosa *et al*¹⁰³, reportan un 87,5% de polimorfismo en *L. schmitti*. En esta investigación se obtuvo un porcentaje de polimorfismo del 93,75% ya que se trabajó con *loci* reportados totalmente como polimórficos, lo cual hace en consecuencia, que el porcentaje de polimorfismo sea mayor. Por tanto es difícil comparar este valor con los de otros estudios, ya que algunos de ellos reportan haber trabajado con algunos *loci* monomórficos. Sin embargo se espera que resultados de polimorfismo con estudios en los cuales se utilizan aloenzimas sea menor que utilizando marcadores de ADN, porque estas

⁹³ <http://aupec.univalle.edu.co/informes/diciembre99/tumaco.html>

⁹⁴ TAVERA, H. Op. Cit. pp 2

⁹⁵ FRESNEDA, R.A. Op. Cit. pp 28.

⁹⁶ LESTER, J. L. Op. Cit. pp 54

⁹⁷ MULLER, J.C, y LATTE, B.D. Op. cit. pp 616.

⁹⁸ HARRIS, S.E.G., DILLION, R.T., SANDIFER, P.A. y LESTER. L.J. Electrophoresis of isozymes in cultured *Penaeus vannamei*. 1990, pp 330, 332.

⁹⁹ SUNDEN, S. L Y DAVIS, S. K. Op. Cit. p. 2.14

¹⁰⁰ BENZIE, J. A, BALLMENT, E. Y FRUSHER, S. Op. Cit. pp 300

¹⁰¹ GARCÍA, D. K, FAGGAR, M.A, RHOADES, L. Y ALCIVAR-WARREN. Op. Cit. pp 294

¹⁰² TASSANAKAJON, A., JARAYABHAND, P. y BOONSAENG, V. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 1997, pp 110-115.

¹⁰³ ESPINOSA, G, BECQUE, U. BORRELL, U. ROMO, J. DÍAZ, R. AZANZA, J. DE DIOS, R. Op.Cit. pp 780.

son marcadores presumiblemente sujetas a selección natural por lo cual su polimorfismo es más bajo que los ISSRs que son marcadores neutrales. Además en investigaciones como las de Lester¹⁰⁴, Muller y Latter¹⁰⁵, Harris *et al*¹⁰⁶, Sunden y Davis¹⁰⁷, Benzie *et al*¹⁰⁸, García *et al*¹⁰⁹, De la Rosa-Vélez *et al*¹¹⁰, Sugama *et al*¹¹¹, en las cuales utilizaron aloenzimas se observan porcentajes de polimorfismo inferiores (menores del 50%) que en el caso de ISSRs.

5.3.2.3. Heterocigosidad: La heterocigosidad es importante en poblaciones naturales, debido que aporta un gran espectro de genotipos para responder adaptativamente a cambios en las condiciones del medio. Adicionalmente individuos con mayores heterocigosidades, por lo general, son superiores en fertilidad y resistencia de enfermedades¹¹²

Se determinó que la proporción de *loci* polimórficos P (donde la frecuencia del alelo más común es 0.95), tiene un valor de 1 porque todos los *loci* analizados fueron polimórficos. En la Tabla N° 6 se observan los valores de variabilidad genética para las poblaciones estudiadas, destacándose la población natural de La Chorrera como la de mayor variabilidad (Hn.b = 0,4943± 0.17), con promedio de 3,12 alelos por *locus* y un polimorfismo de 100%, mientras que la población de Curay tiene la menor variabilidad (Hn.b = 0,4344± 0.20) con un promedio de 2,9 alelos por *locus* y un polimorfismo del 87,5%. Las poblaciones de cultivo muestran menor variabilidad con un promedio de (Hn.b = 0,316±0,26), con un promedio de 2,3 alelos por *locus* y polimorfismo debajo de 75%.

¹⁰⁴ LESTER, L.J. Op cit. pp 356.

¹⁰⁵ MULLER, J.C Y LATER, B.D. Op. Cit. pp 967.

¹⁰⁶ HARRIS , S.E.G., DILLION, R.T., SANDIFER, P.A. y LESTER. L.J. Op. Cit. pp 270.

¹⁰⁷ SUNDEN, S.L.Y DAVIS, S.K. Op. Cit. pp 211.

¹⁰⁸ BENZIE, J.A.H., FRUSHER, S. y BALLMENT, E. Op. Cit. pp 533.

¹⁰⁹ GARCIA, D.K., FAGGART, M.A., RHOADES, L. y ALCÍVAR-WARREN A. Op. Cit. pp 308.

¹¹⁰ DE LA ROSA-VELEZ, J., ESCOBAR-FERNANDEZ, R. CORREA, F. Op. Cit. pp 763.

¹¹¹ SUGAMA, K. BENZIE, J.A.H y BALLMER, E. Genetic variation and population structure of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Indonesia. 2002, pp 37, 205.

¹¹² BEARDMORE, J.A., MAIR, G.C. y LEWIS, R.I.. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. 1997, pp 829 - 839.

Tabla N° 6. Valores de heterocigosidad esperada (Hexp.) y heterocigosidad corregida (Hn.b) y polimorfismo de las poblaciones estudiadas en camarones *Litopenaeus vannamei* de la costa Nariñense.

POBLACIÓN	HETEROCIGOSIDAD Hexp.	HETEROCIGOSIDAD Hn.b	POLIMORFISMO %
Ensenada	0,4263 ± 0.20	0,4368± 0.21	87,5
Salahonda	0,4575 ± 0.16	0,4633± 0.17	100
Curay	0,4290 ± 0.20	0,4344± 0.20	87,5
Chorrera	0,4881 ± 0.16	0,4943± 0.17	100
Agromarina	0,3367 ± 0.28	0,3412± 0.28	62,5
Carbonera	0,2870 ± 0.24	0,2906± 0.24	75,0

Espinosa *et al*¹¹³ han reportado rangos de heterocigosidad para aloenzimas entre 0,26 y 0,35 y Fresneda¹¹⁴ entre 0,14 y 0,28, los cuales son valores altos, como los encontrados en poblaciones naturales de la región pacífica de Tumaco. Los valores de heterocigosidad encontrados en este trabajo, son más alto que los encontrados por Labacena¹¹⁵ *et al*, con He<0.2, lo mismo que con lo encontrado por Mato¹¹⁶ con 7 *loci* (He<0.3), ya que en el presente trabajo solo se trabajó con *loci* polimórficos, en cuyo caso el valor de heterocigosidad no es completamente comparable por no tomar en cuenta los *loci* tanto polimórficos como los monomórficos para estimar frecuencias alélicas¹¹⁷. Benzie *et al*¹¹⁸ encontraron a través de la técnica de aloenzimas, una variabilidad genética con heterocigosidades entre 0,045 y 0,103 en poblaciones australianas de camarón.

Cruz Hernández (2003) utilizando microsatélites como marcadores moleculares, en un programa de mejoramiento de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* encontró una variabilidad genética evaluada en términos de heterocigosidad Hn.b = 0.65 – 0.70, que son valores más altos que los reportados en esta investigación (Hn.b = 0,4572± 0.19) para las poblaciones naturales y de (Hn.b = 0,316±0,26) para las poblaciones de cultivo; estos valores se sitúan alrededor del valor promedio reportado para heterocigosidades observadas (Hn.b) para especie silvestres de peneidos (0,666) y por debajo del reportado para poblaciones cautivas (0.594) Benzie, (2000).

¹¹³ ESPINOSA, G.U., BECKER, U., BORELL, Y., ROMO, J., DIAZ, R., AZANZA, J. Y DE DIOS, R. Op. Cit. pp 549.

¹¹⁴ FRESNEDA, R. A. Op. Cit. pp 30.

¹¹⁵ LABASENA, M.E., TORRES, M. Y ESPINOSA, G. Op. Cit. pp 48.

¹¹⁶ MATO, J. L. Op. Cit. pp 46.

¹¹⁷ HARTL, D.L., y. CLARK A.G. Op. Cit. pp 325.

¹¹⁸ BENZIE, J.A.H.. Genetic improvement of prawns. 1998, pp 201, 425p.

5.3.2.4. Índice de fijación de Wright. (*Fst*): El índice estadístico *Fst*, mide el grado de diferenciación génica entre poblaciones en función de las frecuencias alélicas. El índice de Fijación *Fst* promedio en las poblaciones naturales de camarón blanco *L. vannamei* de la región de Tumaco indica que existe una diferenciación media entre las poblaciones estudiadas, ya que valores de *Fst* que van desde 0,29 a 0,59 indican una diferenciación genética poblacional media.

Tabla N° 7. Estimados de índice de diferenciación (*Fst*) por población y por *locus* de *L. vannamei* estudiadas, con base en 8 *loci* aloenzimáticos.

LOCUS	<i>MDH</i>	<i>ALD</i>	<i>EST</i>	<i>P.A</i>	<i>GDH</i>	<i>AMI</i>	<i>PER</i>	<i>LDH</i>	Promedio por población
POBLACIONES	(<i>Fst</i>)								
ENSENADA	0,631	0,140	0,083	0,599	0,694	0,402	0,207	0,164	0,365
SALAHONDA	0,627	0,111	0,036	0,640	0,669	0,575	0,220	0,011	0,361
CURAY	0,583	0,127	0,074	0,544	0,189	0,540	0,220	0,182	0,308
CHORRERA	0,630	0,166	0,0824	0,525	0,809	0,613	0,199	0,184	0,401
AGROMARINA	0,377	0,153	0,0584	0,645	0,626	0,396	0,184	0,179	0,327
CARBONERA	0,592	0,155	0,085	0,468	0,657	0,389	0,079	0,165	0,324

El valor de $Fst = 0.359$ encontrado en este estudio para poblaciones naturales se puede comparar con otros realizados en *F. californiensis* ($Fst = 0,182$), *L. stylirostris* ($Fst = 0,372$)¹¹⁹ y *F. notialis* ($Fst = 0,13$)¹²⁰ con los cuales se llegó a la conclusión de la existencia de una divergencia entre poblaciones de las especies mencionadas. En cambio en otras especies de Peneidos se han reportado baja o nula diferenciación poblacional. Espinosa¹²¹ encontraron *Fst* entre 0,005 y 0,050 a través de aloenzimas y microsátélites en poblaciones de *L. schmitti*¹²² y en *Pandalus borealis* reportan $Fst = 0,01$ sobre todos los *loci* estudiados estos resultados son diferentes a los encontrados en esta investigación en parte a que se considera que las poblaciones naturales de la costa pacífica nariñense se las puede considerar como "vírgenes" debido a que estas especies no han sido explotadas de la forma en que lo hacen en otros países.

¹¹⁹ DE LA ROSA-VELEZ. Op. Cit. pp 154

¹²⁰ GARCÍA-MACHADO, E., A. ROBAINAS, G. ESPINOSA, M., J. PÁEZ, N., y MONNEROT, Op. Cit. pp 704.

¹²¹ ESPINOSA. Op. Cit. pp 231.

¹²² SÉVIGNY, J.M., SAVARD, L. y PARSONS, D.G. Genetic characterization of the northern shrimp, *Pandalus borealis*, in the northwest Atlantic using electrophoresis of enzymes. Journal of Northwest Fisheries Sciences. 2000, pp 161, 175.

Tabla N° 8. Estimados de índice de diferenciación (**Fst**) por pares de poblaciones (sobre la diagonal) y flujo genético (**Nem**) (bajo la diagonal) para las poblaciones de *L. vannamei* estudiadas, con base en 8 loci aloenzimáticos.

	Ensenada	Salahonda	Curay	Chorrera	Agromarina	Carbonera
Ensenada	-----	0.183	0.374	0.182	0.371	0.364
Salahonda	1.12	-----	0.369	0.176	0.343	0.392
Curay	0.42	0.43	-----	0.304	0.495	0.489
Chorrera	1.12	1.17	0.57	-----	0.316	0.337
Agromarina	0.42	0.48	0.26	0.54	-----	0.385
Carbonera	0.44	0.39	0.26	0.49	0.40	-----

El índice de diferenciación de Wright *Fst*, calculado con aloenzimas entre pares de poblaciones, es un parámetro poco utilizado en los trabajos poblacionales del camarón blanco *L. vannamei* pero nos da una idea de la diferenciación o la correlación de pares de alelos entre las poblaciones apareadas. Espinosa *et al*¹²³ hace referencia a este índice para pares de poblaciones de *L. schmitti* cubano encontrando valores entre 0,021 y 0,038 utilizando ISSRs, lo que contrasta con los valores encontrados en este trabajo que van entre 0.176 y 0.374 comparando pares de poblaciones naturales de la región pacífica de Nariño.

Los índices *Fst* encontrados entre poblaciones se podrían interpretar como que existe una diferenciación genética baja entre la mayoría de poblaciones naturales, aunque es de destacar que la población de Curay tiene la más alta diferenciación con las demás poblaciones, tanto naturales como de cultivo, con índices entre 0.304 y 0.374 en las poblaciones naturales y de 0,489 en la población de cultivo de La Carbonera.

Si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero, si hay poco flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente. Cuánto flujo génico se requiere para impedir la evolución independiente en poblaciones locales diferentes, depende de qué otras fuerzas se encuentren actuando. Valores menores que 1 nos dan idea de alta diferenciación entre poblaciones y mayores que 1 informan de una diferenciación media¹²⁴.

¹²³ ESPINOSA, G, BECQUE, U. BORRELL, U. ROMO, J. DÍAZ, R. AZANZA, J. DE DIOS, R. Variación genética y morfológica en poblaciones naturales y cautivas del Camarón Blanco *Litopenaeus schmitti* en Cuba. Civa, 2002, pp 778. 784.

¹²⁴ SLATKIN, M. Gene flow and population structure. En Ecological Genetics, Editado por L. Real. Princeton. 1994

Los valores de flujo genético Nem están concordantes con la diferenciación genética que hay entre las poblaciones naturales y de cultivo. Los valores más bajos de flujo genético están entre los pares de poblaciones que involucran a la población de Curay y la Ensenada. El índice de flujo genético más alto entre los pares de poblaciones naturales está entre Salahonda y La Chorrera, regiones del litoral que están bastante cercanas y que lógicamente se podría presentar migración de individuos entre las dos.

La principal razón para aislar las poblaciones es la presencia de una barrera física importante entre ellas, que impide el flujo genético. Sin embargo en este trabajo se establece que la diferenciación genética entre las poblaciones naturales y las de cultivo no es muy grande debido a que los progenitores de las poblaciones de cultivo han sido adaptados de ejemplares de diferentes poblaciones naturales de varias zonas de Colombia y del Ecuador (información personal).

Los valores de Fst incluidos en el análisis de datos muestran una diferenciación conjunta medianamente significativa lo cual es indicativo de la existencia de una heterogeneidad genética consistente.

5.3.2.5. Distancias genéticas de Nei (1978)¹²⁵: La distancia genética encontrada (Tabla N° 9) al comparar las poblaciones naturales en estudio resultó ser relativamente alta, con un valores de 0.228 entre las poblaciones de Ensenada y Salahonda y de 0.681 entre las poblaciones de Ensenada y Curay. Esto en comparación de lo que reporta Fresneda¹²⁶ con poblaciones de *L. vannamei* de la costa ecuatoriana, con la distancia genética más alta reportada que es de 0,028 entre las localidades de Nicaragua y Atacames (Norte de la costa Ecuatoriana) utilizando ISSRs. Es posible que la diferencia se deba a que en dicho trabajo se reporta que muestrearon ejemplares que provenían de granjas de cultivo. Igualmente, los valores de distancias genéticas entre las poblaciones naturales pareándolas con las de cultivo resultaron más altos, y fluctúan entre 0.355 y 1.017.

¹²⁵ NEI, M. Op. Cit. pp 569

¹²⁶ FRESNEDA, R. A. Op. Cit. pp 32.

Tabla N° 9. Distancias genéticas de Nei 1978, entre pares de poblaciones de camarón blanco *L. vannamei* de la región pacífica nariñense.

	Chorrera	Salahonda	Curay	Agromarina	Carbonera
Ensenada	0.246	0.228	0.661	0.474	0.380
Chorrera	--	0.237	0.501	0.419	0.403
Salahonda	--	--	0.681	0.452	0.505
Curay	--	--	--	1.017	0.815
Agromarina	--	--	--	--	0.355
Carbonera	--	--	--	--	--

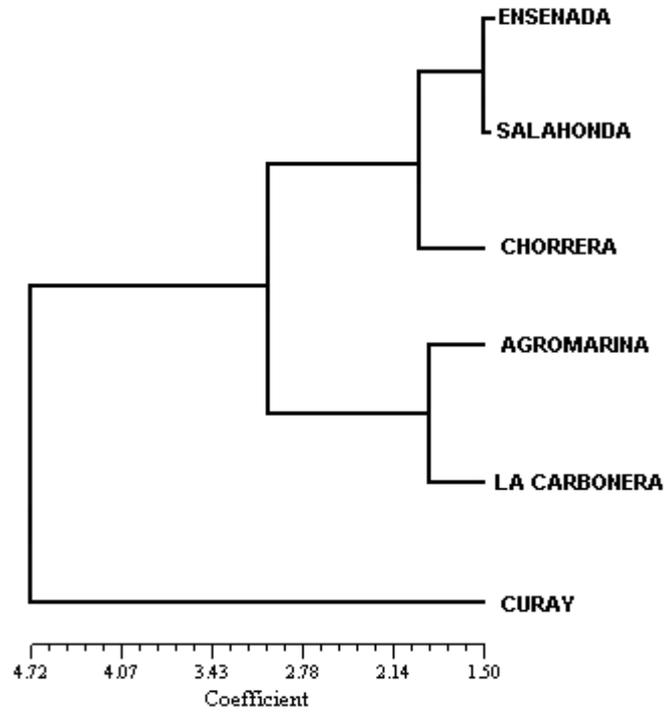
Sin embargo, los datos nos dicen que a pesar de que los sitios geográficos no son demasiado alejados; como Ensenada-Salahonda 16 millas, Ensenada-Chorrera 25 millas, Ensenada – Curay 13 millas, las distancias genéticas si son altas, pudiéndose plantear la pregunta que si las barreras naturales como las corrientes y los derrames de productos contaminantes han hecho que se produzca una diferenciación genética entre ellas.

En el trabajo de Espinosa *et al*¹²⁷ con camarón *L. schmitti* cubano con marcadores de aloenzimas, se plantean distancias genéticas entre poblaciones un poco más alejadas geográficamente que las de este trabajo, del orden de 0.076 a 0.097, que indican una gran similitud entre ellas, lo que contrasta con distancias que se encontraron entre las poblaciones más alejadas genéticamente que son del orden de 0.228 y 0.681.

Con lo valores de distancias genéticas encontrados, se construyó un dendrograma con el método UPGMA (Figura N° 14), mostrando una estructura sencilla de distribución de las poblaciones, donde las poblaciones de Salahonda y la Ensenada están más cerca genéticamente que La Chorrera y más alejadas de la población de Bocas de Curay. Igualmente se muestra que las poblaciones de cultivo son más cercanas entre sí, que con las poblaciones naturales especialmente con la población de Curay, la figura N° 14 muestra que la mayor heterogeneidad genética se da en la población de Curay ya que se separa ostensiblemente del resto, probablemente lo que está ocurriendo es un proceso de especiación o formación de subespecie; para ello sería conveniente analizar aloenzimas relacionadas al metabolismo reproductivo o con efectos en la descendencia de la especie.

¹²⁷ ESPINOSA. Op. Cit. pp 231

Figura N° 14. Dendrograma que relaciona los Valores de distancia genética de Nei (1978), calculados sobre la base de 8 *loci* enzimáticos en la especie de *L. vannamei* según el método UPGMA.



6. CONCLUSIONES

En general, todos los sistemas enzimáticos analizados resultaron ser polimórficos presentando suficiente actividad y definición en los tejidos analizados, generando un total de 30 movilidades electroforéticas. En algunas poblaciones, ciertos sistemas fueron monomórficos.

La variabilidad genética evaluada en términos de heterocigosidad promedio (Hn.b) para las poblaciones naturales es de $0,4572 \pm 0,19$ y para las poblaciones de cultivo es de $0,316 \pm 0,26$. Estos valores se sitúan alrededor del valor observado (Hn.b) promedio reportado para especies silvestres (0,666) y por debajo del reportado en especies cautivas (0,594) Benzie, (2000); con un promedio de alelos por *locus* para las poblaciones naturales de 2,8 alelos en los 8 *loci* analizados y con un menor promedio de alelos por *locus* de 2,3 para las poblaciones de cultivo. El porcentaje de polimorfismo de 93,75% para las poblaciones Naturales y de 68,75% para las poblaciones de cultivo. Todo esto indica que existe una alta variabilidad en las poblaciones naturales, siendo este factor importante en programas de mejoramiento genético.

Se evidencia que existe una cierta diferenciación entre las poblaciones naturales estudiadas, ya que el índice de Fijación *Fst* tiene un valor alto, en comparación con estudios similares realizados en otras poblaciones de camarones. Es de destacar que la población de Curay presenta mayor diferenciación con las demás poblaciones, tanto naturales como de cultivo y las más semejantes resultaron las de La Ensenada y Salahonda.

Los valores de flujo genético *Nem* y de distancia genética están concordantes con la diferenciación genética (*Fst*), que hay entre las poblaciones naturales y de cultivo. Los valores más bajos de flujo genético están entre los pares de poblaciones que involucran a la población de Curay. El índice de flujo genético más alto está entre las poblaciones naturales de Salahonda y La Chorrera. De igual manera las distancia genéticas entre las poblaciones de Ensenada y Salahonda (0.228) resultó ser la menor y entre La Ensenada y Curay la mayor (0.681)

El análisis realizado nos lleva a concluir que las poblaciones naturales de *L. vannamei* de la región pacífica nariñense (Tumaco), presentan un alto potencial genético, especialmente la población de La Chorrera que podría ser apta para iniciar un programa de domesticación.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda hacer un estudio más detallado para lograr implementar un programa de mejoramiento genético, ya que el presente estudio solo nos da una información del potencial genético de las poblaciones estudiadas y teniendo en cuenta que la técnica de Electroforesis de aloenzimas Multilocus tiene limitaciones en cuanto al número de *loci* analizados y a la baja diversidad genética en comparación con marcadores de ADN, se sugiere utilizar técnicas basadas en la variación de ADN, como microsatélites ISSR, AFLP, RFLP, RAMS, entre otras, ya que presentan una mayor información y densidad de mapeo.

Es importante también obtener mayor número ejemplares en las poblaciones para establecer parámetros genéticos más precisos y evitar sesgos en los resultados.

BIBLIOGRAFIA

- AGUILERA, María. Los Cultivos de Camarones en la Costa Caribe Colombiana. Cartagena, 1998, pp 22.
- ALONSO, B.M., JOO, L. Y ESPINOSA, G. Análisis Electroforético y caracterización bioquímica de las esterasas del músculo en *Penaeus notialis* y *Penaeus schmitti*. 1987, pp 21, 74.
- ALVARADO. R, COVEL. C, FRIEDEL. H Y RINGUELET, R. Enciclopedia El mundo de los animales. Madrid. 1989, pp 9, 118, 129.
- AVISE, J.C. Molecular Markers, natural history and evolution. 1994, pp 109, 158, 214
- BEARDMORE, J.A., MAIR, G.C. y LEWIS, R.I.. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. 1997, pp 829-839.
- BELKIR, K., BORSA, P., GOUDET, J., CHIKNI, L., Y BONHOMME, F. GENETIX, logiciel sous Window TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier (France). 1998, pp 251
- BENZIE, J.A.H.. Genetic improvement of prawns. 1998, pp 201, 300, 425, 533.
- BENZIE J.A.H. Population genetic structure in penaeid prawns. Aquaculture. 2000, pp 31, 95 – 119
- BEROVIDES, V. y ALFONSO, M. Biología Evolutiva. 1995, pp 114, 680.
- BOSCHI, E.E., M.A. SCALZO Y B. GOLDSTEIN. Desarrollo larval de dos especies de crustáceos Decápodos en el laboratorio *Pachycheles haigae* Rodrigues Da Costa (Porcellanidae) y *Chasmagnathus granulata* Dana (Grapsidae). Bol. Inst. Biol. Marina, Mar del Plata, 1967, pp 57 – 61.
- CARR. W.K, FJALESTAD, D. GODIN, J. SWINGLE, J. SWEENEY, y GJEDREM, T. Genetic variation in weight and survival in a population of specific pathogen-free shrimp. 1996, pp 114, 526.
- CENTRO CONTROL Y CONTAMINACIÓN DEL PACÍFICO CCCP. Bahía de Tumaco. 1994.
- COLCIENCIAS. Agenda y novedades. www.Colciencias.Com. Septiembre 18 del 2003, pp 29.

DAVIS, B. J. DISC. Electroforesis, Parte II". Ann N. Y. Acad. Sci. 1964, pp 121, 402-421, 687.

DE LA ROSA-VELEZ, J., ESCOBAR-FERNANDEZ, R. CORREA, F. Genetic structure of two commercial *Penaeids* from the gulf of California, as revealed by allozyme variation. 2000, pp 154, 674, 763, 883.

DELGADO Flor., 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. 2006, pp 43, 46.

ESPINAL C. y Col. La cadena de camaron de pesca en colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991 – 2005) Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia

ESPINOSA, G.U., BECKER, U., BORELL, Y., ROMO, J., DIAZ, R., AZANZA, J. Y DE DIOS, R. Variación genética y morfológica en poblaciones naturales y cautivas de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en Cuba. 2002, pp 231, 549, 778 – 784, 980, 984.

ESPINOSA, G., R. DÍAZ-FERNÁNDEZ, U. BEQUER, J. MATOS, J. ROMO y Y. BORRELL. Análisis poblacional del camarón blanco cubano (*Litopenaeus schmitti*) utilizando aloenzimas como marcadores genéticos. Rev. Invest. Mar., 2003, pp 24 (1): 11-16.

ESTOUP, A., ROUSSET, F., MICHALAKIS, Y., COURNUET, J. M., ADRIAMANGA, M. y GUYOMARD, R. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: un case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). 1998, pp 339, 553.

FALCONER, D Y MACKAY. Introduction to quantitative genetics. 1996, pp 2110, 4646.

FARFÁN Maribel., Estudio de la Estructura Genética de Poblaciones de *Vibrio cholerae*. Barcelona 2002, pp 71, 72, 74.

FENUCCI J. Manual para la Cria de Camarones Peneidos Depósitos de documentos de la FAO.1988, pp 25, 26

FRESNEDA, R.A. "Determinación de la estructura poblacional de *Litopenaeus vannamei* mediante ISSRs a lo largo de la costa ecuatoriana". Guayaquil. Ecuador. 2003, pp 15, 28, 30, 69.

- GARCIA, D.K., FAGGART, M.A., RHOADES, L. y ALCÍVAR-WARREN A. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. 1994, pp 270, 294, 308, 330, 340, 349.
- GARCÍA, MACHADO, E., A. ROBAINAS, G. ESPINOSA, M. OLIVA, J. PÁEZ, N. VERDECIA Y M. MONNEROT. Allozyme and mitochondrial DNA variation in Cuba populations of the shrimps *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea: Decapoda). Mar. Biol., 2000, pp 138, 701-707.
- GARCIA, M., GRIJALVA, M. Variabilidad y diferenciación genética en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de bajo y alto crecimiento, Ciencias marinas, Universidad Autónoma de Baja California, México, 2006, pp 66.
- GRANT W. S. Y UTTER, F. M. Biochemical genetic variation in walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) and population structure in the southern Bering Sea and Gulf of Alaska. Can. 1980, pp 1093, 1100.
- GRIFFITHS, A.J., GELBART, W.M. MILLER, J.H y LEWONTIN, R.C. Modern Genetic Analysis. 1999, pp 21, 301, 612.
- HARRIS , S.E.G., DILLION, R.T., SANDIFER, P.A. y LESTER. L.J. Electrophoresis of isozymes in cultured *Penaeus vannamei*. 1990, pp 270,330, 332.
- HARTL, D.L Y CLARK, A.G.. Principles of Population Genetics. Associates, Massachusetts.1997, pp 110, 115, 201, 325.
- HASSON, K., LIGHTNER, V., POULOS, T., REDMAN, M., WHITE, L., BROCK, J. Y BONAMI, J. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. Diseases of Aquatic Organisms. 1995, pp 23, 115-126.
- HOELZEL, A.R. Molecular Genetic Analysis of Populations, a Practical Approach. 1998, pp 236, 612.
- INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI. Colombia. Mapa de Ensenada de Tumaco.
- INSTITUTO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA –INPA-Camarón de cultivo, 2000.
- KING, J.D Y OHTA, T.H. Polyallelic mutational equilibrium. Genetics. 1975, pp 79, 215, 243.
- KREITMAN, M., y AKAHI, H. Molecular evidence for natural selection. Annual Review of Ecology Systematic 1995, pp 403, 422.

- LABACENA, M. E., TORRES, M. Y ESPINOSA, G. Variabilidad y distancia genética en especies de *Penaeus*. Rev. Invest. Mar, 1994, pp 15, 23, 36, 48, 60.
- LIGHTNER, D. V. Disease of cultured penaid shrimp. In Crustacean Acuaculture. Boca Ratón, Florida. 1992, pp 167, 230, 289, 540.
- LESTER, L.J Y PANTE M.J. Genetics of *Penaeus* species. 1992, pp 29, 35, 54, 152, 356.
- LESTER, L.J. Population genetics of Peneids shrimps from de Gulf of México. J. Hered. 1979, pp 175, 480.
- LUQUE, E. Bioquímica estructural. Universidad de Nariño. Pasto. 1995, pp 245, 268.
- LYNCH, M y MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. 2002, pp 169, 241.
- MATO, J. L. Distancia y variabilidad genética entre poblaciones de *Penaeus schmitti*. Trabajo de Diplomado. Univ. de La Habana. 1992, pp 46.
- MORIZOT, D. C. y SCHMIDT, M. E. Starch gel electrophoresis and histochemical visualization of proteins. Electric and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management. U.S.A. 1990, pp 25, 218
- MULLER, J.C Y LATER, B.D. Genetic variation and evolutionary relation shrimps within a group of thirty species of *Penaeid* prawns. 1980, pp 610, 904, 967, 1916.
- NEI, M. Estimation of heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. 1978, pp 114, 569, 583.
- NUEZ, F. Y CARRILLO, J.M.. Los Marcadores Genéticos en el Mejoramiento Vegetal Y Animal. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 2000, pp 45.
- PARK, L. Y MORAN, P. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. Molecular Genetics in Fisheries. Chapman and Hall, edits. London, 1995, pp. 1 - 22.
- PASDAR, M., PHILIP, D.P., Y WHITT, G.S. Linkage relationships of nine enzyme *loci* sunfishes (Iepomis; centrarchidae). Genetics. 1984, 435, 1446.
- PEREZ, FARFANTE, I. Y KENSLEY, B. *Penaeoids* and *Sengestoid* shrimp and prawns of the World. Keys and diagnoses for the families and genera. Leiden: universal books services, 1997, pp 157

- PHILIPP, D.P., J.M. EPIFANIA, y M.J.. Point/counterpoint: conservation genetics and current stocking practices- are they compatible? *Aquatic Fisheries Sciences*. 1993, pp 15, 369.
- QUELLER, D.C., STRASSMAN J.E. y HUGHES C.R. Microsatellites and kinship. Elsevier Science publishers. Ltda. 1993, pp 21, 54.
- RICHARDSON, B.U., BAVERSTOCK, P.R. Y ADAMS, M. A handbook for animal systematics and population studies. Academic Press. New York. 1986, pp 87, 258.
- RYMAN, N. Genetic Population Structure. 1997, pp 210, 538.
- ROSENBERRY, B. World Shrimp Farming 2004. Shrimp news international. Información de internet.
- SANTANA, M.O. Evaluación de la estructura genética entre poblaciones naturales y de cultivo del camarón blanco *Penaeus schmitti* del Golfo de Guacanayabo. Trabajo de Diploma. Univ. de La Habana. 1994.
- SBORDONI, V., DE MATTHAIES, M., COBOLLI, G., LA ROSA, G. Y MATTOCIA, M. Genetics changes in seven generations of hatchery stock of the kumura prawn *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Selec. Hybr. and Genet. Engin.* In *Aquac.* 1987, pp 1, 143-155.
- SÉVIGNY, J.M., SAVARD, L. y PARSONS, D.G. Genetic characterization of the northern shrimp, *Pandalus borealis*, in the northwest Atlantic using electrophoresis of enzymes. *Journal of Northwest Fisheries Sciences*. 2000, pp 161, 175.
- SLATKIN, M. Gene flow and population structure. En *Ecological Genetics*, Editado por L. Real. Princeton. 1994.
- SNEATH, P. H. y Sokal, A. Numerical Taxonomy. San Francisco. 1973. Freeman
- STURTEVANT, A.H.A. History of Genetic. 2001, pp 136, 187, 690.
- SUGAMA, K. BENZIE, J.A.H y BALLMER, E. Genetic variation and population structure of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Indonesia. 2002, pp 37, 205.
- SUNDEN, S.L.Y DAVIS, S.K. Evaluation of genetics in a domestic population of *Penaeus Vannamei* (Boone): A comparison with three natural populations. *Aquaculture*. 1991, pp 35, 131, 211, 214, 520, 521, 772.
- TAM, Y.K, Y CHU, K.H. Eletrophoretic study on the phylogenetic relation shirimps of some species of *Penaeus* and *metaPenaeus* from the south China sea. *Journal crustacea biology*. 1993, pp 697,705.

TASSANAKAJON, A., JARAYABHAND, P. y BOONSAENG, V. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1997 pp 110-115.

TAVERA, H. En cercanías de Tumaco crudos indicios de contaminación. AUPEC-Univalle. Cali Colombia. 1999, pp 2, 42.

THOMPSON, J. S Y THOMPSON, M. W. *Genética Médica*. 1975, pp 36, 1120.

VÁZQUEZ, A. *Ecología y Formación Ambiental*. 1993, pp 64, 211.

WARD, R Y GREWE, P. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Molecular Genetics in Fisheries*. Chapman and Hall, edits. London. 1995, pp 29, 213, 346.

WEIR, B. C. Y COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. 1984, pp 1358, 1370.

WYBAN, J.A., J.S. SWINGLE, J.N. SWEENEY, y G.D. Specific pathogen-free *Penaeus vannamei*. 1993, pp 39, 145.

ANEXOS

Anexo A. pesos y tallas de las muestras de camarón *L. vannamei* de poblaciones naturales de la costa Pacífica de Nariño.

ENSENADA DE TUMACO				
EJEMPLAR	PESO (g)	LONGITUD (cm)		
	TOTAL	CEFALOTORAX	ABDOMEN	TOTAL
1.	55,4	9	13,4	22,4
2.	54	8,5	12,5	21,0
3.	57,3	9	13,2	22,2
4.	83,6	12	15	27,0
5.	79	10	14,8	24,8
6.	41,6	6,5	9,5	16
7.	45,5	6,5	10	16,5
8.	57,5	8,5	12,5	21
9.	50	8,8	10,9	19,7
10.	59	8	13	22
11.	73,5	9	16	25
12.	46	7,5	13,5	21
13.	74	10	15	25
14.	82,1	12	15	27
15.	53,6	8,5	12,2	20,7
16.	47,5	7	13,7	20,7
17.	47,8	7	13,8	20,8
18.	83,8	12	15,5	27,5
19.	52	9	12,5	21,5
20.	68	9,5	13,5	23
21.	65,4	9,8	14,2	24

LA CHORRERA				
EJEMPLAR	PESO (g)	LONGITUD (cm)		
	TOTAL	CEFALOTORAX	ABDOMEN	TOTAL
1.	66,3	8,7	14,3	23
2.	33,5	6,2	12,3	18,5
3.	41,4	8,1	11,2	19,3
4.	53,8	7,5	13,5	21
5.	36,9	4,8	12,6	17,4
6.	58	8,7	13,3	22
7.	42,9	8	11	19
8.	44,6	7,7	12,3	20
9.	54,8	8,7	13,8	22,5
10.	56,7	7,8	13,2	21
11.	43,4	7,3	11,5	18,8
12.	41	6,2	10,8	17
13.	51,6	8	13	21
14.	61	9,8	13,9	23,7
15.	53	6,9	13,5	20,4
16.	45,3	8,5	10,7	19,2
17.	59	9,7	12,3	22
18.	48,5	9,6	11,9	21,5
19.	37,5	5,9	12,1	18
20.	41,8	8,3	10,4	18,7
21.	60	8,9	13,6	22,5
22.	62,9	9,2	13,9	23,1
23.	50	7,4	13,6	21
24.	50,6	7,5	13,8	21,3
25.	48,7	6,9	12,9	19,8
26.	68	9,5	15	24,5
27.	38,4	8	10,6	18,6
28.	40	7,2	12,2	19,4
29.	45,1	7,6	12,6	20,2
30.	38,6	5,9	11,9	17,8
31.	64,2	8,9	14,9	23,8
32.	35,5	4,8	12,1	16,9
33.	34	5,5	11,7	17,2
34.	75,1	10,5	15,3	25,8
35.	41	7,7	11,5	19,2
36.	50,3	7,6	13,8	21,4
37.	37,6	7,8	11,2	19
38.	34,8	6,1	10,4	16,5
39.	50	8,2	12,6	20,8
40.	44,7	9,2	10,4	19,6

CURAY				
	PESO (g)	LONGITUD (cm)		
EJEMPLAR	TOTAL	CEFALOTORAX	ABDOMEN	TOTAL
1.	40,3	6,9	10,9	17,8
2.	37,9	7,3	9,5	16,8
3.	34,1	7,2	8,7	15,9
4.	29,8	7,4	6,4	13,8
5.	33	7,3	8,8	16,1
6.	27,8	6,7	6,2	12,9
7.	31,3	7	7,5	14,5
8.	39	7,8	8,9	16,7
9.	37,2	8	7,6	15,6
10.	35,1	7,7	7,4	15,1
11.	32,7	7,8	6,6	14,4
12.	20,5	5,9	6	11,9
13.	43,2	9,5	9,1	18,6
14.	45,8	9,6	9,3	18,9
15.	34	7,2	7,5	14,7
16.	42,4	9,2	9,3	18,5
17.	61	10,4	13,3	23,7
18.	35	7,5	10,5	18
19.	40,3	7,5	11	18,5
20.	27,2	6,8	6,3	13,1
21.	62,3	7,8	15,9	23,7
22.	31,6	6,5	11	17,5
23.	31,3	6,3	11,1	17,4
24.	30,7	5,8	10,6	16,4
25.	23,4	4,4	6,9	11,3
26.	47,8	8,9	10,3	19,2
27.	46,7	8,2	10,4	18,6
28.	25,2	4,6	7,9	12,5
29.	25,6	4,3	8,4	12,7
30.	33	7,2	10,7	17,9
31.	25,7	5	7,9	12,9
32.	42,8	7,4	11	18,4
33.	30,9	7,2	9,9	17,1
34.	47	8,5	10,4	18,9
35.	37,8	8,2	8,8	17
36.	39,4	8,3	9,2	17,5
37.	32,5	7,4	8,4	15,8
38.	32,5	6,8	9,2	16
39.	57,6	9,8	12,5	22,3
40.	43,1	8,7	10,2	18,9

SALAHONDA				
	PESO (g)	LONGITUD (cm)		
EJEMPLAR	TOTAL	CEFALOTORAX	ABDOMEN	TOTAL
1.	30,3	5,7	12,1	16,8
2.	50,2	6,5	12,8	19,3
3.	40,7	6,4	12,1	18,5
4.	43,5	6,5	13,0	19,5
5.	35,5	6,2	10,3	16,5
6.	60,1	7,5	15,5	23,0
7.	28,4	6,5	11,0	17,5
8.	32,6	7,0	11,4	18,4
9.	41,3	5,2	9,2	14,4
10.	22,3	6,0	9,4	15,4
11.	28,6	5,7	12,1	16,8
12.	33,5	6,4	10,6	17,0
13.	45,6	6,5	12,5	19,0
14.	38,1	6,3	12,1	18,4
15.	32,9	6,0	9,5	15,5
16.	62,1	8,4	15,9	24,3
17.	20,3	5,4	8,9	14,3
18.	46,3	7,5	11,9	19,4
19.	31,1	6,2	10	16,2
20.	44,1	7,5	10,5	18,0
21.	52,3	7,7	13,8	21,5
22.	24,3	5,7	9,6	15,3
23.	32,6	6,2	10,6	16,8
24.	31,5	6	9,9	15,9
25.	30,3	5,5	9,3	14,8
26.	10,2	3,2	5,5	8,7
27.	43,6	7,6	11,7	19,3
28.	24,3	6,1	9,4	15,5
29.	22,3	6,3	8,5	14,8
30.	19,3	5,6	8,1	13,7
31.	13,3	2,5	7,3	9,8
32.	28,4	6,7	9,2	15,9
33.	24,5	5,8	8,5	14,3
34.	22,3	5,9	9	14,9
35.	43,2	6,3	11,9	18,2
36.	30,4	6,1	9,7	15,8
37.	48,3	6,8	13,4	20,2
38.	50,3	7,8	13,7	21,5
39.	42	7,3	12,4	19,7
40.	38,7	6,5	12,0	18,5

Anexo B. pesos y tallas de las muestras de camarón *L. vannamei* de poblaciones de cultivo de la región de Tumaco.

AGROMARINA				
	PESO (g)	LONGITUD (cm)		
EJEMPLAR	TOTAL	CEFALOTORAX	ABDOMEN	TOTAL
1.	8,3	2	9	11
2.	10,7	3	11	14
3.	10,5	2	11	13
4.	11,4	4,5	8,0	12,5
5.	8	2	10	12
6.	9,9	2	10	12
7.	8,1	2	10	12
8.	8,3	4,5	8,7	13,2
9.	10,6	2	10	12
10.	9,1	4,0	6,5	10,5
11.	9,8	2	10	12
12.	7,5	2	10	12
13.	9,3	4,1	6,0	10,1
14.	10,1	2	11	13
15.	9,6	2	11	13
16.	9,6	4,3	6,9	11,2
17.	8,1	2	10	12
18.	9,4	2	11	13
19.	9,2	4,4	6,9	11,3
20.	9,2	2	11	13
21.	8,2	2	10	12
22.	8,9	2	10	12
23.	9	2	10	12
24.	7,6	2	9	11
25.	9,9	2	11	13
26.	8,9	4,6	8,8	13,4
27.	9,2	2	10	12
28.	8,8	5	9	14
29.	6,2	3	7	10
30.	9,1	4,7	7,8	12,5
31.	10,2	2	10	12
32.	9,2	2	10	12
33.	7,4	2	10	12
34.	6,3	4,0	7,6	11,6
35.	6,8	2	9	11
36.	7	4,2	7,4	11,8
37.	9,3	2	11	13
38.	8,9	3	8	11

LA CARBONERA				
	PESO (g)	LONGITUD (cm)		
EJEMPLAR	TOTAL	CEFALOTORAX	ABDOMEN	TOTAL
1.	6	2	6	8
2.	7	2	6,5	8,5
3.	5,8	2	6	8
4.	6,5	2	6	8
5.	10	3	10	13
6.	5,8	2	6	8
7.	7,5	3	7,5	10,5
8.	7,5	3	7,5	10,5
9.	8,4	3	8	11
10.	9,5	3	8	11
11.	11,7	3	10	13
12.	7	2	8,5	10,5
13.	8,1	3	8	11
14.	6,3	2	8,5	10,5
15.	8,1	3	8	11
16.	8,9	3	9	12
17.	9,5	3	9	12
18.	8,9	3	9	12
19.	6,9	2	8,5	10,5
20.	6,3	2	8	10
21.	7,9	3	8	11
22.	7,6	2	8	10
23.	7,5	2	8	10
24.	7,4	2	8	10
25.	8,5	3	9	12
26.	7,4	2	8,5	10,5
27.	11,3	3	9,5	12,5
28.	8,1	3	8	11
29.	7,9	3	8	11
30.	8,5	3	9	12
31.	6,7	2	8,5	10,5
32.	9	3	9	12
33.	6,9	2	8,5	10,5
34.	6,9	2	8,5	10,5
35.	9	3	9	12
36.	5,3	2	6	8
37.	10	3	10	13
38.	7,1	2	8,5	10,5
39.	7,4	2	8,5	10,5
40.	9,5	2,5	9	11,5

Anexo C. pesos y tallas ponderadas de las muestras de camarón *L. vannamei* de poblaciones naturales de la costa Pacífica de Nariño.

PESOS PODERADOS POBLACION DE LA ENSENADA

Limites de clase	Frecuencia	promedio	Fi*W
41.6-50.4	6	46.4	278.4
50.4-58.48	6	54.9	329.4
58.48-66.92	2	62.2	124.4
66.92-75.36	3	71.8	215.4
75.36-83.8	4	82.1	328.5
	21		$\Sigma=1276.1$

X ponderado= $1276/21=60.76$

S= ± 7.79

TALLA PODERADA POBLACION DE LA ENSENADA

Limites de clase	Frecuencia	promedio	Fi*W
16-18.3	2	16.25	35.5
18.3-20.6	1	19.7	19.7
20.6-22.9	10	21.33	213.3
22.9-25.2	5	24.36	121.8
25.2-27.5	3	27.2	81.6
	21		$\Sigma=468.9$

X ponderado= $468.9/21=22.32$

S= ± 4.72

PESOS PODERADOS POBLACION DE LA CHORRERA

Limites de clase	Frecuencia	promedio	Fi*W
33.5-40.43	10	33.5	335
40.43-47.36	10	43.1	431
47.36-54.29	9	50.7	456.3
54.29-61.22	6	58.3	349.5
61.22-68.15	4	65.3	261.4
68.15-75.1	1	75.1	75.1
			$\Sigma=1908.3$

X ponderado= $1908.3/40=47.70$
 S= ± 6.9

TALLAS PODERADAS POBLACION DE LA CHORRERA

Limites de clase	Frecuencia	promedio	Fi*W
16.5-18.05	7	17.25	120.75
18.05-19.6	10	18.97	189.7
19.6-21.15	10	20.48	204.8
21.15-22.7	7	21.81	152.6
22.7-24.25	4	23.41	93.6
24.25-25.8	2	25.15	50.3
	40		$\Sigma=811.75$

X ponderado= $811.75/40=20.29$
 S= ± 4.5

PESOS PODERADOS POBLACION DE CURAY

Limites de clase	Frecuencia	promedio	Fi*W
20.5-27.46	6	24.6	147.6
27.46-34.42	14	31.8	445.2
34.42-41.38	9	38	342
41.38-48.34	8	38.97	311.8
48.34-55.3	0	0	0
55.3-62.3	3	60.3	180.9
	40		$\Sigma=1427.5$

X ponderado= $1427.5/40=35.68$
 S= ± 5.97

TALLAS PODERADAS POBLACION DE CURAY

Limites de clase	Frecuencia	promedio	Fi*W
11.3-13.36	7	12.47	87.3
13.36-15.42	5	14.5	72.5
15.42-17.48	11	16.43	180.8
17.48-19.54	14	17.02	238.3
19.54-21.6	0	0	0
21.6-23.7	2	23	46
	40		$\Sigma=624.9$

X ponderado= $624.9/40=15.62$
 $S= \pm 3.95$

PESOS PODERADOS POBLACION DE SALAHONDA

Limites de clase	Frecuencia	promedio	Fi*W
10.2-18.85	2	11.75	23.5
18.85-27.5	8	22.45	179.6
27.5-36.15	13	31.23	406.1
36.15-44.8	9	41.68	375.2
44.8-53.45	6	48.80	292.83
53.45-62.1	2	61.1	122.2
	40		$\Sigma=1277.23$

X ponderado= $1277.23/40=31.93$ $S= \pm 5.65$

TALLAS PODERADAS POBLACION DE SALAHONDA

Limites de clase	Frecuencia	promedio	Fi*W
8.7-11.3	2	9.25	18.5
11.3-13.9	1	13.7	13.7
13.9-16.5	14	15.21	213
16.5-19.1	13	17.72	230.4
19.1-21.7	8	20.05	160.4
21.7-24.3	2	23.65	47.3
	40		$\Sigma=683.3$

X ponderado= $683.3/40=17.08$
 $S= \pm 4.13$

Anexo D. Matriz de alelos para las Poblaciones Naturales y de cultivo

	LDH	MDH	PER	AMI	P.A	ADH	GDH	EST
ENSENADA	110110	220220	320320	430430	520520	610610	710710	0
ENSENADA	110110	210210	330330	430430	510510	610610	720720	820820
ENSENADA	110110	220220	330330	430430	510510	610610	720720	820820
ENSENADA	120120	220220	320320	430430	510510	610610	720720	820820
ENSENADA	110110	220220	320320	430430	520520	620620	710710	820820
ENSENADA	110110	230230	320320	430430	510510	620620	720720	820820
ENSENADA	110110	220220	310310	430430	510510	630630	710710	820820
ENSENADA	120120	220220	330330	430430	520520	620620	710710	820820
ENSENADA	130130	220220	330330	430430	510510	620620	720720	830830
ENSENADA	130130	230230	310310	430430	510510	620620	720720	830830
ENSENADA	110110	220220	320320	430430	520520	620620	720720	830830
ENSENADA	130130	220220	330330	430430	510510	620620	720720	820820
ENSENADA	120120	220220	330330	430430	520520	620620	720720	820820
ENSENADA	130130	220220	320320	430430	520520	620620	720720	820820
ENSENADA	120120	210210	320320	430430	510510	620620	720720	820820
ENSENADA	120120	220220	320320	430430	510510	620620	720720	820820
ENSENADA	110110	210210	310310	430430	510510	620620	720720	830830
ENSENADA	130130	220220	320320	430430	510510	620620	720720	830830
ENSENADA	130130	220220	310310	430430	510510	620620	720720	830830
ENSENADA	120120	220220	320320	430430	510510	620620	710710	810810
ENSENADA	120120	230230	320320	430430	510510	620620	720720	810810
CHORRERA	120120	220220	320320	440440	520520	620620	720720	840840
CHORRERA	120120	220220	320320	440440	520520	620620	710710	840840
CHORRERA	130130	220220	310310	440440	520520	620620	710710	820820
CHORRERA	120120	220220	320320	430430	520520	620620	710710	830830
CHORRERA	120120	220220	320320	430430	520520	610610	720720	830830
CHORRERA	130130	210210	310310	430430	520520	610610	720720	830830
CHORRERA	110110	210210	320320	420420	520520	610610	720720	810810
CHORRERA	120120	220220	320320	420420	520520	610610	720720	830830
CHORRERA	110110	220220	330330	430430	520520	610610	720720	840840
CHORRERA	110110	220220	330330	420420	520520	610610	720720	830830
CHORRERA	130130	220220	330330	430430	520520	610610	730730	840840
CHORRERA	130130	220220	330330	430430	520520	620620	730730	830830
CHORRERA	120120	210210	330330	430430	520520	620620	720720	840840
CHORRERA	120120	220220	320320	420420	520520	610610	720720	840840
CHORRERA	120120	220220	310310	430430	520520	610610	730730	820820
CHORRERA	110110	220220	320320	420420	520520	610610	720720	820820
CHORRERA	120120	220220	310310	410410	530530	610610	720720	820820

CHORRERA	110110	220220	320320	420420	530530	610610	720720	810810
CHORRERA	120120	220220	320320	420420	530530	610610	720720	820820
CHORRERA	120120	220220	320320	420420	520520	620620	720720	830830
CHORRERA	130130	220220	320320	420420	520520	620620	720720	820820
CHORRERA	120120	230230	320320	430430	520520	620620	720720	820820
CHORRERA	120120	220220	320320	430430	520520	620620	720720	820820
CHORRERA	120120	220220	320320	430430	520520	620620	720720	840840
CHORRERA	110110	220220	320320	430430	520520	620620	720720	830830
CHORRERA	130130	220220	320320	430430	520520	620620	720720	830830
CHORRERA	120120	220220	330330	440440	530530	620620	730730	830830
CHORRERA	120120	220220	320320	440440	520520	620620	720720	830830
CHORRERA	120120	220220	320320	420420	520520	620620	720720	830830
CHORRERA	120120	220220	320320	420420	520520	620620	720720	830830
CHORRERA	110110	230230	320320	420420	520520	610610	730730	830830
CHORRERA	120120	220220	310310	420420	520520	610610	720720	810810
CHORRERA	130130	220220	320320	420420	520520	610610	730730	820820
CHORRERA	120120	220220	320320	420420	520520	610610	730730	820820
CHORRERA	120120	230230	330330	420420	520520	610610	730730	820820
CHORRERA	130130	230230	330330	420420	520520	610610	730730	820820
CHORRERA	120120	220220	320320	430430	520520	610610	730730	820820
CHORRERA	120120	220220	330330	430430	520520	610610	730730	820820
CHORRERA	120120	220220	330330	430430	520520	620620	730730	820820
CHORRERA	130130	220220	320320	430430	520520	620620	730730	820820
SALAHOND	130130	220220	310310	430430	530530	620620	720720	820820
SALAHOND	120120	210210	310310	430430	530530	630630	710710	820820
SALAHOND	130130	220220	310310	430430	540540	620620	720720	810810
SALAHOND	130130	220220	310310	430430	530530	620620	720720	830830
SALAHOND	130130	220220	320320	430430	520520	610610	710710	820820
SALAHOND	140140	220220	320320	430430	520520	610610	720720	820820
SALAHOND	130130	220220	320320	420420	530530	620620	720720	820820
SALAHOND	130130	210210	320320	420420	520520	620620	720720	830830
SALAHOND	130130	220220	310310	430430	530530	620620	720720	820820
SALAHOND	130130	220220	320320	430430	520520	630630	720720	820820
SALAHOND	130130	220220	320320	430430	530530	620620	720720	820820
SALAHOND	140140	220220	320320	430430	530530	630630	720720	830830
SALAHOND	130130	220220	330330	430430	530530	630630	720720	820820
SALAHOND	130130	220220	320320	430430	530530	630630	720720	820820
SALAHOND	130130	220220	310310	420420	520520	620620	720720	820820
SALAHOND	130130	220220	310310	420420	520520	620620	720720	820820
SALAHOND	120120	220220	320320	430430	540540	630630	720720	820820
SALAHOND	130130	210210	320320	420420	530530	610610	720720	810810

SALAHOND	130130	220220	320320	430430	530530	610610	720720	810810
SALAHOND	130130	220220	320320	430430	530530	630630	720720	810810
SALAHOND	140140	210210	320320	430430	530530	620620	720720	810810
SALAHOND	130130	220220	320320	430430	530530	620620	720720	810810
SALAHOND	120120	210210	330330	430430	530530	620620	720720	820820
SALAHOND	140140	220220	330330	430430	530530	630630	720720	810810
SALAHOND	130130	220220	320320	430430	540540	620620	720720	810810
SALAHOND	130130	220220	330330	430430	530530	620620	720720	830830
SALAHOND	140140	210210	320320	430430	520520	620620	720720	820820
SALAHOND	130130	220220	330330	430430	530530	630630	720720	820820
SALAHOND	130130	220220	340340	420420	520520	620620	720720	820820
SALAHOND	130130	220220	310310	420420	530530	620620	720720	820820
SALAHOND	120120	220220	320320	420420	530530	620620	720720	820820
SALAHOND	140140	220220	320320	420420	530530	630630	720720	820820
SALAHOND	130130	220220	320320	420420	530530	630630	720720	810810
SALAHOND	130130	210210	340340	420420	530530	630630	710710	810810
SALAHOND	130130	220220	330330	420420	520520	620620	720720	810810
SALAHOND	130130	220220	330330	420420	520520	620620	720720	810810
SALAHOND	130130	220220	310310	420420	520520	620620	720720	820820
SALAHOND	110110	220220	310310	420420	520520	620620	720720	820820
SALAHOND	140140	220220	320320	420420	520520	630630	720720	820820
SALAHOND	130130	220220	320320	420420	520520	630630	720720	820820
CURAY	120120	230230	320320	420420	530530	610610	730730	820820
CURAY	120120	240240	320320	420420	540540	610610	730730	820820
CURAY	130130	230230	320320	430430	540540	620620	730730	820820
CURAY	120120	230230	320320	430430	530530	620620	730730	820820
CURAY	120120	230230	320320	430430	530530	610610	730730	820820
CURAY	120120	230230	310310	430430	530530	610610	730730	830830
CURAY	130130	240240	310310	430430	530530	620620	730730	830830
CURAY	130130	210210	330330	420420	530530	620620	730730	820820
CURAY	120120	230230	320320	420420	530530	620620	730730	830830
CURAY	120120	230230	320320	420420	530530	620620	730730	820820
CURAY	120120	210210	330330	430430	530530	610610	730730	820820
CURAY	130130	230230	330330	430430	540540	610610	730730	820820
CURAY	120120	230230	340340	430430	530530	610610	730730	830830
CURAY	120120	230230	340340	430430	530530	610610	730730	820820
CURAY	120120	230230	340340	440440	530530	620620	730730	820820
CURAY	120120	220220	340340	440440	530530	610610	730730	830830
CURAY	120120	230230	320320	430430	530530	610610	730730	820820
CURAY	120120	230230	320320	430430	520520	610610	730730	830830
CURAY	120120	230230	340340	440440	530530	610610	730730	820820

CURAY	120120	240240	340340	420420	530530	610610	730730	820820
CURAY	130130	220220	340340	420420	530530	620620	730730	820820
CURAY	130130	230230	320320	430430	530530	620620	730730	820820
CURAY	120120	230230	320320	430430	540540	610610	730730	820820
CURAY	120120	210210	320320	420420	530530	610610	730730	830830
CURAY	130130	230230	340340	430430	530530	610610	730730	830830
CURAY	120120	230230	340340	430430	540540	610610	730730	820820
CURAY	120120	230230	340340	430430	530530	610610	730730	820820
CURAY	120120	240240	340340	430430	530530	610610	730730	820820
CURAY	120120	230230	330330	420420	540540	610610	730730	830830
CURAY	120120	230230	330330	420420	530530	610610	730730	820820
CURAY	0	230230	330330	430430	530530	610610	730730	830830
CURAY	130130	230230	340340	430430	530530	610610	730730	830830
CURAY	110110	220220	340340	430430	540540	620620	730730	820820
CURAY	110110	230230	340340	430430	530530	620620	730730	820820
CURAY	130130	230230	330330	430430	530530	610610	730730	830830
CURAY	110110	230230	330330	430430	530530	610610	730730	820820
CURAY	110110	240240	330330	430430	530530	610610	730730	820820
CURAY	110110	230230	330330	430430	530530	620620	730730	840840
CURAY	110110	220220	330330	430430	530530	620620	730730	820820
CURAY	120120	230230	330330	430430	530530	620620	730730	820820
AGROMARINA	120120	210210	310310	420420	520520	630630	720720	830830
AGROMARINA	110110	210210	310310	420420	510510	620620	720720	830830
AGROMARINA	120120	210210	320320	420420	510510	630630	720720	830830
AGROMARINA	120120	210210	320320	420420	510510	630630	720720	830830
AGROMARINA	120120	210210	310310	420420	520520	620620	720720	820820
AGROMARINA	110110	210210	320320	420420	510510	630630	720720	830830
AGROMARINA	110110	210210	320320	420420	520520	620620	720720	830830
AGROMARINA	120120	210210	320320	420420	510510	620620	720720	830830
AGROMARINA	120120	210210	310310	420420	510510	620620	720720	830830
AGROMARINA	120120	210210	310310	420420	510510	630630	720720	830830
AGROMARINA	130130	210210	310310	420420	510510	630630	720720	830830
AGROMARINA	120120	210210	310310	420420	510510	620620	720720	830830
AGROMARINA	120120	210210	310310	420420	510510	610610	720720	820820
AGROMARINA	120120	210210	320320	420420	510510	630630	720720	830830
AGROMARINA	120120	210210	330330	420420	520520	620620	720720	830830
AGROMARINA	120120	210210	320320	420420	510510	620620	720720	830830
AGROMARINA	130130	210210	320320	420420	510510	620620	720720	830830
AGROMARINA	130130	210210	320320	420420	510510	620620	720720	830830
AGROMARINA	110110	210210	320320	420420	510510	620620	720720	810810
AGROMARINA	120120	210210	310310	420420	510510	610610	720720	810810

AGROMARINA	120120	210210	310310	420420	510510	610610	720720	810810
AGROMARINA	120120	210210	320320	420420	510510	620620	720720	820820
AGROMARINA	130130	210210	310310	420420	510510	620620	720720	820820
AGROMARINA	130130	210210	320320	420420	510510	620620	720720	830830
AGROMARINA	120120	210210	320320	420420	520520	610610	720720	830830
AGROMARINA	140140	210210	320320	420420	510510	610610	720720	830830
AGROMARINA	130130	210210	310310	420420	520520	610610	720720	830830
AGROMARINA	130130	210210	310310	420420	520520	620620	720720	820820
AGROMARINA	120120	210210	310310	420420	520520	620620	720720	820820
AGROMARINA	130130	210210	310310	420420	520520	620620	720720	820820
AGROMARINA	120120	210210	310310	420420	530530	620620	720720	830830
AGROMARINA	120120	210210	320320	420420	520520	620620	720720	820820
AGROMARINA	120120	210210	320320	420420	520520	620620	720720	820820
AGROMARINA	130130	210210	320320	420420	520520	620620	720720	820820
AGROMARINA	120120	210210	330330	420420	520520	610610	720720	820820
AGROMARINA	120120	210210	320320	420420	520520	620620	720720	820820
AGROMARINA	120120	210210	320320	420420	520520	620620	720720	820820
AGROMARINA	120120	210210	330330	420420	510510	620620	720720	820820
CARBONERA	120120	220220	330330	420420	510510	610610	720720	820820
CARBONERA	120120	220220	330330	420420	510510	610610	720720	820820
CARBONERA	130130	220220	340340	420420	510510	610610	720720	820820
CARBONERA	120120	220220	340340	420420	510510	610610	720720	820820
CARBONERA	120120	220220	330330	420420	510510	610610	720720	820820
CARBONERA	120120	230230	330330	420420	510510	620620	720720	820820
CARBONERA	110110	220220	330330	420420	510510	620620	710710	830830
CARBONERA	110110	220220	340340	420420	510510	620620	720720	820820
CARBONERA	120120	220220	330330	420420	510510	620620	720720	820820
CARBONERA	120120	220220	330330	420420	510510	620620	720720	820820
CARBONERA	120120	220220	340340	420420	510510	610610	720720	820820
CARBONERA	120120	220220	340340	420420	510510	610610	720720	820820
CARBONERA	120120	220220	340340	420420	510510	610610	720720	830830
CARBONERA	120120	220220	340340	420420	510510	610610	720720	820820
CARBONERA	120120	220220	340340	420420	510510	610610	720720	830830
CARBONERA	120120	220220	340340	420420	510510	610610	720720	830830
CARBONERA	120120	220220	340340	420420	510510	610610	720720	830830
CARBONERA	120120	220220	330330	420420	510510	610610	720720	830830
CARBONERA	110110	230230	330330	420420	510510	620620	720720	830830
CARBONERA	130130	220220	330330	420420	510510	620620	720720	830830
CARBONERA	120120	220220	330330	420420	510510	620620	720720	820820
CARBONERA	120120	230230	340340	420420	510510	620620	720720	830830
CARBONERA	120120	220220	340340	420420	510510	610610	720720	830830
CARBONERA	130130	220220	340340	420420	510510	610610	720720	830830

CARBONERA	120120	220220	330330	420420	510510	610610	720720	840840
CARBONERA	120120	220220	330330	420420	510510	610610	730730	830830
CARBONERA	120120	220220	340340	420420	510510	620620	720720	830830
CARBONERA	120120	220220	340340	420420	510510	620620	720720	830830
CARBONERA	120120	220220	340340	420420	510510	620620	720720	830830
CARBONERA	120120	220220	340340	420420	510510	610610	720720	820820
CARBONERA	130130	220220	340340	420420	510510	610610	720720	820820
CARBONERA	130130	220220	340340	420420	510510	620620	720720	820820
CARBONERA	120120	220220	330330	420420	510510	620620	720720	820820
CARBONERA	120120	220220	330330	420420	510510	620620	720720	820820
CARBONERA	0	220220	330330	420420	510510	610610	720720	820820
CARBONERA	110110	220220	340340	420420	510510	610610	720720	820820
CARBONERA	110110	230230	340340	420420	510510	610610	720720	830830
CARBONERA	110110	220220	340340	420420	510510	620620	720720	820820
CARBONERA	110110	220220	330330	420420	510510	610610	720720	820820
CARBONERA	110110	220220	330330	420420	510510	620620	720720	830830
CARBONERA	110110	220220	340340	420420	510510	610610	720720	830830