

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Caracterización genética de líneas de reproductores de  
camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* en cultivo**

Tesis

Para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:

**Brenda Guadalupe Bonett Calzada**

Ensenada, Baja California, México

2017

Tesis defendida por

**Brenda Guadalupe Bonett Calzada**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz**  
Directora de tesis

**Dr. Miguel Ángel del Rio Portilla**

**Dra. María Clara Arteaga Uribe**

**M.C. Carmen Elvira Vargas Peralta**



---

**Dr. Jorge Cáceres Martínez**  
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*[Bonett Calzada Brenda Guadalupe © 2017](#)*

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Brenda Guadalupe Bonett Calzada**, como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

**Caracterización genética de líneas de reproductores de camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* en cultivo**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz  
Directora de tesis

El camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* es la especie más cultivada en todo el mundo; debido a la presencia de enfermedades en cultivo y a las altas mortandades asociadas a éstas, en los últimos años se han introducido al país, líneas de reproductores procedentes de otros países con características mejoradas (resistencia a patógenos o alto crecimiento). Por este motivo, es fundamental evaluar la diversidad genética de los lotes de reproductores silvestres mexicanos y los introducidos para conocer el estado genético del recurso en nuestro país. El objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad y diferencia genética entre líneas de reproductores de camarón blanco cultivadas en México, mediante marcadores tipo microsatélites (SSR) y marcadores de polimorfismo de nucleótido único (SNP). Para esto se utilizaron muestras de camarones silvestres de la región de Sonora y de reproductores provenientes de siete líneas de cultivo, de dos empresas ubicadas en Sinaloa (Empresa A y B, respectivamente). Se seleccionaron 12 SSR provenientes de literatura y 192 marcadores SNPs desarrollados para camarón blanco con un panel comercial. De los 12 SSR, solamente seis fueron estandarizados y amplificados con éxito en el lote de muestras silvestre; y en el caso de las líneas cultivadas no fue posible lograr una amplificación exitosa. Mientras que, de los 192 SNP contenidos en el panel comercial fueron seleccionados los que se presentaron en más del 80% de los individuos y eliminados los monomórficos, para determinar parámetros genéticos en el lote de muestras silvestres se utilizaron 35 muestras y 104 SNPs y el análisis de las líneas de cultivo fue realizado con 136 SNP y 162 muestras. Los resultados reflejan que las muestras silvestres presentan mayor heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y alto coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) con marcadores SSR ( $H_o$ : 0.326;  $F_{IS}$ : 0.629) respecto a los mismos parámetros calculados con marcadores SNP ( $H_o$ : 0.188;  $F_{IS}$ : 0.271), asociado al número de marcadores utilizados (SSR = 6 y SNP = 104). Por otra parte, con marcadores SNP, la línea A-1, presentó el valor más alto de diversidad genética. Los valores de heterocigosidad observada y esperada ( $H_e$ ) no fueron significativamente diferentes entre las líneas cultivadas de ambas empresas, ni en el lote de muestras silvestres. Todas las líneas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Según los valores del  $F_{IS}$ , las líneas (B-2 y B-5) se encontraron en reproducción aleatoria (panmixia), la línea A-1 registró valores negativos de  $F_{IS}$  (-0.078) entrando este valor en ligera exogamia; y el resto de las líneas y el lote de muestras silvestre tuvieron un  $F_{IS}$  que varió de 0.048 a 0.129, siendo el lote de muestras silvestres la que registró el valor más alto. Con respecto a las diferencias genéticas entre las muestras silvestres y las líneas de cultivo, con los resultados del coeficiente de fijación ( $F_{ST}$ ) se infiere que la línea A-1 es diferente de todas las líneas de la empresa B. Por otra parte, las muestras silvestres sólo registraron diferencias significativas con la línea A-1 y B-4 ( $F_{ST}$ = 0.071 y 0.037, respectivamente). Este agrupamiento coincide con los resultados del análisis discriminante de componentes principales (ADCP) y el árbol generado con las distancias de Nei (1972). La similitud entre las muestras silvestres y cinco líneas de cultivo de la empresa B puede deberse a la integración de individuos silvestres a lotes de cultivo o a escapes de organismos de cultivo al medio silvestre.

**Palabras clave:** Diversidad genética, marcadores microsatélites, marcadores SNP.

Abstract of the thesis presented by **Brenda Guadalupe Bonett Calzada**, as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

**Genetic characterization of breeding lines of white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in culture**

Abstract approved by:

---

Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz  
Directora de tesis

White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* is the most cultured species in the world. Because of the presence of culture diseases and high mortality associated to these, broodstock lines from other countries have been introduced over the past years, these have improved characteristics (pathogen resistance or high growth). This is why the assessment of genetic diversity in Mexican wild-collected broodstock as well as the introduced lines to the country is essential to know the genetic condition of this resource in our country. The goal of this study was to assess the diversity and genetic differences between white shrimp broodstock lines cultured in Mexico, using microsatellite markers (SSR) and single nucleotide polymorphism markers (SNP). In order to achieve this, a batch of wild shrimp samples were taken from Sonora and broodstock samples were taken from seven culture lines from two companies in Sinaloa (Company A and B respectively). Twelve SSR markers from literature and 192 SNPs markers developed for white shrimp in a commercial panel were selected. Six out of the 12 SSR markers were standardized and amplified successfully in the batch of wild samples. From the 192 SNPs contained in the commercial panel, we selected the ones present in more than 80% of individuals and eliminated the monomorphic ones. To determine genetic parameters in the wild batch, 35 samples and 104 SNPs were used and the culture lines analysis was made with 136 SNPs and 162 samples. Results reflect that wild samples show higher observed heterozygosity ( $H_o$ ) and high inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) with SSR markers ( $H_o$ : 0.326;  $F_{IS}$ : 0.629) compared to the same parameters calculated for SNPs markers ( $H_o$ : 0.188;  $F_{IS}$ : 0.271), associated with the number of markers used (SSR = 6 and SNP = 104). On the other hand, A-1 line showed the highest genetic diversity values with SNPs markers. Observed and expected heterozygosity ( $H_e$ ) values were not significantly different among wild samples and cultured lines from both companies. All lines were in Hardy-Weinberg equilibrium. According to  $F_{IS}$  values, lines B-2 and B-5 showed random mating (panmixia), line A-1 registered negative  $F_{IS}$  values (-0.078), showing a light exogamy. The rest of the lines and batch of wild samples had  $F_{IS}$  from 0.048 to 0.129, the highest value corresponding to the batch of wild samples. Regarding the genetic differences between batch of wild samples and culture lines, and Fixation Index ( $F_{ST}$ ) results show that line A-1 is different from all other lines from company B. On the other hand, batch of wild samples only registered significant differences with lines A-1 and B-4 ( $F_{ST}$ =0.071 and 0.037 respectively). This grouping matches the results from the discriminant analysis of principal components (DAPC) and the tree built using Nei's distances (1972). Similarity among batch of wild samples and five culture lines from company B can be the result of wild individuals joining a culture lot, or the ones in the culture escaping into the wild.

**Keywords:** Genetic diversity, microsatellite markers, SNP markers.

## Dedicatoria

*A los tres grandes amores de mi vida (Fran, Jared y Sofía), desde el momento en que los tuve en mis brazos supe lo que era amar a alguien de esta forma tan incondicional.*

*¡LOS AMO!*

*A mis papás, gracias a ustedes he llegado hasta donde estoy y soy quien soy; gracias por proteger mi andar toda la vida y velar de mí en los malos momentos.*

*¡LOS AMO!*

*“Dulces son los frutos de la adversidad, los cuales, como un sapo feo y venenoso, portan una preciada joya sobre su cabeza”*

*William Shakespeare*

*“Aprendí que la valentía no es la ausencia de miedo, sino el triunfo sobre el miedo. El hombre valiente no es el que no siente miedo, sino aquel que conquista ese miedo”*

*Nelson Mandela*

## Agradecimientos

---

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca de posgrado para realizar esta tesis.

Al Centro de Educación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en especial al departamento de Acuicultura por darme la oportunidad de realizar mi maestría en sus instalaciones.

A mi directora de Tesis la Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz, por su infinita paciencia, dedicación, por todo el tiempo dedicado a mi formación como maestra en ciencias, por motivarme a siempre buscar y conseguir más académicamente, por permitirme aprender de usted y compartir todo el conocimiento que fue posible, además por permitirme considerarla una amiga; siempre estaré agradecida por ello.

A la Dra. María Clara Arteaga Uribe, al Dr. Miguel Ángel del Río Portilla y a la M.C. Carmen E. Vargas Peralta, por aceptar formar parte de mi comité de tesis, les agradezco sobre todo su tiempo, buenas observaciones, objetivos consejos y la disposición que tuvieron para mejorar esta tesis en cada momento.

Al M.V.Z Baltazar Chávez del Comité de Sanidad Acuícola de Sonora (COAES) por la donación de las muestras del lote de muestras silvestres utilizados en el presente estudio.

A las dos empresas productoras de camarón blanco, por brindarnos las muestras de sus líneas de reproductores y la información compartida para la realización de esta tesis.

Al Dr. Jaime Gasca por su ayuda, por su paciencia y gran amabilidad al momento de enseñarme a utilizar el programa R, sin su apoyo esto hubiese sido más complejo.

Al Dr. Enrique Valenzuela, que de manera indirecta siempre estuvo presente durante los días de maestría, por ser mi papá de la ciencia y apoyar con sus palabras de aliento cuando el camino se ponía difícil, siempre estaré agradecida por haberme enseñado el amor por la ciencia.

A todos mis compañeros de maestría, por los buenos momentos que compartimos, porque aprendimos juntos y porque al final todos nos llevamos algo de cada uno. A Miriam y Arely por compartir su espacio conmigo y por todas las tardes de risas a la hora de la comida (y a las demás horas también), a mis compañeras de laboratorio Estrella y Priscila, por compartir sus conocimientos y todos sus consejos durante el tiempo del experimento, por los del análisis y redacción de esta tesis. A mis compañeros Antonio, Marco, Eloy y Vladimir por sus conocimientos y los momentos divertidos que pasamos; gracias a todos ustedes chiquillos.

A los mulaticos y rebeldes, por los tiempos compartidos y los juegos ganados.

A mis amigos Mary, Abel, Martín, Johanna, Estefanía (Maní) gracias por siempre apoyarme en los tiempos difíciles de maestría, por compartir momentos increíbles, por toda su paciencia y por estar siempre disponibles cuando los necesitaba.

A mi familia, a mis papás y a mis hermanos, gracias porque, aunque fue difícil siempre buscaron la manera de entenderme y sobre todo apoyarme, sé que no ha sido fácil, pero sé que están para mí como yo para ustedes, gracias y disculpen por los momentos en los que no estuve, sin importar eso yo los AMO, esto siempre ha sido y siempre será así.

A mi cuñada Jessica quien se ha convertido en más que una amiga, una hermana, por darme los dos grandes tesoros que están en mi vida; a mi cuñada Brenda por permitir tener cerca de nosotros a mi primer amorcito.

A los tres amores de mi vida (Fran, Jared y Sofía) porque en los momentos más difíciles ellos con una simple sonrisa y su mirada llena de ternura y amor iluminan mi día y mi vida, porque ahora entiendo que sin ellos yo no conocía la felicidad ni el amor incondicional.

Y agradezco a todo aquel que haya omitido, pero que se alegra junto conmigo por este logro.

***¡Muchas gracias!***

*“Pensar, es moverse en el infinito “*

*H.D. Lacordaire*

## Tabla de contenido

<b>Resumen en español</b> .....	i
<b>Resumen en inglés</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	i
<b>Lista de figuras</b> .....	ii
<b>Lista de tablas</b> .....	vi
<b>Capítulo 1. Introducción</b> .....	2
1.1 Antecedentes.....	3
1.1.1. Biología y distribución de <i>Penaeus (Litopenaeus) vannamei</i> .....	3
1.1.2. Importancia económica de la especie.....	4
1.1.3. Impacto de enfermedades en el sector camaronícola.....	5
1.1.4. Diversidad genética, estrategia para mejorar el sector camaronícola.....	7
1.1.5. Técnicas moleculares para evaluar diversidad genética.....	8
1.1.5.1 Marcadores moleculares microsatélites (SSR) .....	8
1.1.5.2 Comparación entre dos tipos de marcadores moleculares: SSR y SNP...	11
1.2. Justificación.....	13
1.3. Hipótesis.....	13
1.4. Objetivos.....	13
1.4.1. Objetivo general.....	13
1.4.12. Objetivos particulares.....	14
<b>Capítulo 2. Metodología</b> .....	15
2.1. Muestreo de individuos.....	15
2.2. Extracción de DNA genómico.....	17
2.3. Estandarización y amplificación de marcadores microsatélites.....	17
2.4. Genotipificación de marcadores.....	19
2.5. Análisis de datos.....	20
2.5.1. Diversidad genética.....	20

2.5.2. Estructuración genética y diferenciación genética.....	21
2.5.3. Análisis estadístico. ....	22
<b>Capítulo 3. Resultados.....</b>	<b>24</b>
3.1. Extracción y calidad de DNA.....	24
3.2. Diversidad genética de muestras silvestres y siete líneas de cultivo.....	25
3.2.1. Caracterización genética.....	25
3.2.1.1. Marcadores microsatélites (SSR) .....	25
3.2.1.2. Marcadores SNP.....	27
3.2.2. Diversidad genética de un lote de muestras silvestres: marcadores SSR.....	27
3.2.3. Diversidad genética de un lote muestras silvestres: marcadores SNP.....	32
3.2.4. Diversidad genética de líneas de cultivo: marcadores SNP.....	34
3.3. Estructuración y diferenciación genética.....	37
3.3.1. Estructuración y diferenciación genética del lote de muestras silvestres: marcadores SSR.....	37
3.3.2. Estructuración y diferenciación genética en un lote muestras silvestres: marcadores SNP.....	39
3.3.3. Estructura y diferencia genética líneas de cultivo: marcadores SNP...	41
<b>Capítulo 4. Discusión.....</b>	<b>47</b>
4.1 Generalidades de los microsatélites.....	47
4.1.1. Alelos nulos.....	47
4.1.2. Contenido de información polimórfica.....	48
4.1.3. Variabilidad de marcadores SSR.....	49
4.2. Diversidad genética.....	51
4.2.1. Lote de muestras silvestres: marcadores microsatélites (SSR) y SNP.....	51
4.2.2. Lote de muestras silvestres y siete líneas de cultivo: marcadores SNP.....	54
4.3. Estructura y diferenciación genética.....	56
4.3.1. Lote de muestras silvestres: marcadores microsatélites (SSR) y SNP.....	56
4.3.2. Lote de muestras silvestres y líneas de cultivo: marcadores SNP.....	57

<b>Capítulo 5. Conclusiones.....</b>	<b>58</b>
<b>Capítulo 6. Recomendaciones.....</b>	<b>59</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>50</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>68</b>

## Lista de figuras

Figura 1	Distribución natural (línea azul con puntos) del camarón blanco <i>P. (L.) vannamei</i> .....	3
Figura 2	Producción histórica nacional por acuicultura y pesca de camarón blanco <i>P. (L.) vannamei</i> , considerando los dos estados con mayor producción a nivel nacional, Sonora (línea roja) y Sinaloa (línea amarilla); enfatizando (flechas rojas) años con aparición de enfermedades.....	6
Figura 3	Esquematación de una región microsatélite, haciendo énfasis en los motivos de repetición (microsatélite Lv76, de este estudio), motivo de repetición: AAT <sub>4</sub>	10
Figura 4	Mapa de la República Mexicana, con énfasis en el estado de Sonora, con puntos específicos de muestreo realizado por el Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora (COAES) en el año 2015.....	16
Figura 5	Evaluación del DNA de 20 muestras de camarón blanco de la empresa A. Gel de Agarosa al 1%. Corrida durante 60 min a 90 volts con solución amortiguadora TBE 1X, muestras estandarizadas a de 50 ng/ $\mu$ L. escalera de peso molecular de 1 Kb (Promega, G5177) .....	24
Figura 6	Dispersión de las razones para determinar calidad de DNA. En las gráficas se muestran las relaciones para las muestras de DNA de camarón blanco con respecto a la concentración de DNA en ng/ $\mu$ L. donde se muestra: A) la relación 260/280 (proteínas), B) la relación 260/230 solventes.....	25
Figura 7	Ejemplo de estandarización de marcadores microsatélites especie específicos de camarón blanco, utilizando cuatro muestras silvestres. A) Microsatélite Lvan1 (no estandarizado); B) Microsatélite TUMXLv5.3 (estandarizado). Gel de agarosa al 1.5 %, corrida durante 40 min a 90 V, escalera de peso molecular de 100 pb (Promega G210A) .....	26
Figura 8	Frecuencia de alelos nulos en seis marcadores microsatélites utilizados para evaluar diversidad genética en un lote de muestras (n = 24) de camarón blanco	29
Figura 9	Frecuencias alélicas correspondientes a los seis loci microsatélites evaluados en las muestras silvestres mexicanas de camarón blanco.....	29

Figura 10	Heterocigosidad observada y esperada del lote de muestras silvestres de camarón blanco evaluada con seis marcadores moleculares microsatélites.....	30
Figura 11	Coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) de un lote de muestras silvestres de camarón blanco evaluada con marcadores SSR. A) $F_{IS}$ en general por lote de muestras; B) $F_{IS}$ por SSR evaluado. Asteriscos indican significancia estadística con respecto a la prueba t-Student. * =significativo, ** =altamente significativo y *** = muy altamente significativo. Línea punteada separa cuadrantes, de 0 a 1 cuadrante endogamia, 0 = panmixia y de 0 a -1 cuadrante de exogamia.....	31
Figura 12	Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) de un lote de muestras silvestres de camarón blanco evaluada con 104 marcadores moleculares SNP...	32
Figura 13	Coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) de un lote de muestras silvestres de camarón blanco evaluada con marcadores SNP. A) $F_{IS}$ promedio para el lote de muestras; B) $F_{IS}$ por marcador SNP analizado. Asteriscos indican significancia estadística con respecto a la prueba t-Student. * = significativo, ** = altamente significativo y *** = muy altamente significativo. Línea punteada separa cuadrantes, de 0 a 1 cuadrante endogamia, 0 = panmixia y de 0 a -1 cuadrante de exogamia.....	33
Figura 14	Heterocigosidad observada (A) y esperada (B) de un lote de muestras silvestres y siete líneas de cultivo camarón blanco evaluadas con marcadores SNP. A-1) Empresa A, de B-1 a B-2) Empresa B. ....	35
Figura 15	Coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) en un lote de muestras silvestres mexicanas y siete líneas de cultivo de camarón blanco, evaluadas con 136 marcadores SNP. A-1) Empresa A, de B-1 a B-2) Empresa B. Asteriscos indican significancia estadística con respecto a la prueba t-Student. * = significativo, ** = altamente significativo y *** = muy altamente significativo. Línea punteada separa cuadrantes, de 0 a 1 cuadrante endogamia, 0 = exogamia y de 0 a -1 cuadrante de panmixia (Curtis <i>et al.</i> , 2008) .....	36
Figura 16	Estructura genética de un lote de muestras silvestres de camarón blanco evaluada con ocho componentes genéticos (valor de K asignado) obtenido a partir de marcadores microsatélites (SSR) .....	37

Figura 17	Estimación del número de componentes utilizando el logaritmo de la probabilidad media ( $\ln P[D]$ ) derivado de $\Delta k$ para $k$ de 1 a 8, para el análisis con seis marcadores moleculares microsatélites (SSR) en muestras silvestres.....	38
Figura 18	Estructura genética de muestras de procedencia silvestre de camarón blanco, evaluada con dos componentes genéticos (valor de $K$ obtenido del Delta $K$ y el valor promedio de $K$ ) obtenido a partir de marcadores microsatélites (SSR).....	38
Figura 19	Plano cartesiano del análisis discriminante de componentes principales para el lote de muestras silvestres mexicana analizada con marcadores microsatélites (SSR) El eje X indica el componente principal 1, el eje Y indica el componente principal 2.....	39
Figura 20	Estructura genética de un lote de muestras silvestres de camarón blanco evaluada con ocho componentes genéticos (valor de $K$ asignado) obtenido a partir de marcadores SNP.....	39
Figura 21	Estimación del número de componentes utilizando el logaritmo de la probabilidad media ( $\ln P[D]$ ) derivado de $\Delta k$ para $k$ de 1 a 8, para el análisis con 104 marcadores moleculares SNP en muestras de procedencia silvestre.....	40
Figura 22	Estructura genética de muestras silvestres de camarón blanco evaluada con dos componentes genéticos (valor de $K$ obtenido del Delta $K$ y el valor promedio de $K$ ) obtenido a partir de marcadores SNP.....	40
Figura 23	Plano cartesiano del análisis discriminante de componentes principales para las muestras silvestres mexicana analizada con 104 marcadores SNP. El eje X indica el componente principal 1, el eje Y indica el componente principal 2.....	41
Figura 24	Estructura genética de un lote de muestras silvestres y siete líneas de cultivo de camarón blanco, evaluada con marcadores SNP. A) Análisis de todas las líneas utilizando diez componentes genéticos (valor de $K$ asignado); B) Análisis con todas las líneas con tres componentes genéticos $K = 3$ ( $K$ asignado a partir de los resultados con prueba de Evanno). C) Análisis con nueve componentes genéticos, excluyendo la línea A-1 (valor de $K$ asignado); D) Análisis con las líneas excluyendo a la línea A-1 con dos componentes genéticos $K = 2$ ( $K$	

	asignado a partir de los resultados con la prueba de Evanno. Cada color indica un componente genético diferente.....	42
Figura 25	Estimación del número de componentes utilizando $\text{LnP}(D)$ derivado de $\Delta K$ para $K$ de 1 a 10, para el análisis con 136 SNP en un lote de muestras silvestres y siete líneas de cultivo.....	43
Figura 26	Plano cartesiano del análisis discriminante de componentes principales por individuo y por líneas. Elipses indican agrupamiento de individuos en el lote de muestras silvestres y las siete líneas de cultivo. El eje X indica el componente principal 1, el eje Y indica el componente principal 2.....	43
Figura 27	Distancias genéticas de Nei (1972), de un lote de muestras silvestres y siete líneas de cultivo de camarón blanco evaluada con 136 marcadores SNP.....	45
Figura 28	Resumen del número de individuos dentro de cada componente genética en el lote de muestras de procedencia silvestre detectadas con ambos marcadores moleculares (SSR y SNP) .....	72
Figura 29	Número de muestras y número de alelos para los microsatélites evaluados en este estudio y en los utilizados para comparar la información obtenida.....	76
Figura 30	Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) obtenidas en este estudio a partir de seis marcadores SSR y resultados obtenidos en otros estudios con los mismos marcadores SSR.....	77
Figura 31	Coefficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) obtenidos para el lote de muestras silvestres con seis marcadores SSR y resultados obtenidos en otros estudios comparando con los resultados obtenidos en el presente trabajo.....	78
Figura 32	Número de alelos obtenidos para el lote de muestras silvestres, utilizando marcadores microsatélites y SNP.....	79
Figura 33	Heterocigosidad observada en un lote de muestras silvestres mexicanas; comparando marcadores microsatélites y SNP.....	79
Figura 34	Coefficiente de endogamia obtenido a partir de marcadores microsatélites y SNP en un lote de muestras de camarón blanco silvestre mexicana.....	80

## Lista de tablas

Tabla 1	Descripción general de enfermedades presentes en el cultivo de <i>P. (L.) vannamei</i> y año de aparición en México.....	6
Tabla 2	Características de marcadores moleculares SSR y SNP.....	8
Tabla 3	Origen de cada muestra y número total. Número de muestras utilizadas para el análisis con marcadores SSR y SNP del camarón blanco, <i>P. (L.) vannamei</i> .....	16
Tabla 4	Descripción de 12 microsatélites especie específicos para camarón blanco. * indica desarrollo a partir de secuencias expresables (EST) .....	19
Tabla 5	Relación de amplificación de marcadores microsatélites en el lote de muestras silvestres y por línea de cultivo de camarón blanco.....	27
Tabla 6	Parámetros genéticos de un lote de muestras silvestres evaluada con marcadores microsatélites. n: número de individuos, PIC: Contenido de información polimórfica, An: Frecuencia de alelos nulos, Na: Número de alelos, Ra: Riqueza alélica, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, EHW: ajuste al Equilibrio de Hardy-Weinberg, $F_{IS}$ : coeficiente de endogamia.....	28
Tabla 7	Parámetros genéticos de un lote de muestras silvestres evaluada con 104 marcadores SNP. n: número de individuos, Na: número de alelos, Ra: riqueza alélica, Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada, EHW: Equilibrio de Hardy-Weinberg, $F_{IS}$ : coeficiente de endogamia, FAM: Frecuencia del alelo menos común.....	32
Tabla 8	Parámetros de diversidad genética de un lote de muestras silvestres y siete líneas de cultivo de camarón blanco evaluada con 136 marcadores SNP. n: Número de individuos, Na: Número de alelos, Ra: Riqueza alélica, Ap: Alelos privados, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, EHW: ajuste al Equilibrio de Hardy-Weinberg, $F_{IS}$ : coeficiente de endogamia, FAM: Frecuencia del alelo menos común.....	34

Tabla 9	Matriz de comparación entre los valores $F_{ST}$ de un lote de muestras silvestre y siete líneas de cultivo de camarón blanco. Valores resaltados con rojo son estadísticamente significativos comparados con un valor de significancia aplicando la corrección de Dunn Šídák ( $p < 0.000061$ ) .....	44
Tabla 10	Análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) de siete líneas de cultivo y un lote de muestras silvestres de <i>Penaeus (Litopenaeus) vannamei</i> . Grados de libertad (g. l) y porcentaje de la variación molecular (% variación). Se explica por el nivel jerárquico. Significancia estadística ( $p < 0.05$ ). El número de grupos se estableció por Structure, $K = 3$ . Grupo 1: A-1, Grupo 2: Silvestres, B-1, B-2, B-3, B-5, B-6 y Grupo 3: B-4.....	46
Tabla 11	Mezcla maestra para la amplificación de regiones microsatélites. Se indica la concentración inicial, final y el volumen final.....	68
Tabla 12	Loci amplificados para <i>P. (L.) vannamei</i> . Se indica el número de acceso a GenBank, el locus, la secuencia de los oligonucleótidos utilizados (sentido y anti sentido), el tamaño esperado reportado (Te), la temperatura de hibridación reportada (Tm), la referencia, por último, con un asterisco se indica los pares de oligonucleótidos utilizados en el presente estudio.....	69
Tabla 13	Frecuencia alélica por locus amplificado con marcadores microsatélites en el lote de muestras silvestres de camarón. Con énfasis en el alelo con mayor frecuencia.....	70
Tabla 14	Ancestría inferida para cada individuo del lote de muestras silvestres, para determinar el porcentaje de pertenencia a un determinado componente.....	72
Tabla 15	Porcentaje de variación explicada por dos ejes utilizando seis marcadores microsatélites en el análisis de componentes principales de un lote de muestras silvestres de camarón blanco.....	73
Tabla 16	Porcentaje de variación explicada por dos ejes utilizando seis marcadores SNP en el análisis de componentes principales con 35 muestras de un lote silvestres de camarón blanco.....	73

Tabla 17	Variación explicada por dos ejes utilizando marcadores SNP en análisis de componentes principales de un lote de muestras silvestres y de siete líneas de cultivo de camarón blanco.....	73
Tabla 18	Escala de significancia para el contenido de información polimórfica de los seis marcadores microsatélites utilizados en este estudio.....	74
Tabla 19	Comparación entre el número de alelos y heterocigosidad observada obtenida a partir de los seis microsatélites utilizados para evaluar al lote de muestras silvestres (n = 35) utilizadas en este estudio y los resultados obtenidos por los autores que desarrollaron estos marcadores.....	75
Tabla 20	Escala de significancia de valores de $F_{ST}$ para comparaciones entre poblaciones	81

## Capítulo 1. Introducción

---

En los últimos años, la acuicultura se ha convertido en una gran industria que presenta un crecimiento anual del 5% (FAO, 2016). En el 2014, se reportó una producción de 73 millones de toneladas de peces, crustáceos, moluscos y otras especies. Ese mismo año, la producción de crustáceos a nivel mundial alcanzó un total de 6.9 millones de toneladas, lo que representa el 9.3% de la producción acuícola total, sin embargo, es importante resaltar que la producción disminuyó casi un 20% en comparación con el año 2012 (FAO, 2016). Por otra parte, la producción por moluscos duplica la cantidad producida por crustáceos que fue de 16.1 millones de toneladas de moluscos, mientras que el valor económico de la producción de crustáceos es dos veces más alto que el valor de la producción de moluscos, debido a que las especies de crustáceos que se cultivan tienen una alta demanda y elevado valor comercial en el mercado internacional, ejemplo de ello es el camarón blanco *P. (L.) vannamei* (FAO, 2016).

El camarón blanco es la especie que más se cultiva en el ámbito internacional y nacional, presenta un alto valor comercial, por ello es una de las especies más estudiadas en la actualidad. Entre los estudios que se han desarrollado se encuentran los relacionados a aspectos fisiológicos (reproducción, desarrollo, crecimiento, metabolismo, termotolerancia), con parámetros de cultivo (temperatura, salinidad, oxígeno, entre otros) y las patologías asociadas a diversos agentes (Manzo-Delgado, 2000; Lightner, 2003; Briggs *et al.* 2004; Gutiérrez-Salazar, 2011; López-Galindo, 2014) entre otros. Sin embargo, en las últimas décadas se han registrado pérdidas económicas derivadas principalmente a la presencia de enfermedades, por ello a partir de los años 90s se inicia con los estudios sobre variabilidad genética en lotes de reproductores de camarón (Martínez, 2005; Cuéllar-Anjel, 2012).

El estudio y evaluación de la variabilidad genética de lotes de reproductores permite conocer el estado genético en el que estos se encuentran e implementar estrategias de crianza selectiva para producir progenies con mejores características productivas (crecimiento, supervivencia y resistencia a enfermedades) (Martínez, 2005).

En la actualidad, en México se han introducido diferentes líneas de camarón blanco, algunas de alto crecimiento y otras resistentes a ciertos patógenos, con la finalidad de mantener competente la industria camaronícola del país. Sin embargo, se desconoce el estado genético de estas líneas, por lo cual el principal

objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad y estructura genética de reproductores de camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* de diferente procedencia.

## 1.1. Antecedentes

### 1.1.1. Biología y distribución de *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*

El camarón blanco, *P. (L.) vannamei* es del orden Decápoda y es perteneciente a la familia Penaeidae (Briggs *et al.*, 2004). Está ampliamente distribuida en el Océano Pacífico Oriental tropical, su distribución inicia en el norte de México, particularmente en el Golfo de California y termina en el norte de Perú, específicamente en Tumbes (Figura 1). Esta especie generalmente se encuentra en ambientes marinos con fondos lodosos, donde la temperatura es superior a los 20°C y a una profundidad máxima de 70 m, sin embargo, es más común dentro de los primeros 25 m de profundidad (Treece y Yates, 1993).



**Figura 1.** Distribución natural (línea azul con puntos) del camarón blanco *P. (L.) vannamei*.

### 1.1.2. Importancia económica de la especie

El camarón blanco *P. (L.) vannamei* es una de las especies que más se cultiva a nivel mundial, esto es atribuido a las diferentes características que presenta como lo es su adaptabilidad a cautiverio, amplia tolerancia térmica, altas tasas de fecundidad, resistencia a altas densidades de cultivo, tolerancia a un intervalo amplio de salinidades, que van de 0 hasta 35 unidades prácticas de salinidad (ups) y una tasa de crecimiento rápida, completando su etapa de engorda en 6 a 7 meses. Por ello, esta especie se ha introducido a diferentes países para desarrollar su cultivo, como el caso de China, donde es una especie introducida, pero es el país que más la produce a nivel mundial (Zhi-Ying *et al.*, 2006).

De la producción total de productos pesqueros obtenidos (por captura y acuicultura) los crustáceos representan alrededor del 9.37 % (FAO, 2016) y particularmente el cultivo de *P. (L.) vannamei* representó el 5.25 % para el 2012 a nivel mundial (FAO, 2016). Actualmente, entre los principales países productores de camarón blanco de cultivo se encuentran Tailandia, Malasia, China, México, Ecuador, Venezuela y Brasil (FAO, 2016).

No obstante, a nivel mundial la industria de cultivo de camarón blanco se ha visto afectada por enfermedades que han causado una baja en la producción. Por ejemplo, del año 2011 al 2013, la producción total por acuicultura de Tailandia descendió un 13% debido a la presencia de la enfermedad de la mortalidad temprana en cultivos de camarón blanco *P. (L.) vannamei*, ya que esta es la principal especie que se cultiva Tailandia (FAO, 2014). Esto llevó a que en el 2012 el precio del camarón a nivel mundial aumentará considerablemente, siendo Japón el país que elevó más el precio, alcanzando un máximo de 25 dólares por kilogramo. Este aumento se atribuye principalmente a la demanda del producto y a la poca disponibilidad que se presentó en dicho años (FAO, 2014). Mientras que en México, el precio por kilogramo registrado para 2013, con respecto al año anterior, subió en un 38%, manteniéndose el precio en los años subsecuentes (CONAPESCA, 2014). Sin embargo, de acuerdo a los datos estadísticos proporcionados por la Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (2015), el precio de camarón de cultivo en los últimos cinco años en México tiene un costo 20% mayor que el producto de origen silvestre; a diferencia que ocho años previos en donde los costos eran inversos. Esto debido a que la gran demanda de este recurso no ha podido ser cubierta por el sector pesquero y al conocimiento de la sociedad sobre los productos de origen acuícola y la disponibilidad de los productos de este origen (acuícola), ya que

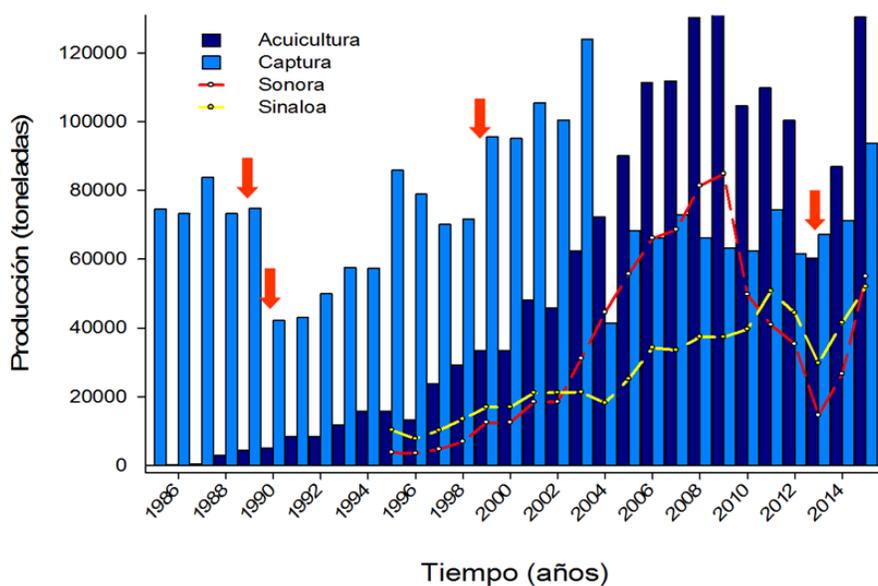
pueden obtenerse todo el año a diferencia de los individuos por captura, pues estos últimos dependen de ciclos de veda para su pesca (CONAPESCA, 2015).

### **1.1.3. Impacto de enfermedades en el sector camaronícola**

Debido a que el camarón blanco es una especie que generalmente es cultivada de manera intensiva (altas densidades), es susceptible a desarrollar diferentes enfermedades. De las enfermedades que se han registrado en cultivos y que generan altas tasas de mortalidad, se encuentran el virus de la mancha blanca (WSSV), el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) y el virus del Taura (TSV) (Morales -Covarrubias *et al.*, 2011), siendo estas las que más pérdidas económicas han generado. Además, en el año 2012, a nivel mundial se presentó una nueva enfermedad denominada el síndrome de mortalidad temprana (EMS/AHNS), dicha enfermedad tiene como agente causal una cepa patógena de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*, que causa mortalidad de hasta el 100% y se presenta generalmente en etapas juveniles (Cuéllar-Anjel, 2013; Varela-Mejías y Peña-Navarro, 2014). Lo cual se ve reflejado con la disminución de la producción camaronícola del país en los años donde se presentaron dichas enfermedades (Figura 2). En 2013 se registró la aparición de esta enfermedad en México (Tabla 1) ocasionando que la producción, en comparación con la producción registrada para el año previo (2012), descendiera hasta un 40% (CONAPESCA, 2013). En México, de acuerdo a los valores registrados en el Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca de la Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA, 2013), la producción acuícola en el 2013 de camarón blanco *Penaeus (L.) vannamei* fue de 67, 224 t (peso vivo). El mayor productor a nivel nacional fue Sinaloa con 24, 862 t que corresponden a un 47% de la producción total de camarón en México (CONAPESCA, 2013). Sin embargo, datos preliminares indican que la producción de camarón blanco para el año 2015 se ha duplicado, con un total de 130,344 t, siendo Sonora y Sinaloa los dos estados con mayor producción con el 82.1% del total, produciendo estos estados 54 y 52 mil t lo cual representa el 42.2 y el 39.9% del total respectivamente (CONAPESCA, 2015).

**Tabla 1.** Descripción general de enfermedades presentes en el cultivo de *P. (L.) vannamei* y año de aparición en México.

Enfermedad	Agente causal	Mortalidad en cultivo	Aparición en México	Cita
<b>Síndrome de la deformidad y enanismo (RDS)</b>	Virus de DNA de cadena simple	30%	1989	Gutiérrez-Salazar, 2011 y Lightner, 2003 Bonami <i>et al.</i> , 1997;
<b>Virus del Taura (TSV)</b>	Virus de RNA de cadena simple	90%	1990	Cuéllar-Anjel, 2012 y Galavíz-Silva <i>et al.</i> , 2004
<b>Virus de la mancha blanca</b>	Virus de DNA bicatenario	100%	1999	King <i>et al.</i> , 2012 y Sánchez-Martínez <i>et al.</i> , 2007
<b>Síndrome de la mortalidad temprana (EMS/AHPNS)</b>	Cepa patógena de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100%	2013	Varela-Mejías y Peña-Navarro, 2014



**Figura 2.** Producción histórica nacional por acuicultura y pesca de camarón blanco *P. (L.) vannamei*, considerando los dos estados con mayor producción a nivel nacional, Sonora (línea roja) y Sinaloa (línea amarilla); enfatizando (flechas rojas) años con aparición de enfermedades.

#### **1.1.4. Diversidad genética, estrategia para mejorar el sector camaronícola**

Generar cultivos con altos índices de diversidad genética permiten al sector, la planificación de cruces dirigidos, los cuales, potencializan el crecimiento y resistencia de individuos en condiciones de cultivo, esto a su vez incrementa la productividad de la industria.

La diversidad genética en individuos se refiere a la cuantificación de la variación en el material genético de una población determinada, esta variación permite que en la población existan diferentes variantes de un gen como resultado de mutaciones, migraciones y deriva génica, esto permite que los individuos en una población determinada tengan mayor capacidad de respuesta ante condiciones ambientales cambiantes (Povh *et al.*, 2008).

Sin embargo, generalmente en cultivos a nivel comercial, una práctica común es la generación de lotes de reproductores a partir de individuos sobrevivientes de algún evento de enfermedad o mortandad causada por variables físico químicas, lo que ocasiona la reproducción entre individuos que en la mayoría de los casos están altamente emparentados, por lo que se presenta endogamia en las siguientes generaciones (Muñoz y Pérez, 2004). Otra razón por la cual se genera endogamia en los cultivos actuales de camarón, es por la compra de postlarvas a laboratorios no certificados, los cuales venden individuos con un coeficiente de endogamia alto y cuando se pretende obtener nueva progenie a partir de estos lotes, el resultado puede ser una progenie con índices aún más altos de endogamia y una diversidad genética muy baja (Doyle y Moss, 2006). Los efectos negativos de la endogamia, conocidos como depresión endogámica, son altas tasas de mortalidad, bajas tasas de crecimiento, baja resistencia a algunas enfermedades, disminución en los porcentajes de fecundación y altas tasa de deformidades en la progenie, siendo estas las principales características que afectan la producción intensiva de algunas especies (Perez-Enriquez *et al.*, 2009; Vázquez-Lobo y García-Morales, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Estas consecuencias son ocasionadas debido a las pérdidas de variantes alélicas ya que se disminuye la heterocigosidad en una población determinada (Mendoza-Cano *et al.*, 2013). La heterocigosidad en una población es la proporción de individuos heterocigotos para un locus o para el promedio de varios loci y es utilizado como una medida de variabilidad genética (Beaumont y Hoare, 2003).

### 1.1.5. Técnicas para evaluar diversidad genética

Para evaluar la variabilidad genética en poblaciones, se utilizan diferentes técnicas moleculares, entre las cuales se encuentran isoenzimas, RAPD, RFLP, AFLP. Sin embargo, han sido reportadas como técnicas con capacidad limitada o baja reproducibilidad para detectar polimorfismo (Freitas *et al.*, 2005), el polimorfismo de una técnica indica la capacidad de ésta de detectar la ocurrencia de variantes alélicas para un locus en específico en una población determinada (Cruz, 2003). Actualmente dos tipos de marcadores moleculares se reportan como técnicas con alto potencial para evaluar variabilidad genética estos son los marcadores microsatélites (SSR) y marcadores de polimorfismo de nucleótido único (SNP) (Vignal *et al.*, 2002; Beaumont *et al.*, 2010).

Dentro de los marcadores genéticos moleculares, los marcadores SSR y los SNP son los más recomendados para realizar análisis de variabilidad genética y de parentesco debido a las características que presentan (Tabla 2).

**Tabla 2.** Características de marcadores moleculares SSR y SNP.

Marcador	Reproducibilidad	Conocimiento		No. de alelos	Tipo de marcador	Polimorfismo	Exactitud	Costo
		de la secuencia	Tipo					
SSR	Alta	Si	1 y 2	Múltiple	Codominante	Alto	Alto	Variable
SNP	Alta	Si	1 y 2	2	Codominante	Alto	Muy alto	alto

\*Tipo 1: marcadores que se encuentran en secuencias codificantes conocidas

\*Tipo 2: marcadores que se encuentran en secuencias no codificantes (Vignal *et al.*, 2002; Li y Cordes, 2004; Beaumont *et al.*, 2010)

#### 1.1.5.1. Marcadores moleculares microsatélites (SSR)

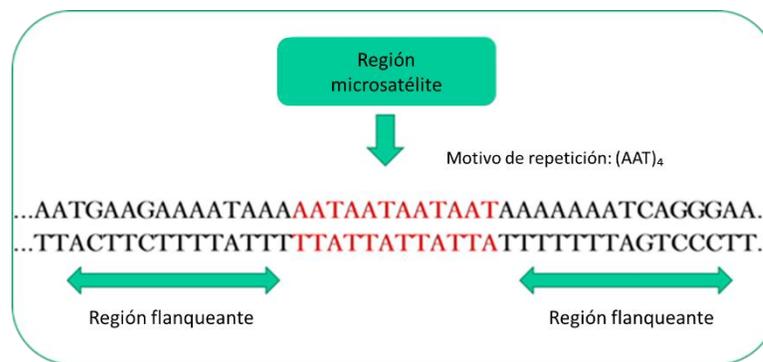
En la acuicultura la aplicación de la información generada por los marcadores microsatélites o SSR, por sus siglas en inglés (*Simple Sequence Repeats, SSR*), es amplia, una de ella es en la generación de programas de mejoramiento genético para el cultivo de diversas especies acuícolas (Bentsen y Olesen, 2002). En estos programas se realiza una selección minuciosa de los reproductores que serán utilizados

con base en los genotipos presentes y con el fin de realizar cruzas dirigidas que generen progenies que mantengan o aumenten la diversidad genética del recurso y presenten características de interés comercial previamente seleccionadas en los reproductores (Martínez, 2005). Dentro de una familia o línea, se espera que las variantes alélicas sean similares, por ello cuando éstas presentan características de interés comercial, es posible caracterizar e identificar qué proporción de la progenie producida a partir de éste tipo de familias o líneas presenta las características de interés comercial (Vázquez-Lobo y García-Morales, 2014). Asimismo, diversos autores han comprobado la eficacia de estos programas y las mejoras en diversidad genética en cultivo con la selección de caracteres particulares (crecimiento), obteniéndose hasta un 26% en ganancias económicas en diferentes especies acuícolas (Borrel-Pichs, 2002).

Los SSR, son secuencias de 2 a 6 bases repetidas en tándem un determinado número de veces (Figura 3), éstas se encuentran en las células eucariotas y en algunas bacterias (Tóth *et al.*, 2000). Los SSR pueden ser clasificados por sus motivos de repetición, dependiendo del tipo de motivos se clasifican en dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos y pentanucleótidos, siendo los más comunes para peneidos los tetranucleótidos (Scarborough *et al.*, 2002). Otra forma de clasificación es por la organización de sus motivos de repetición, donde se encuentran los SSR perfectos, estos son los que poseen un único motivo de repetición, los compuestos interrumpidos, que presentan diferentes motivos de repetición pero se encuentran interrumpidos por diferente número de bases que no conforman el microsatélite y por último se encuentran los SSR complejos, los cuales pueden presentar todas las características antes mencionadas (Perez-Cruz, 2003). Asimismo, se ha registrado la presencia de SSR en regiones codificantes, las cuales están reportadas en el banco de genes (Genbank) como secuencias expresables (EST), además también se encuentran en regiones no codificantes y dentro del genoma mitocondrial. La presencia de estos en regiones codificantes es relativamente baja a diferencia con regiones no codificantes, en la cual tienen una tasa mutacional de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  de generación en generación, se asume que en regiones codificantes es menor la tasa mutación debido a las implicaciones que tendrían en la síntesis de proteínas (Scarborough *et al.*, 2002). Los SSR son codominantes y se rigen bajo un modelo de herencia mendeliana y pueden ser detectados al ser amplificados utilizando la reacción en cadena polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y con ello generando fragmentos microsatélites altamente polimórficos en cuanto a su longitud, lo cual facilita su análisis y lo economiza. Por ello son ampliamente utilizados para realizar pruebas de identidad, estudios de población, análisis de ligamiento y mapeo del genoma (Vázquez-Lobo y García-Morales, 2014).

Actualmente se encuentran descritos dos modelos que explican la generación y evolución de estas regiones microsatélites, el primero es el error en la síntesis de DNA o desplazamiento de la polimerasa, se

presenta por una desestabilización de la hebra de DNA que provoca el deslizamiento de la polimerasa; el segundo modelo ocurre durante la recombinación homóloga de los cromosomas en donde no hay un empalme adecuado (Perez-Cruz, 2003; Chistiakov *et al.*, 2006). Asimismo, tres modelos de mutación explican este proceso en microsatélites, a) mutación por pasos (SMM, por sus siglas en inglés), el cual asume que la mutación se dará por una sola repetición, b) mutacional de dos fases (TPM, por sus siglas en inglés), el cual envuelve cambios en las repeticiones simples y c) de alelos infinitos (IAM, por sus siglas en inglés), este modelo refuta el modelo de homoplasia e indica que cada mutación de SSR resulta en un alelo nuevo (Chistiakov *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Esquematación de una región microsatélite, haciendo énfasis en los motivos de repetición (microsatélite Lv76, de este estudio), motivo de repetición: AAT<sub>4</sub>.

Con el uso de marcadores SSR surgió con gran auge el estudio de poblaciones con estos marcadores a finales de los noventa. Dentro de los primeros estudios en camarón blanco se encuentra el realizado por García y colaboradores (1996) en donde al utilizar marcadores RAPD se identificó la presencia de dos regiones microsatélites. Posteriormente Wolfus y colaboradores (1997) evaluaron el uso potencial de uno de estos marcadores microsatélites en programas de cría de camarón y determinaron que la variabilidad genética en cultivo fue mayor que la esperada, concluyendo que esta técnica podía ser utilizada con certeza para determinar variabilidad genética en cultivos de camarón. Sin embargo, a partir de estos estudios comenzó la identificación, aislamiento y desarrollo de nuevos marcadores microsatélites, utilizando bibliotecas genómicas generadas a partir de la digestión de DNA con enzimas de restricción; dentro de las primeras técnicas utilizadas fue el uso plásmidos insertados en bacterias para la clonación de estos fragmentos de DNA, donde se identificaba la presencia de regiones microsatélites (Cruz *et al.*,

2002; Meehan *et al.*, 2003; Zhi-Ying *et al.*, 2006 y García y Alcivar-Warren, 2007). Por otra parte, a partir de la identificación de secuencias codificantes y su reporte en los bancos genéticos, como GenBank, se han podido identificar regiones con marcadores microsatélites y con ello diseñar oligonucleótidos (cebadores, primers, iniciadores) que permiten su amplificación (Pérez, 2003).

Una vez identificadas y caracterizadas las regiones microsatélites en el genoma del camarón blanco, se diseñan oligonucleótidos especie-específicos para amplificar estas regiones, lo que permite identificar cada individuo de una población y realizar estudios sobre variabilidad genética en camarón blanco. Estos estudios han permitido conocer los índices de variabilidad genética, valores de endogamia e inclusive identificar familias de camarón en condiciones de cultivo. (Borrel-Pichs, 2002; Casalla-Daza, 2003; Souza de Lima *et al.*, 2010 y Artilles *et al.*, 2015). Por ejemplo, Muñoz y Pérez en 2004 evaluaron 32 familias de camarón blanco utilizadas como reproductores en una granja de cultivo, en este estudio se utilizaron siete marcadores microsatélites y se determinó que del total de las familias el 80% fueron medios hermanos, por lo cual se presentan altos índices de consanguinidad en dicho cultivo. Por otra parte, los SSR se han empleado para determinar la estructura genética en poblaciones naturales de camarón blanco. En el estudio de Valles-Jiménez y colaboradores (2005) se evaluaron cuatro poblaciones naturales (Sinaloa, Guerrero, Guatemala y Panamá) utilizando cinco loci SSR, encontrándose que estas poblaciones presentan estructura genética, con valores de  $F_{ST}$  pareados significativos estadísticamente.

### **1.1.5.2 Marcadores moleculares SNP**

Los marcadores de polimorfismo de nucleótido simple (SNP, por sus siglas en inglés) son cambios de un solo nucleótido en la secuencia de DNA, estos son los marcadores que representan la mayor proporción de polimorfismos genéticos (Edwards *et al.*, 2005). Los SNP son generalmente marcadores genéticos bialélicos, esto se refiere a que solamente puede haber dos alelos presentes (Liu, 2007). Estos pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de sustitución que presentan, transición cuando los cambios son de bases purinas (A, G) a bases purinas y por bases pirimidinas (C, T) a bases pirimidinas o en transversiones en donde hay un cambio de bases purinas por bases pirimidinas y viceversa. Sin embargo, son más comunes las transiciones, además la mutación más común es el cambio de bases citosinas (C) por bases timinas (T). Otro evento común de mutación que presentan los SNP es por inserciones o deleciones, estos son producidos por error en la síntesis, reparación o recombinación de la hebra de DNA (Edwards *et al.*, 2005).

A diferencia de las regiones microsatélites, los SNP tienen una tasa de mutación menor en comparación con regiones microsatélites y presentan una baja tasa de cambios de generación en generación, sin embargo, para ser considerados en el análisis de una población, un SNP debe presentarse en al menos el 1% de la población, si no es así, estos son considerados como mutaciones puntuales en un individuo o como error de genotipificación (Gorbach *et al.*, 2009).

Con respecto a la frecuencia de estos marcadores, diversos autores indican que se encuentran con mayor frecuencia en regiones no codificantes, sin embargo, ha sido ampliamente registrada la presencia de SNP en regiones codificantes (Du *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2014). En algunos casos la presencia de SNP en regiones codificantes puede dar indicio de enfermedades, ya que este tipo de mutaciones pueden cambiar la secuencia de aminoácidos. Por ello, depende del tipo de mutación y la región donde se localice, estas mutaciones se catalogan como mutaciones sinónimas y no sinónimas, en el caso de las mutaciones sinónimas son las que no cambian la estructura del codón que se traducirá a un aminoácido y las mutaciones no sinónimas son las que generan un cambio en el codón y no permite que se traduzca el aminoácido indicado, lo cual genera una formación no adecuada en la secuencia de aminoácidos y esto puede influir en la funcionalidad de la proteína (Edwards *et al.*, 2005; Vargas-Alarc *et al.*, 2013).

Con referencia a estos marcadores, los SNP se han desarrollado de manera más reciente que los SSR, esto debido a que la identificación de estos fue posible con el surgimiento de nuevas tecnologías como la secuenciación masiva. Con respecto a la identificación de marcadores SNP en camarón blanco, son pocos los estudios reportados, así, la identificación de SNP ha sido posible a partir de regiones codificantes previamente reportadas en el banco de genes (*Genbank*) y al uso de programas computacionales que permiten el resumen de información (Du *et al.* 2009; Ciobanu *et al.* 2010). Entre los estudios que han utilizados este tipo de bases de datos se encuentran el realizado por Yu y colaboradores (2006), quienes identificaron dos SNP relacionados con la hormona hipergluceémica, la cual está relacionada con el proceso de muda en crustáceos. Asimismo, utilizando programas bioinformáticos, Gorbach y colaboradores (2009), evaluaron más de 3,000 secuencias expresables (EST), donde se identificaron 504 SNP adecuados para su uso en el análisis de variabilidad genética en camarón blanco. Igualmente utilizando secuencias EST de *Genbank*, Liu y colaboradores (2012) reportan la presencia de marcadores SNP e identifican que las transiciones son más comunes, 5,000 transiciones de C - T y 4,500 de A - G, además de alrededor de 2,000 transversiones de A - C. Más reciente en 2014, un estudio de secuenciación transcriptómica identificó la presencia de 96,040 SNP con alta frecuencia que permitirían el estudio futuro del genoma del camarón blanco (Yu *et al.*, 2014).

## 1.2. Justificación

La producción a nivel nacional del camarón blanco *P. (L.) vannamei* ha disminuido, esto se debe principalmente a la presencia de enfermedades, lo cual amenaza el crecimiento y competitividad de la industria en el país por ello, muchos laboratorios de producción de esta especie en México han adquirido lotes de reproductores (líneas o familias) procedentes de otros países, los cuales han sido seleccionados por resistencia a enfermedades o crecimiento mejorado. Debido a esto es fundamental llevar a cabo la caracterización genética de los lotes de reproductores que han sido introducidos a México. Actualmente se encuentran descritas diversas técnicas moleculares que con las cuales es posible evaluar diversidad genética, entre ellas se encuentran los marcadores microsatélites (SSR) y SNP, los cuales han sido reportados como altamente variables en estudios de poblaciones de esta especie, además, de ser marcadores altamente polimórficos y con gran exactitud; la información generada a partir de estos, permite determinar parámetros genéticos, como el coeficiente de endogamia, con el cual es posible generar estrategias de crianza selectiva y optimizar la producción de camarón en México.

## 1.3. Hipótesis

Las líneas de reproductores de camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, introducidas al país, procedentes de programas de crianza selectiva, son genéticamente diferentes de un lote de organismos silvestres de México.

## 1.4. Objetivos

### 1.4.1. Objetivo general

Evaluar la diversidad y diferencia genética de un lote de muestras silvestres mexicanas y entre siete líneas de reproductores de camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* introducidas a México, mediante marcadores moleculares microsatélites y SNP.

### 1.4.2. Objetivos particulares

- ✚ Determinar la diversidad genética de un lote de muestras silvestres mexicanas y de siete líneas de reproductores de camarón blanco introducidas a México, utilizando doce marcadores microsatélites y un panel 192 marcadores SNP.
- ✚ Evaluar la diferencia genética entre las siete líneas de reproductores de camarón blanco introducidas a México y un lote de muestras silvestres mexicanas.

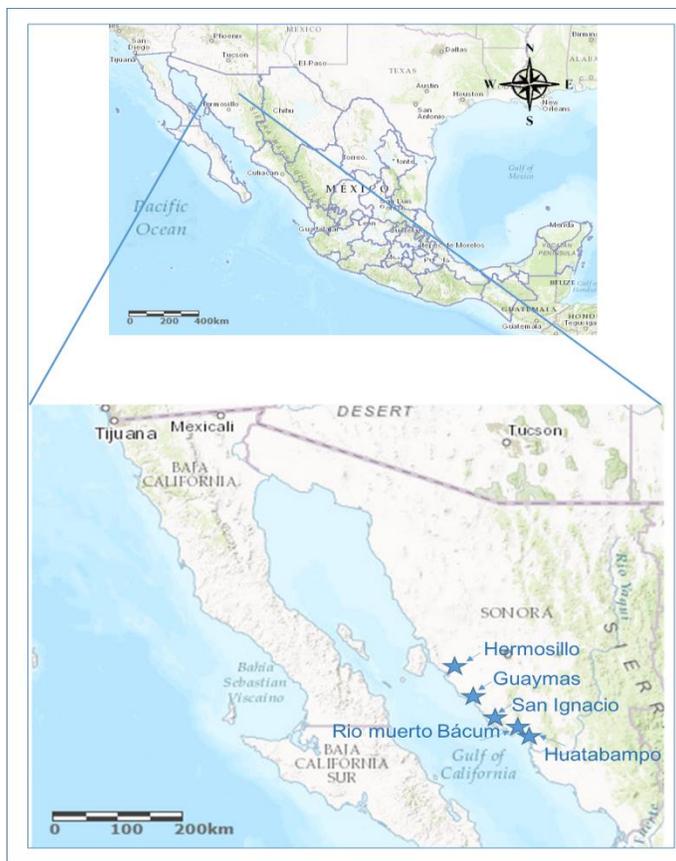
## Capítulo 2. Metodología

---

Para cumplir con los objetivos del trabajo se realizó el análisis de 195 muestras de camarón blanco con dos tipos de marcadores moleculares: microsatélites y SNP. Para ello se muestrearon pleópodos de cada organismo, a partir de los cuales se obtuvo DNA de buena calidad; después se evaluaron 12 pares de oligonucleótidos para microsatélites y se prepararon las muestras para ser analizadas con un panel 192 SNP. Posteriormente se obtuvieron los datos de genotipos. A continuación, se describe de manera detallada la metodología empleada.

### 2.1. Muestreo de individuos

Este estudio se realizó con muestras de siete líneas de reproductores de camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* introducidas a México por dos empresas productoras de postlarvas, ubicadas en el estado de Sinaloa, definidas como empresa A y B (ambas empresas prefirieron mantenerse anónimas); de la empresa A se obtuvieron muestras de una línea y de la empresa B de seis líneas. Además, se contó con un lote de muestras silvestres, colectados en el año 2015 en seis puntos de las costas de Sonora entre Bahía de Kino y Navojoa (Figura 4), sin embargo, se desconoce la procedencia exacta de cada una de las muestras; estas muestras fueron donadas por el Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora, las cuales constituyen la población silvestre mexicana en este trabajo. El número total de muestras silvestres y de individuo por líneas se encuentra descrito en la Tabla 3.



**Figura 4.** Mapa de la República Mexicana, con énfasis en el estado de Sonora, con puntos específicos de muestreo realizado por el Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora (COAES) en el año 2015.

**Tabla 3.** Origen de cada muestra y número total. Número de muestras utilizadas para el análisis con marcadores SSR y SNP del camarón blanco, *P. (L.) vannamei*.

Origen	Código	No. de individuos por origen	No. de muestras para SSR	No. de muestras para SSR vs SNP	No. de muestras para SNP
Muestras silvestres	Lote silvestre	45	35	35	22
Línea 1 (empresa A)	A - 1	30	30	20	20
Línea 2 (empresa B)	B - 1	20	20	20	20
Línea 3 (empresa B)	B - 2	20	20	20	20
Línea 4 (empresa B)	B - 3	20	20	20	20
Línea 5 (empresa B)	B - 4	20	20	20	20
Línea 6 (empresa B)	B - 5	20	20	20	20
Línea 7 (empresa B)	B - 6	20	20	20	20
	Total	195	195	175	162

El muestreo se realizó en reproductores de *P. (L.) vannamei*; los cuales fueron seleccionados al azar, la muestra fue tomada a partir de dos pleópodos de cada organismo, con pinzas y tijeras estériles. Posteriormente las muestras fueron colocadas en tubos de 2 mL y preservadas en etanol al 96 % y almacenadas a -20°C para su análisis posterior.

## **2.2. Extracción de DNA genómico**

La extracción de DNA se llevó a cabo utilizando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue QIAGEN®, siguiendo las instrucciones del proveedor. Una vez obtenido, el DNA fue incubado a 37°C por 40 min con 1.5 µL de RNAsa a una concentración de 30 mg/µL.

Para evaluar la calidad de DNA, en términos de grados de fragmentación de la molécula, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 60 min a 80 volts con solución amortiguadora TBE 1X, en el cual se utiliza como referencia un marcador (escalera) de peso molecular de 1 kb (Promega, G5711). Las muestras de DNA se tiñen con solución amortiguadora de carga 6X, gel red 30X (Biotum®). Para la visualización del DNA se llevó a cabo mediante un sistema digital de fotodocumentación Gel Doc™ XR+ (BIO-RAD) con luz UV y fue fotografiado utilizando el programa Quantity One® (BIO-RAD).

La concentración y pureza (con respecto al contenido de proteínas y solventes) del DNA extraído, se evaluó por medio de espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro ND1000 NanoDrop (Thermofisher®). La concentración de DNA a escala de 50 nm y en unidades de ng/µL se obtuvo utilizando una absorbancia de 260 nm. Además, se registraron las razones 260/280 nm y 260/230 nm en la cual se refleja la relación DNA/proteínas y la relación DNA/Solventes respectivamente. Para considerar el DNA de buena calidad se espera que estas razones se encuentren en el intervalo de valores de 1.6 – 2.0 (Rada y Taboada, 1998).

## **2.3. Estandarización y amplificación de marcadores microsatélites**

Para llevar a cabo la amplificación de los marcadores microsatélites, se realizó un análisis exploratorio en la base de datos genéticos (GenBank) y se seleccionaron 12 pares de oligonucleótidos especie–específicos

(Tabla 4) que amplifican regiones microsatélites. Posterior a esto se procedió a la amplificación de dichos fragmentos mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

Durante la estandarización se utilizaron seis muestras silvestres, estos fueron amplificados a un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  y con una concentración final de los siguientes reactivos: 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de BSA, 0.2 mM de dNTP's, 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.3  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido (primer), 0.1 U/ $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerasa (Kappa Biosystems®), agua de grado biología molecular y 150 ng de DNA total (Anexo I, Tabla 11). Las condiciones de corrida en el termociclador fueron: 5 min a 94°C; seguidos de 35 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min de temperatura de alineamiento (Tabla 4) para cada oligonucleótido y 1 min a 72°C; y una extensión final de 10 min a 72°C. Sin embargo, en aquellos microsatélites que presentaron bandas inespecíficas se realizaron gradientes de temperaturas, con cambios graduales de 2 °C, asimismo, se realizó cambios en los tiempos de anillamiento (45 s) y de extensión (50 s) en algunos pares de oligonucleótidos (para ver la secuencia de los oligonucleótidos, ver Anexo II, Tabla 12).

Algunos microsatélites mostraron patrones no legibles en agarosa al 1.5% después de realizar el gradiente de temperatura y la modificación de tiempos en el termociclador, por lo cual se realizaron gradientes de magnesio (de 0.8 a 1.7 mM), cambios de reactivos (Amortiguador, BSA, dNTP's,  $\text{MgCl}_2$ , oligonucleótidos, agua), así como una prueba con DMSO al 5 %. Los microsatélites que mostraron bandas inespecíficas y patrones no legibles, fueron descartados para el análisis.

Los productos amplificados fueron corridos en geles de agarosa al 1.5% durante 60 min a 100 V, asimismo se incluyó un marcador de peso molecular de 100 pb para verificar la concentración y tamaño del fragmento amplificado (Promega G210A). Para la visualización de los productos de PCR (amplicones) se tiñeron con una solución amortiguadora de carga 6X con colorante Gelred 30X (Biotum®) y se observaron con un sistema digital de fotodocumentación Gel Doc™ XR+ (BIO-RAD) con luz UV y el programa Quantity One® (BIO-RAD).

**Tabla 4.** Descripción de 12 microsatélites especie específicos para camarón blanco. \* indica marcador desarrollado a partir de secuencias expresables (EST).

Genbank	Locus	Tamaño esperado (pb)	Ta (°C)	Motivos de repetición	No. de alelos	Referencia
AF360055	TUMXLv7.56	327	59	(TCC) <sub>5</sub> (CCT) <sub>3</sub> (CCT) <sub>3</sub> (TC) <sub>4</sub> (TC) <sub>4</sub> (TC) <sub>3</sub> (TC) <sub>3</sub> (TC) <sub>3</sub> (CT) <sub>3</sub> (CCT) <sub>3</sub>	4	(Meehan <i>et al.</i> , 2003)
AF360023	TUMXLv5.35	104	52	(CTTT) <sub>3</sub> (AT) <sub>4</sub> (AT) <sub>3</sub>	5	(Meehan <i>et al.</i> , 2003)
AF360076	TUMXLv8.256	166	53	(AAT) <sub>4</sub>	6	(Meehan <i>et al.</i> , 2003)
AF360072	TUMXLv8.220	261	55	(TA) <sub>4</sub> TG(TA) <sub>3</sub> (CA) <sub>3</sub> (CGCA) <sub>3</sub> (CTCA) <sub>6</sub> (CA) <sub>3</sub> (CGCA) <sub>3</sub> (CA) <sub>33</sub> TT(TA) <sub>5</sub> CA(TA) <sub>3</sub> CA(TA) <sub>3</sub>	11	(Meehan <i>et al.</i> , 2003)
AF006629	TUI3224R	185	44	(TAGA) <sub>3</sub> (TAGA) <sub>3</sub> (ACAG) <sub>4</sub> (AG) <sub>21</sub> A(AG) <sub>30</sub>	9	(García y Alcivar-Warren, 2007)
DQ658189	HLJN-001	263-500	60	(AG) <sub>9</sub> GG (AG) <sub>7</sub> GG (AG) <sub>47</sub> C(GA) <sub>2</sub> A (AG) <sub>5</sub> (AAAGAA) <sub>2</sub> (AG) <sub>27</sub>	15	(Zhi-Ying <i>et al.</i> , 2006)
DQ658196	HLJN-008	316-454	60	(TA) <sub>12</sub> GA(TAGA) <sub>4</sub> AAT(AG) <sub>49</sub> A(AG) <sub>10</sub> ATAG A(AG) <sub>10</sub> TGGAAGAT(AG) <sub>6</sub>	18	(Zhi-Ying <i>et al.</i> , 2006)
AY369256	Lvan1	136-146	56	(GTTT) <sub>3</sub> (GT) <sub>7</sub> (GT) <sub>4</sub>	6	(Santos <i>et al.</i> , 2010)
DQ988335	E4	279-326	53	(A) <sub>4</sub> (AG) <sub>6</sub> (AAAG) <sub>3</sub> (A) <sub>6</sub>	10	(Santos <i>et al.</i> , 2010)
AY062928	Pvan1758	163-189	55	(T) <sub>10</sub> (TC) <sub>7</sub> (T) <sub>4</sub> TC	14	(Cruz <i>et al.</i> , 2002)
AY062925	Pvan1815	126-141	55	(T) <sub>7</sub> (CT) <sub>2</sub> (CTTT) <sub>4</sub> (CT) <sub>6</sub>	12	(Cruz, <i>et al.</i> , 2002)
*DQ206401.1	CNM-MG512	249-257	53	(ATGT) GTGT AAGT (ATGT) <sub>3</sub>	6	(Pérez <i>et al.</i> , 2005)

## 2.4. Genotipificación de marcadores

La genotipificación con microsatélites se realizó mediante electroforesis capilar de alta resolución, utilizando el equipo QIAxcel (Qiagen®), con el cual se obtuvo un gel virtual, que permitió identificar el tamaño de los amplicones con una precisión de hasta 20 nucleótidos (Wang *et al.*, 2009), esto permitió unificar y eliminar la subjetividad a la hora de asignar los tamaños alélicos.

En el caso de los marcadores SNP, los organismos fueron genotipificados con un panel de 192 SNP desarrollado para camarón blanco a partir de secuencias expresables (EST), utilizando una plataforma de genotipificación por PCR alelo-específica (KASP™) (Semagn *et al.*, 2014). Este análisis fue realizado en el

Centro para Tecnologías Acuícolas (The Center for Aquaculture Technologies <http://aquatechcenter.com/>) en San Diego, California.

## 2.5. Análisis de datos

Para el análisis de datos se generaron los archivos de entrada empleando el programa CREATE 1.35 (Coombs *et al.*, 2008), para el caso de las matrices de los genotipos con microsatélites. Para la frecuencia de alelos nulos se utilizó el método de máxima verosimilitud en el programa ML-nullFreq (Kalinowski y Taper, 2006) y para el contenido de información polimórfica (PIC, por sus siglas en inglés) para marcadores microsatélites se calculó utilizando el programa Cervus v 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007). Además, para el caso de la matriz de genotipos con SNP, primeramente, se sustituyeron los valores alfabéticos por valores numéricos, luego se generaron los archivos de entrada para realizar los diversos análisis genéticos, con el programa FORMATOMATIC versión 0.8.1 (Manoukis, 2007).

Una vez obtenidos los archivos de entrada para cada una de las matrices (SSR y SNP), se calcularon los parámetros para evaluar diversidad, estructura y diferenciación genética en el lote de muestras silvestres y las líneas de cultivo, los análisis se detallan a continuación.

### 2.5.1. Diversidad genética

La diversidad genética se determinó con base a los siguientes poblacionales: heterocigosidad observada y esperada ( $H_o$  y  $H_e$ , respectivamente), alelos privados (AP) y números de alelos ( $N_a$ ) los cuales fueron calculados utilizando el programa genético GenAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). Asimismo, las frecuencias alélicas y genotípicas de ambos marcadores (SSR y SNP), se utilizó el programa GenePop (Raymond y Rousset, 1995). El Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) calculó siguiendo el procedimiento descrito por Guo y Thompson (1992), usando una prueba análoga a la prueba exacta de Fisher. La prueba se realizó utilizando una prueba modificada del algoritmo aleatorio de la cadena de Márkov, para esta prueba se utilizaron 100,000 pasos de la cadena de Markov y 1,000 pasos de desmemorización (del inglés *dememorization*), esto fue realizado en el programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). La riqueza alélica ( $R_a$ , medida del número de alelos, independiente del número de muestras por población), la cual fue

calculada utilizando el método de rarefacción del programa  $F_{STAT}$  (Goudet, 1995) con la biblioteca hierfstat en el paquete estadístico R (Ihaka y Gentleman, 1996). Además, utilizando estos programas, se obtuvo el coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) por loci y por población.

### 2.5.2. Estructuración genética y diferenciación genética

Para determinar la posible estructuración genética se utilizó el programa STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), que utiliza un modelo bayesiano basado en métodos de agrupamiento (*clusters*), hace agrupaciones de individuos de acuerdo a sus frecuencias alélicas, inferencias sobre a qué población pertenece cada uno de los individuos analizados, en componentes genéticos ( $K$ ), para esto se utilizaron 1,000,000 de MCMC (Cadenas de Márkov Monte Carlo), 500,000 pre - simulaciones (*burn - in*) y 10 interacciones de los procesos iniciales de corrida. Para el análisis de estructura genética del lote de muestras silvestres se hizo un análisis exploratorio con  $K = 8$  (considerando cada punto de muestreo más dos posibles componentes extras) y un análisis final con  $K = 2$ ; a diferencia del análisis de estructura genética de las líneas de reproductores de camarón blanco, donde se realizaron dos análisis exploratorios uno con  $K = 10$  (considerando todas las líneas, el lote de muestras y dos posibles componentes extras), el otro análisis se realizó con  $K = 9$  (dejando fuera del análisis la línea A-1) y por último se hizo un análisis final con el número de componentes determinado ( $K = 3$ ).

Posteriormente, con los resultados de este programa, se implementó la prueba de Evanno (Evanno *et al.*, 2005), en el programa Structure Harvester (Earl y VonHoldt, 2012), utilizando delta  $K$  ( $\Delta K$ ) y el logaritmo de probabilidad media ( $\ln P [D]$ ) que se refiere al número más probable de componentes genéticos ( $K$ ).

Conjuntamente para medir distancias genéticas se calculó el coeficiente de fijación ( $F_{ST}$ ) pareado y su valor de probabilidad ( $p$  - valor) para cada una de las muestras en las líneas de cultivo y el lote de muestras silvestres esto mediante el uso del programa Arlequin versión 2.3 (Excoffier *et al.*, 2005), utilizando 10,000 permutaciones, se calculó el coeficiente de fijación ( $F_{ST}$ ) pareado y su valor de probabilidad ( $p$  - valor) para cada una de las líneas de cultivo y la población silvestre. La prueba de hipótesis nula de esta prueba es que entre las poblaciones o líneas (este estudio no hay diferencias. Por otra parte, utilizando el mismo programa; con las mismas condiciones de corrida, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), el cual mide el nivel de estructura genética, a diferentes niveles jerárquicos: entre poblaciones o líneas (en

este estudio), entre poblaciones o líneas dentro de grupos, entre individuos dentro de las poblaciones o líneas y entre individuos.

Además se realizó un análisis discriminante de componentes principales (ADCP) utilizando la biblioteca Adegenet (Jombart, 2008), en el paquete estadístico R (Ihaka y Gentleman, 1996), donde el propósito principal es disminuir las variables del análisis (en este caso el número de loci), identificando aquellos loci que tienen un mayor efecto en la estructura poblacional, lo cual facilita identificar la agrupación entre los individuos.

Por otra parte, se realizó un análisis por distancia genética con la prueba de distancias de Nei (Nei, 1972) y se construyó un dendrograma de similitud genética empleando el método del vecino más cercano (*Neighbour-Joining*) en el programa Populations v. 1.2.32 (Langella, 1999). La estabilidad de las ramas en el dendrograma fue probada estadísticamente con 900 repeticiones (*Bootstrapping*). Para visualizar la similitud del lote de muestras silvestres y las siete líneas de cultivo se utilizó el programa FigTree v.1.4.3 (Rambaut, 2012).

### 2.5.3. Análisis estadístico

Los datos de número de alelos, riqueza alélica, heterocigosidad esperada y observada y coeficiente de endogamia por lote/línea fueron sometidos a pruebas de normalidad de Shapiro Wilk y de homocedasticidad de varianza de Levene. Posteriormente, los parámetros genéticos que presentaron normalidad fueron sometidos a un ANOVA de una vía (f-Fisher) para determinar la presencia de diferencias entre poblaciones, lote y/o líneas de cultivo para este estudio, mientras que, para aquellos parámetros que presentaron diferencias significativas se aplicó una prueba *a posteriori* de Tukey para identificar entre qué poblaciones (líneas) había diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha = 0.05$ ).

Los parámetros que no se ajustaron a la normalidad, se sometieron a una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y para determinar entre qué poblaciones había diferencias se aplicó una prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

Con respecto al coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), se realizó una prueba de normalidad de los datos. En caso de presentar normalidad se hizo una prueba t-Student de pruebas simples, tomando como hipótesis nula

que los promedios son iguales a cero (0), es decir que indican que la población se encuentra en panmixia. El intervalo de este parámetro va de -1 a 1, donde los valores cercanos a -1 indican alto nivel de exogamia y los valores más cercanos a 1 un alto índice de endogamia (Curtis *et al.*, 2008). Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa STATISTICA versión 10.

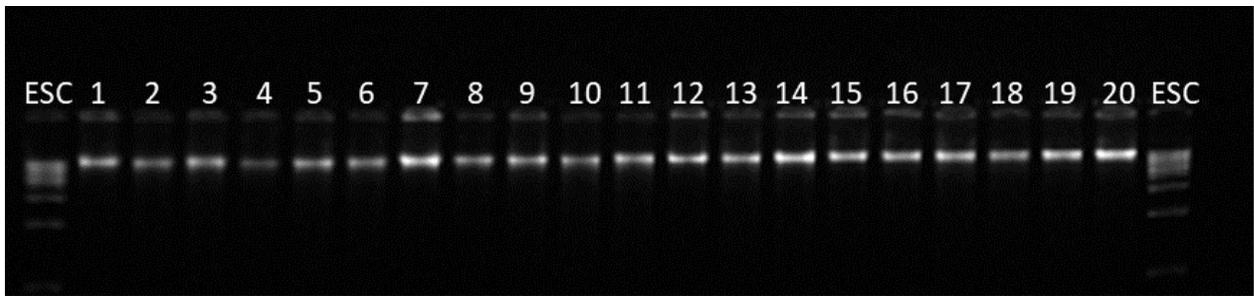
Para determinar la significancia estadística de las desviaciones del equilibrio de Hardy – Weinberg, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Dunn Šídák.

## Capítulo 3. Resultados

---

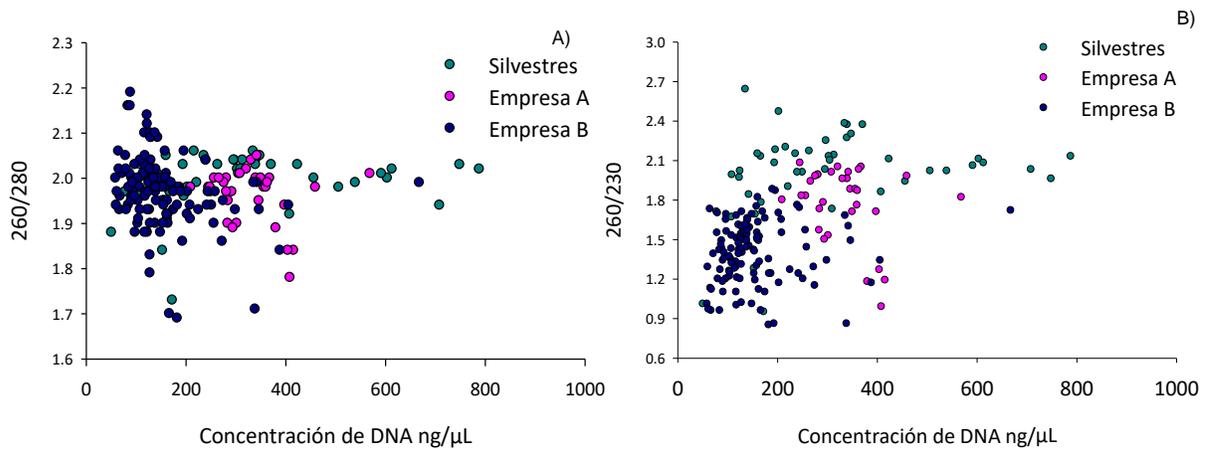
### 3.1. Extracción y calidad de DNA

El intervalo de las concentraciones de DNA obtenidas fue de 50 a 790 ng/  $\mu$ L. Del total de muestras solamente el 10 % tuvo una concentración menor a 100 ng/  $\mu$ L. Todas las muestras de DNA resultaron de alto peso molecular ( $> 12,000$  pb) y poca o nula degradación, como se observa en el ejemplo de 20 muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Evaluación del DNA de 20 muestras de camarón blanco de la empresa A. Gel de Agarosa al 1%. Corrida durante 60 min a 90 volts con solución amortiguadora TBE 1X, muestras estandarizadas a de 50 ng/  $\mu$ L. escalera de peso molecular de 1 Kb (Promega, G5177).

La relación de absorbancia DNA/ proteínas (260/280) y su desviación estándar, fue de  $1.99 \pm 0.05$  en promedio, en el lote de muestras silvestres  $1.93 \pm 0.07$  en las líneas de cultivo de la empresa A y  $1.96 \pm 0.06$  en las muestras de líneas de cultivo de la empresa B (Figura 6, A). Sin embargo, la relación de absorbancia entre DNA y otros solventes (260/230) presentó mayor variabilidad, en el lote de muestras silvestres fue de  $1.99 \pm 0.31$  en promedio, en la empresa A fue de  $1.44 \pm 2.08$ , siendo está la que presentó mayor desviación estándar y, por último, la empresa B con  $1.77 \pm 0.28$  en promedio (Figura 6, B).



**Figura 6.** Dispersión de las razones para determinar calidad de DNA. En las gráficas se muestran las relaciones para las muestras de DNA de camarón blanco con respecto a la concentración de DNA en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , donde se muestra: A) la relación 260/280 (proteínas), B) la relación 260/230 (solventes).

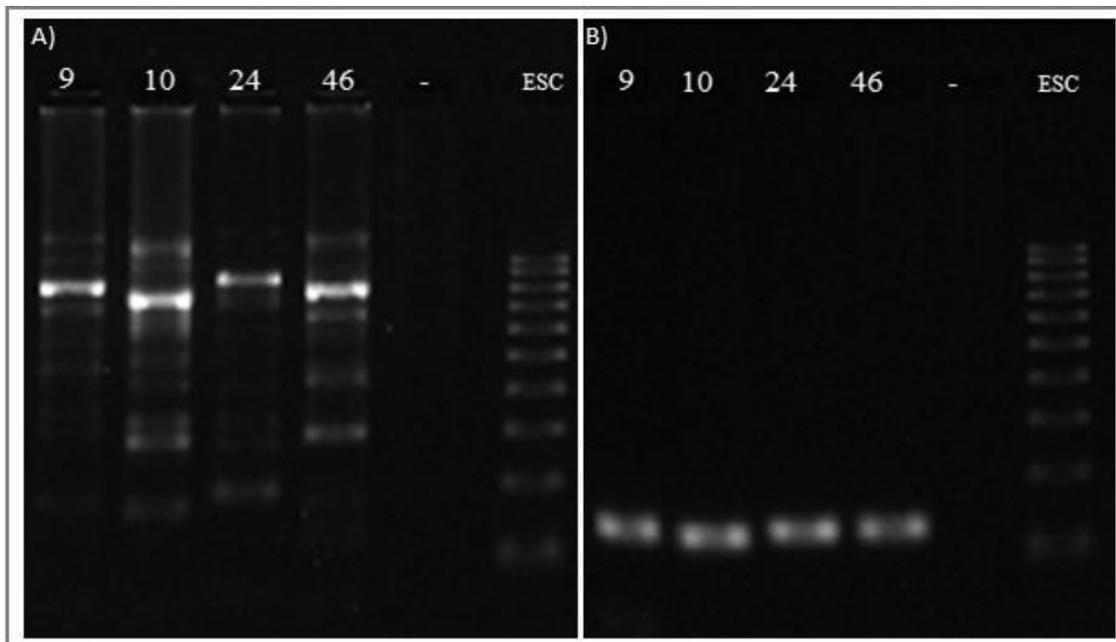
Por lo que se logró obtener DNA de todas las muestras, con buena calidad con respecto a la integridad observada en geles de agarosa y sin contaminación de proteínas y solventes, para la mayoría de las muestras, excepto en las muestras de las líneas de la empresa A (20%), que dieron por debajo de la relación de absorbancia 260/230 recomendada ( $> 1.6$ ).

## 3.2. Diversidad genética de muestras silvestres y siete líneas de cultivo

### 3.2.1. Genotipificación genética

#### 3.2.1.1. Marcadores microsatélites (SSR)

De la lista de los 12 marcadores SSR seleccionados inicialmente, seis fueron estandarizados exitosamente (TUMXLv5.35, Pvan1815, TUMXLv7.56, TUMXLv8.220, TUMXLv8.256 y CNM-MG512). El resto de los marcadores (Pvan1758, TUI3224R, E4, Lvan1, HJLN-001 y HJLN-008) presentaron bandas inespecíficas (Figura 7) aún después de realizar diversas pruebas para eliminar este bandedo, por lo cual fueron excluidos del presente estudio.



**Figura 7.** Ejemplo de estandarización de marcadores microsatélites especie específicos de camarón blanco, utilizando cuatro muestras silvestres. A) Microsatélite Lvan1 (no estandarizado); B) Microsatélite TUMXLv5.3 (estandarizado). Gel de agarosa al 1.5 %, corrida durante 40 min a 90 V, escalera de peso molecular de 100 pb (Promega G210A).

Por lo que de los seis marcadores SSR, solo se obtuvo producto de amplificación en el lote de muestras silvestres, mientras que en las líneas de cultivo solo se logró en el 12.5% de los individuos (Tabla 5) del total de las muestras (n = 150). Por lo cual el análisis de diversidad genética utilizando marcadores SSR solo se realizó en la muestra silvestre de camarón blanco (sección 3.2.2).

**Tabla 5.** Relación de amplificación de marcadores microsatélites en el lote de muestras silvestres y por línea de cultivo de camarón blanco.

Línea / SSR	TUMXLv5.35	Pvan1815	TUMXLv7.56	TUMXLv8.220	TUMXLv8.256	CNM-MG512
Silvestres	44	45	43	43	43	45
Línea 1 (empresa A)	2	1	4	2	3	4
Línea 2 (empresa B)	1	9	3	1	4	9
Línea 3 (empresa B)	1	1	0	0	0	2
Línea 4 (empresa B)	1	0	0	0	0	4
Línea 5 (empresa B)	1	0	0	0	0	0
Línea 6 (empresa B)	1	0	0	0	0	0
Línea 7 (empresa B)	0	0	0	0	0	0
Total de amplificaciones	7	11	7	3	7	19
Porcentaje correspondiente	4.6 %	7.3 %	4.6 %	2 %	4.6 %	12.6 %

### 3.2.1.2. Marcadores SNP

Del panel de 192 marcadores SNP, solo se genotipificaron 164 en la mayoría de los individuos. De los cuales, se hizo una depuración de marcadores, considerando aquellos que fueron genotipificados en más del 80% de los individuos. Por lo que, para el lote de muestras silvestres, solamente 104 SNP fueron genotipificados en más del 80% ( $n = 35$ ) de los individuos y utilizados para el análisis de diversidad y estructura genética de este lote, mientras un total de 136 SNP se genotipificaron para la mayoría de las muestras (silvestres  $n = 24$  y para las líneas de cultivo  $n = 138$ ) para el análisis de diversidad genética y estructura de las líneas de cultivo de camarón blanco

### 3.2.2. Diversidad genética de un lote de muestras silvestres: marcadores SSR

Para el análisis del lote de muestras silvestres ( $n = 35$ ) fueron utilizados seis marcadores SSR los cuales presentaron un contenido de información polimórfica (PIC) en promedio de 0.823 (D.E = 0.104), con un

intervalo de 0.656 hasta 0.929, siendo altamente informativos. Donde el valor más alto de PIC lo presento el locus TUMXLv8.220 y el menor valor el locus CNM-MG512 (Tabla 7).

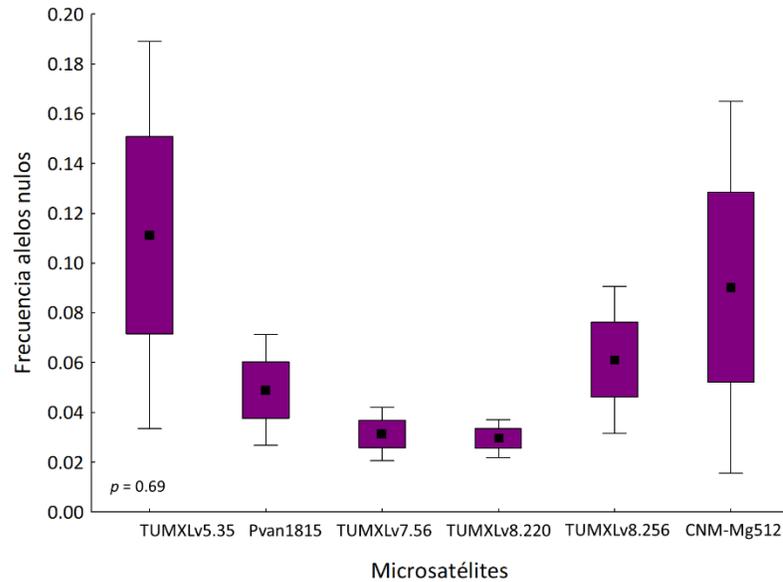
Con respecto a la presencia de alelos nulos (An), se detectó que los SSR TUMXLv5.35 y CNM-MG512 presentaron la mayor frecuencia de An (11% cada locus), el locus con menor frecuencia fue el TUMXLv7.56, además, no se registraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores obtenidos por cada locus (Figura 8).

En este estudio, el número de alelos (Na) obtenidos varió de 8 a 23, siendo el locus TUMXLv7.56 el más informativo y los menos informativos los locus TUMXLv5.35 y CNM-MG512. Con respecto a la riqueza alélica se presentó  $13.494 \pm 6.024$  en promedio, manteniéndose el mismo orden de dominancia que con el número de alelos (Tabla 7).

**Tabla 6.** Parámetros genéticos de un lote de muestras silvestres evaluada con marcadores microsatélites. n: número de individuos, PIC: Contenido de información polimórfica, An: Frecuencia de alelos nulos, Na: Número de alelos, Ra: Riqueza alélica, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, EHW: ajuste al Equilibrio de Hardy-Weinberg, Fis: coeficiente de endogamia.

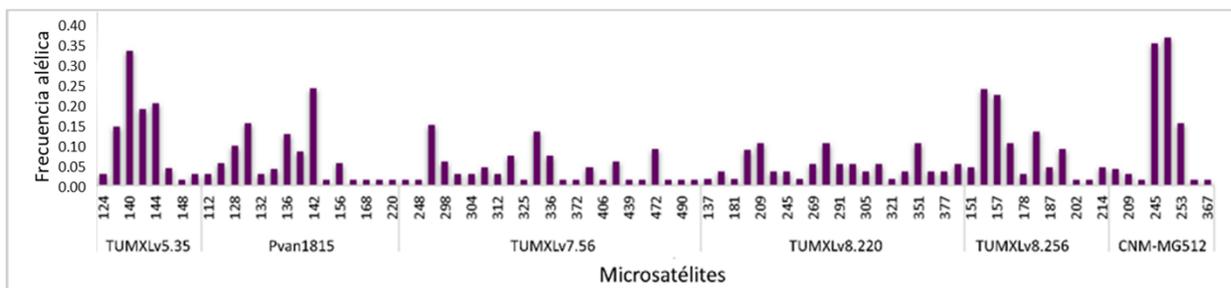
Origen	Locus	n	PIC	An	Na	Ra	Ho	He	EHW	Fis
Silvestre	TUMXLv5.35	34	0.750	0.111	8	7.76	0.147	0.781	***	0.817***
	Pvan1815	35	0.859	0.062	15	13.91	0.371	0.871	***	0.583***
	TUMXLv7.56	33	0.917	0.042	23	21.26	0.485	0.922	***	0.486***
	TUMXLv8.220	28	0.929	0.048	20	20.00	0.393	0.933	***	0.591***
	TUMXLv8.256	33	0.826	0.083	11	10.66	0.333	0.844	***	0.615***
	CNM-MG512	35	0.656	0.111	8	7.35	0.229	0.707	***	0.684***
	Promedio		0.823	0.076	14.16	13.49	0.326	0.843	***	0.629***
	D.E		0.104	0.031	6.306	6.02	0.121	0.087		0.112

D.E: Desviación estándar.  $\alpha = 0.0081$ . Significancia estadística: \* = significativo, \*\* = altamente significativo, \*\*\* = muy altamente significativo.



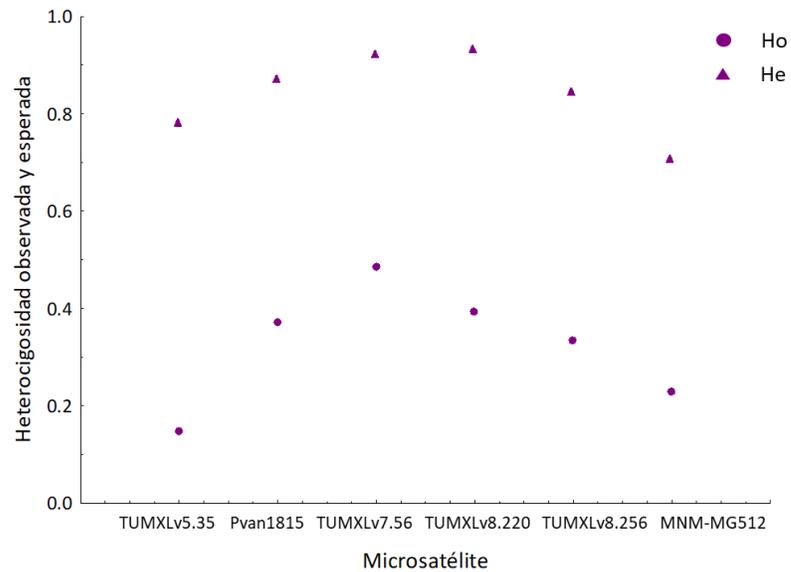
**Figura 8.** Frecuencia de alelos nulos en seis marcadores microsatélites utilizados para evaluar diversidad genética en un lote de muestras ( $n = 24$ ) de camarón blanco.

Con respecto a la frecuencia alélica de los alelos en cada locus evaluado, se observa que todos los loci presentaron entre uno y tres alelos con mayor proporción que el resto. En la figura 9, se puede apreciar la distribución de alelos y su frecuencia para cada SSR. En el caso del locus TUMXLv5.35, el alelo con mayor frecuencia fue el 140 (con una proporción de 0.338), para el locus Pvan1815 el alelo más común fue el 142 con 0.243. Por otra parte, en el locus TUMXLv7.56 que fue el que presentó mayor número de alelos, solo tuvo un alelo con mayor frecuencia el 283 (0.152); a diferencia del locus TUMXLv8.220 el cual registró tres alelos con igual frecuencia 209, 285 y 351 (los tres con una proporción de 0.107), en el caso del locus TUMXLv8.256 el alelo más común fue el 154 (0.242) y por último en el locus CNM-MG512 el alelo más común fue el 249 (0.371) dichos datos se presentan en la Tabla 14 del Anexo III.



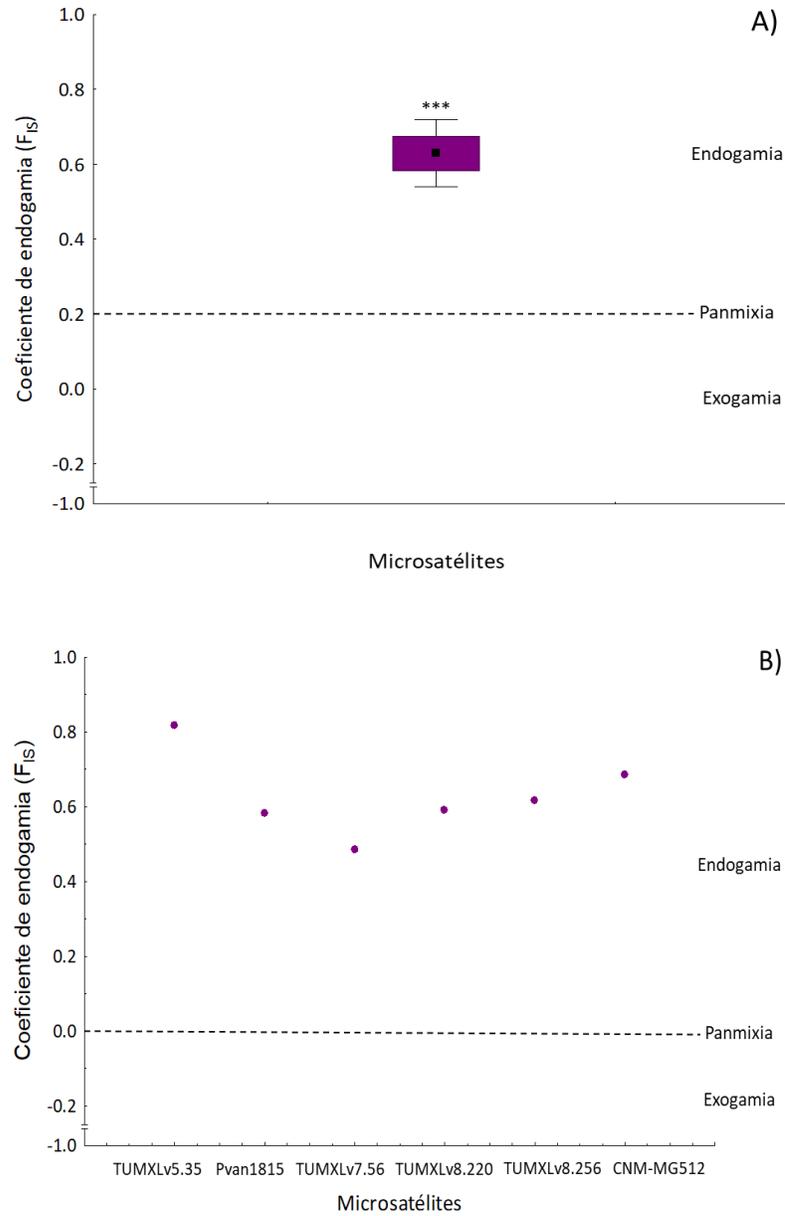
**Figura 9.** Frecuencias alélicas correspondientes a los seis loci microsatélites evaluados en las muestras silvestres mexicanas de camarón blanco.

La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) para este lote de muestras silvestres tuvo un intervalo de 0.147 a 0.485, el valor más alto se presentó en el locus TUMXLv7.56 y el más bajo en el locus TUMXLv5.35. Mientras que, la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) vario de 0.707 (locus CNM-MG512) a 0.933 en el locus TUMXLv8.220. Todos los loci evaluados para estas muestras se encontraron fuera del Equilibrio de Hardy-Weinberg, con una diferencia altamente significativa ( $p < 0.05$ ; Tabla 7; Figura 10).



**Figura 10.** Heterocigosidad observada y esperada del lote de muestras silvestres de camarón blanco evaluada con seis marcadores moleculares microsatélites.

Por otro lado, el coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), en los seis locus evaluados se registró un intervalo de 0.486 a 0.817, el locus que presentó el mayor  $F_{IS}$  fue el TUMXLv5.35 y el que registró el menor valor fue el TUMXLv7.56 (Figura11) respectivamente. Lo anterior coincidió con los parámetros de número de alelos y riqueza alélica. Además, resultaron ser diferentes de cero ( $p < 0.05$ ), por lo cual el lote de muestras silvestres evaluada presentó un alto coeficiente endogamia ( $0.629 \pm 0.111$ ).



**Figura 21.** Coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) de un lote de muestras silvestres de camarón blanco evaluada con marcadores SSR. A)  $F_{IS}$  en general por lote de muestras; B)  $F_{IS}$  por SSR evaluado. Asteriscos indican significancia estadística con respecto a la prueba t-Student. \* =significativo, \*\* =altamente significativo y \*\*\* = muy altamente significativo. Línea punteada separa cuadrantes, de 0 a 1 cuadrante endogamia, 0 = panmixia y de 0 a -1 cuadrante de exogamia.

### 3.2.3. Diversidad genética en un lote de muestras silvestres: marcadores SNP

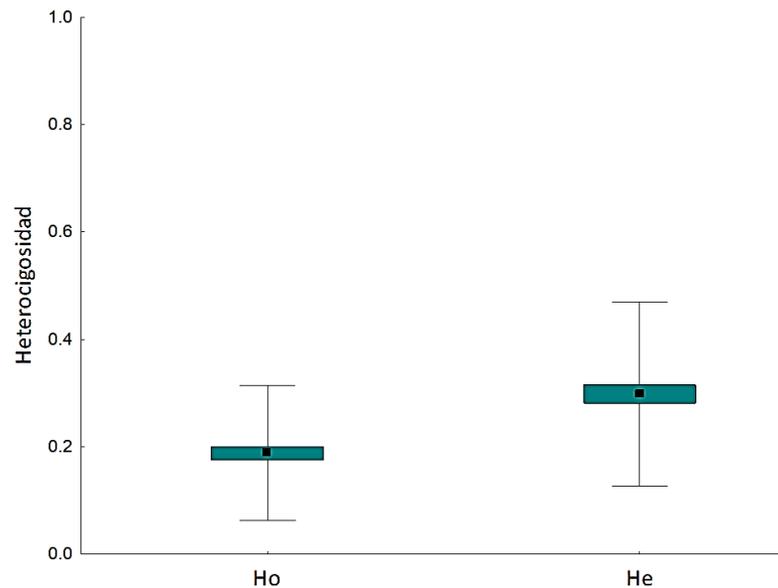
El número de alelos (Na) registrados con 104 marcadores SNP tuvo un intervalo de 1.79 a 2; la riqueza alélica (Ra) presentó patrones similares, variando su intervalo de 1.5 a 2; sin diferencias estadísticamente significativas los loci para ambos (Tabla 7).

**Tabla 7.** Parámetros genéticos de un lote de muestras silvestres evaluada con 104 marcadores SNP. n: número de individuos, Na: número de alelos, Ra: riqueza alélica, Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada, EHW: Equilibrio de Hardy-Weinberg, Fis: coeficiente de endogamia, FAM: Frecuencia del alelo menos común.

Lote de muestras		n	Na	Ra	Ho	He	EHW	Fis	FAM
Silvestre	Promedio	32.317	1.89	1.86	0.185	0.298	ns	0.326***	0.050
	D.E.	3.157	0.31	0.31	0.120	0.172	ns	0.271	0.033

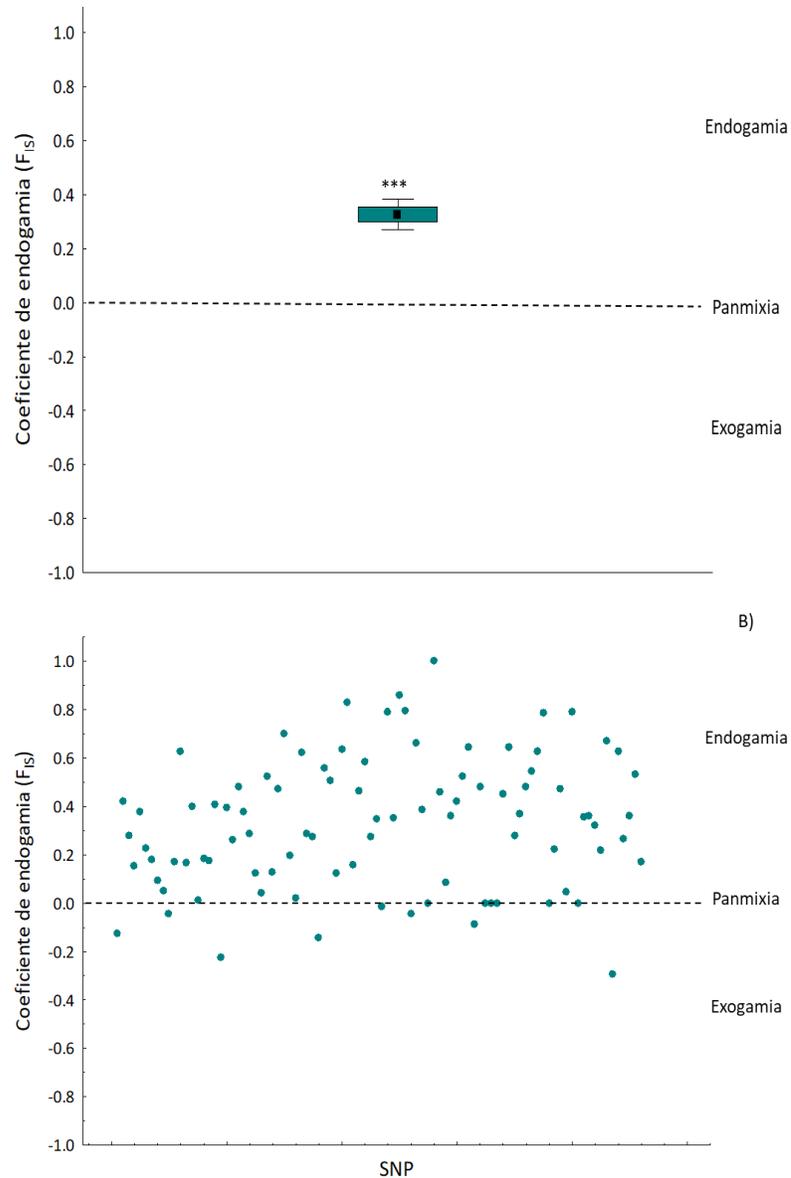
D.E: Desviación estándar. Significancia estadística: \* = significativo, \*\* = altamente significativo, \*\*\* = muy altamente significativo.

La heterocigosidad observada (Ho) registró un mínimo de 0 hasta 0.419, igualmente en la heterocigosidad esperada (He) el valor más bajo fue de 0 en once de los 104 loci evaluados y el valor más alto fue de 0.507 (Figura 12). De acuerdo a los cálculos del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se encontró que todos los loci están en equilibrio (Tabla 7).



**Figura 12.** Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) de un lote de muestras silvestres de camarón blanco evaluada con 104 marcadores moleculares SNP.

Las muestras silvestres de camarón blanco con marcadores SNP presentaron un  $F_{IS}$  de  $0.326 \pm 0.270$  en promedio, indicando este valor como moderadamente endogámico con alta significancia de acuerdo a la prueba t-Student realizada (Figura 13). No obstante, algunos loci presentaron valores de  $F_{IS}$  que indican que son altamente endogámicos, el 82 % de los loci fueron endogámicos, mientras que otros loci mostraron valores bajos que indican ligera exogamia (8.6 %); uno de estos fue el locus SNP86, el cual presento un  $F_{IS}$  de 1 y el locus SNP139 el cual tuvo un  $F_{IS}$  de -0.299.



**Figura 33.** Coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) de un lote de muestras silvestres de camarón blanco evaluada con marcadores SNP. A)  $F_{IS}$  promedio para el lote de muestras; B)  $F_{IS}$  por marcador SNP analizado. Asteriscos indican significancia estadística con respecto a la prueba t-Student. \* = significativo, \*\* = altamente significativo y \*\*\* = muy altamente significativo. Línea punteada separa cuadrantes, de 0 a 1 cuadrante endogamia, 0 = panmixia y de 0 a -1 cuadrante de exogamia.

### 3.2.4. Diversidad genética de líneas de cultivo: marcadores SNP

Todas las muestras silvestres y las líneas de cultivo empleadas en este análisis presentaron un intervalo de 1 a 2 alelos por locus, asimismo, la riqueza alélica tuvo un mínimo de 1.7 y un máximo de 2 (Tabla 8), ambos parámetros no mostraron significancia estadística entre líneas ( $p > 0.05$ ). Por otra parte, la única línea que mostró alelos privados fue la A-1, donde se registraron dos alelos privados en los loci SNP 118 y SNP 134. En el locus SNP 118 la mayoría de los alelos fueron guanina, excepto en el individuo 22 de esta línea (A-1-22), el cual presentó una mutación de tipo transición (guanina a timina; G  $\rightarrow$  T), mientras que el locus SNP 134, donde la mayoría de los alelos de este locus fueron adenina, el individuo 9 (a-1-9) presentó una mutación de tipo transversión, el cual presento una sustitución de una adenina por una citosina (A  $\rightarrow$  C), la frecuencia de estos alelos fue de 0.026 y 0.025 respectivamente.

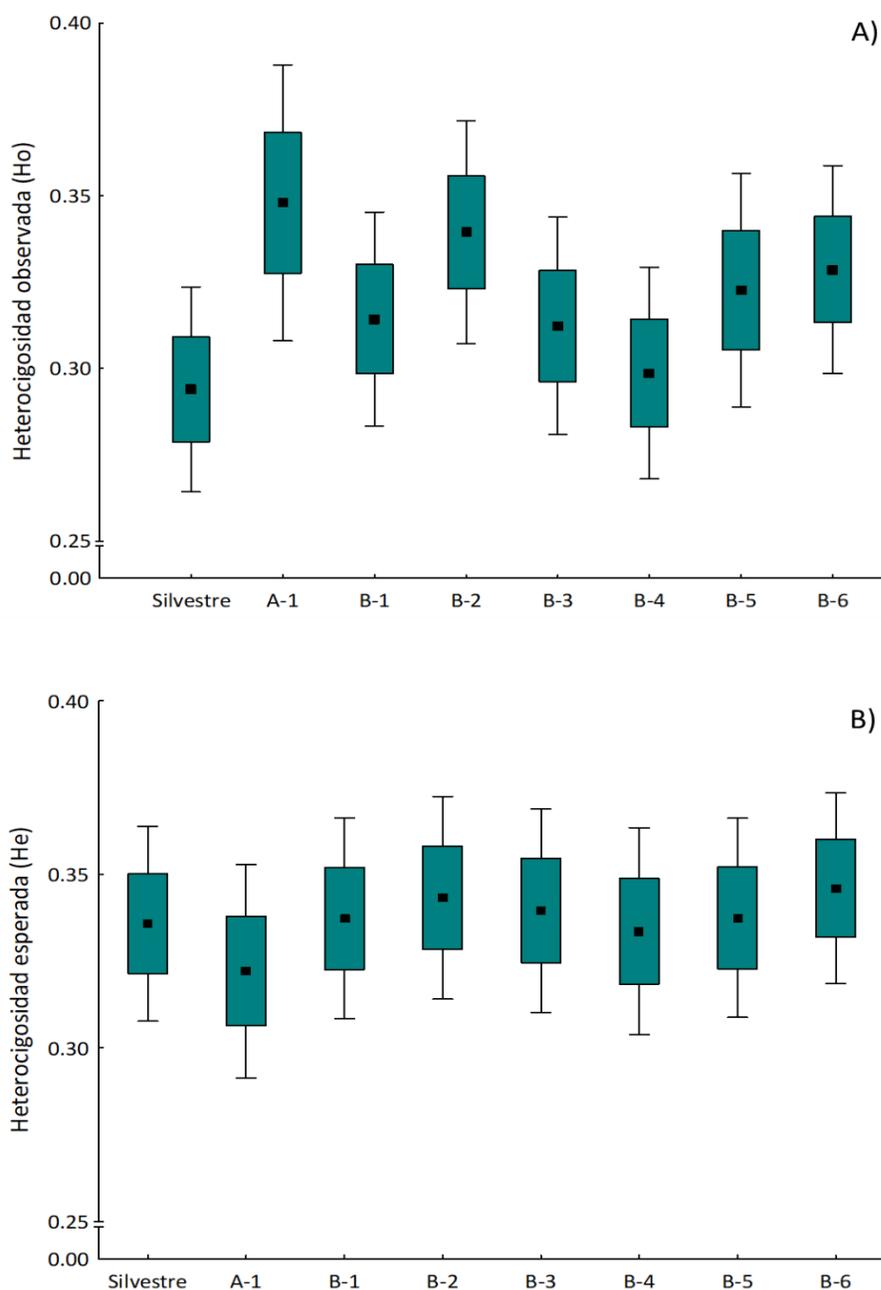
**Tabla 8.** Parámetros de diversidad genética de un lote de muestras silvestres y siete líneas de cultivo de camarón blanco evaluada con 136 marcadores SNP. n: Número de individuos, Na: Número de alelos, Ra: Riqueza alélica, Ap: Alelos privados, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, EHW: ajuste al Equilibrio de Hardy-Weinberg,  $F_{IS}$ : coeficiente de endogamia, FAM: Frecuencia del alelo menos común.

Lote /Línea	n	Na	Ra	Ap	Ho	He	EHW	$F_{IS}$	FAM
Silvestre	24	1.93	1.90	-	0.294	0.336	ns	0.129***	0.021
A-1	20	1.87	1.85	2	0.348	0.322	ns	-0.078***	0.025
B-1	20	1.91	1.89	-	0.314	0.337	ns	0.075***	0.025
B-2	19	1.90	1.89	-	0.339	0.343	ns	0.013	0.026
B-3	20	1.91	1.89	-	0.312	0.340	ns	0.081***	0.025
B-4	20	1.89	1.87	-	0.299	0.334	ns	0.099***	0.025
B-5	19	1.94	1.93	-	0.323	0.337	ns	0.050	0.026
B-6	20	1.93	1.91	-	0.329	0.346	ns	0.048***	0.025
Promedio		1.91	1.89		0.320	0.337		0.052	0.025
D.E.		0.02	0.02		0.019	0.007		0.063	0.002

D.E: Desviación estándar. Significancia estadística: \* = significativo, \*\* = altamente significativo, \*\*\* = muy altamente significativo, ns: no significativo.

Con respecto a la heterocigosidad observada en el lote de muestras silvestres y las siete líneas de cultivo, se registró valor de  $0.320 \pm 0.019$  en promedio general, la línea que presentó la mayor proporción de individuos heterocigotos fue la A-1 ( $0.348 \pm 0.237$ ). Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los promedios (Figura 14 A). La heterocigosidad esperada tuvo un promedio general ligeramente mayor ( $0.337 \pm 0.007$ ) que el registrado para la heterocigosidad observada ( $0.320 \pm 0.019$ ), este fue de  $0.337 \pm 0.173$ , no obstante, todas presentaron promedios similares y no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las líneas evaluadas (Figura 14, B).

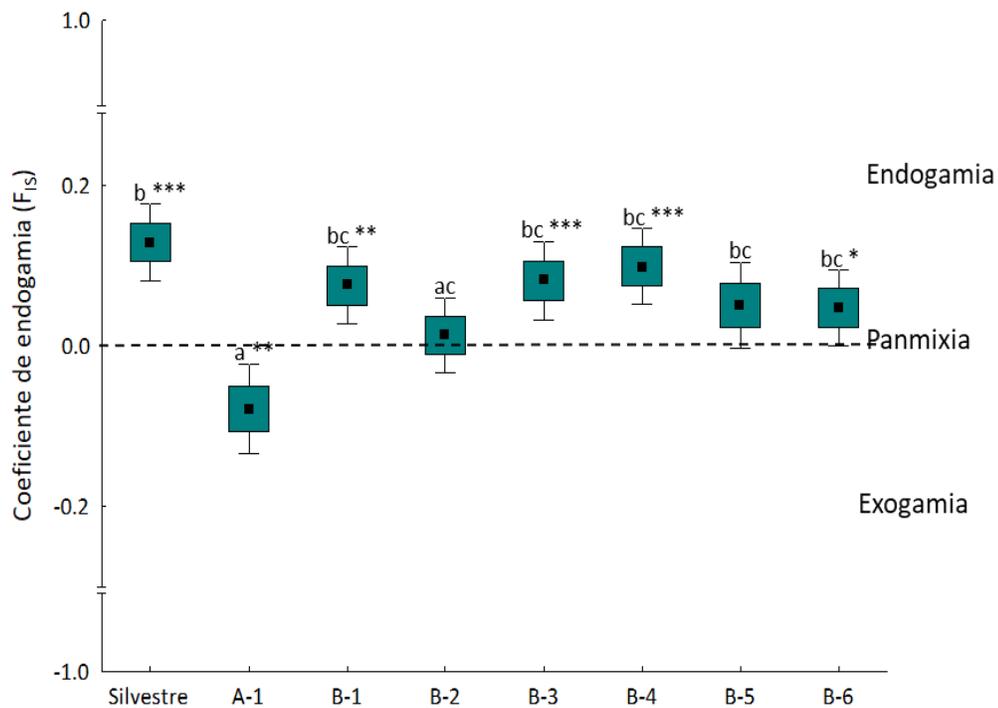
Todos los loci evaluados (136) en el lote de muestras silvestres y las siete líneas de cultivo estuvieron dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 8) después de aplicar la corrección de Dunn Šídák para comparaciones múltiples ( $p > 0.000061$ ).



**Figura 14.** Heterocigosidad observada (A) y esperada (B) de un lote de muestras silvestres y siete líneas de cultivo camarón blanco evaluadas con marcadores SNP. A-1) Empresa A, de B-1 a B-2) Empresa B.

Por otra parte, con respecto al coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas; donde se indica que el promedio de  $F_{IS}$  de la línea A-1 es igual solamente a la línea B-2 y diferente al lote de muestras silvestres y al resto de las líneas ( $p < 0.05$ ). Además, a excepción de la línea B-2, el resto de las líneas pertenecientes a la empresa B resultaron ser iguales al lote de muestras silvestres y entre ellas. Mientras que la línea B-2, mostró se estadísticamente diferente del lote de muestras silvestres ( $p = 0.032$ ) (Figura 15).

Las muestras silvestres registraron el valor más alto de endogamia con un valor de  $F_{IS}$  de  $0.129 \pm 0.252$ ; las líneas B-1, B-3, B-4 y B-6 tuvieron valores en un intervalo de 0.048 a 0.099 registrando una tendencia a la endogamia en todas las líneas ( $p < 0.05$ ). Mientras que las B-2 y B-5 registraron valores de endogamia promedio de  $0.013 \pm 0.246$  y  $0.050 \pm 0.282$ , respectivamente; ubicando a estas líneas en panmixia. A diferencia de la línea A-1, la cual registro el valor más bajo de  $F_{IS}$  ( $-0.078 \pm 0.296$ ) ubicando este valor con una tendencia ligera de exogamia (Figura15).

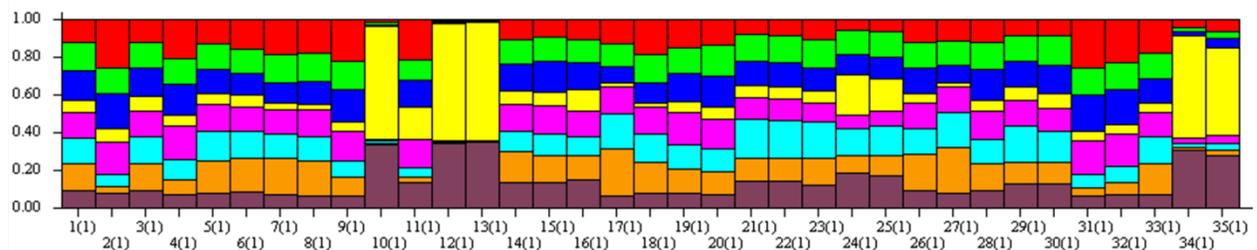


**Figura 45.** Coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) en un lote de muestras silvestres mexicanas y siete líneas de cultivo de camarón blanco, evaluadas con 136 marcadores SNP. A-1) Empresa A, de B-1 a B-2) Empresa B. Asteriscos indican significancia estadística con respecto a la prueba t-Student. \* = significativo, \*\* = altamente significativo y \*\*\* = muy altamente significativo. Línea punteada separa cuadrantes, de 0 a 1 cuadrante endogamia, 0 = exogamia y de 0 a -1 cuadrante de panmixia (Curtis *et al.*, 2008).

### 3.3. Estructuración y diferenciación genética

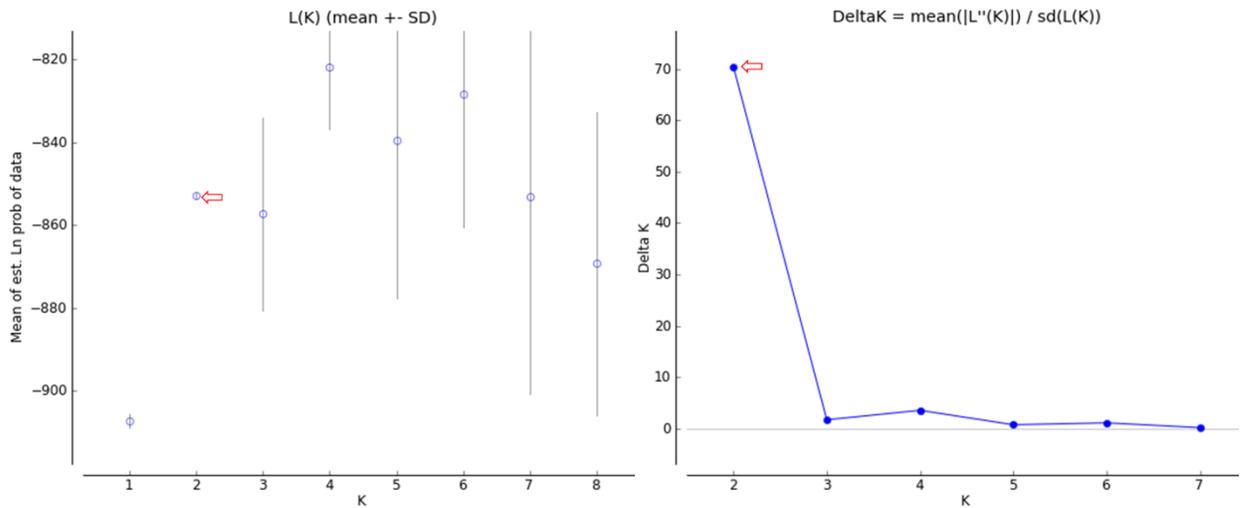
#### 3.3.1. Estructuración y diferenciación genética del lote de muestras silvestres: marcadores SSR

Para determinar la estructuración y diferencias de las muestras silvestres colectadas de seis puntos de muestreo (Figura 4), se realizó un análisis exploratorio del número más probable de componentes genéticos dentro de ella. El primer análisis con el programa STRUCTURE fue realizado con un número de componentes de  $K = 8$ , esto considerando los seis puntos de muestreo y agregando 2 componentes extras para identificar una posible estructuración dentro de esta área. Los resultados indican que no se identifica una estructura (Figura 16) y que en algunos individuos (10, 12, 13 34 y 35) se presenta una distribución diferente del resto con una componente genética predominante, componente amarillo en Figura 16.

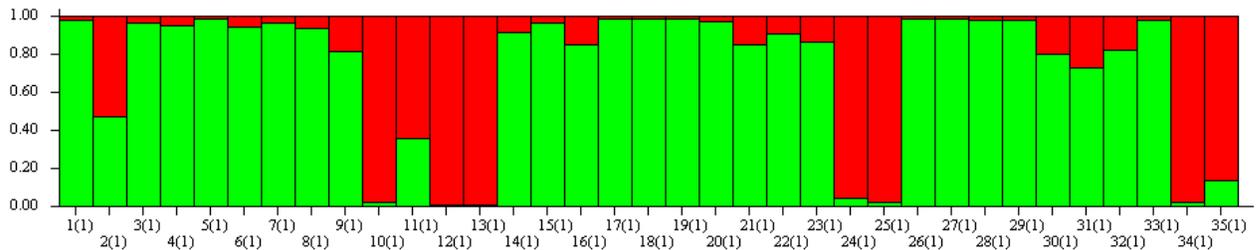


**Figura 56.** Estructura genética de un lote de muestras silvestres de camarón blanco evaluada con ocho componentes genéticos (valor de  $K$  asignado) obtenido a partir de marcadores microsatélites (SSR).

De acuerdo estos resultados a partir del programa Structure Harvester, utilizando el promedio de mayor probabilidad de componentes y el Delta  $K$ , se determinó que la población silvestre se encuentra subdivida en dos componentes genéticos (Figura 17). Por lo cual, para el segundo análisis en STRUCTURE, con un  $k=2$  el resultado muestra que el número de individuos que pertenecen a cada uno de los componentes es diferente. El componente 1 (color verde) presenta 26 individuos y el componente 2 (color rojo) contiene solamente 9 individuos (Figura 18), el porcentaje de pertenencia de cada individuo a cada componente (verde o rojo) se encuentra descrito en el Anexo IV (Figura 28 y Tabla 14).

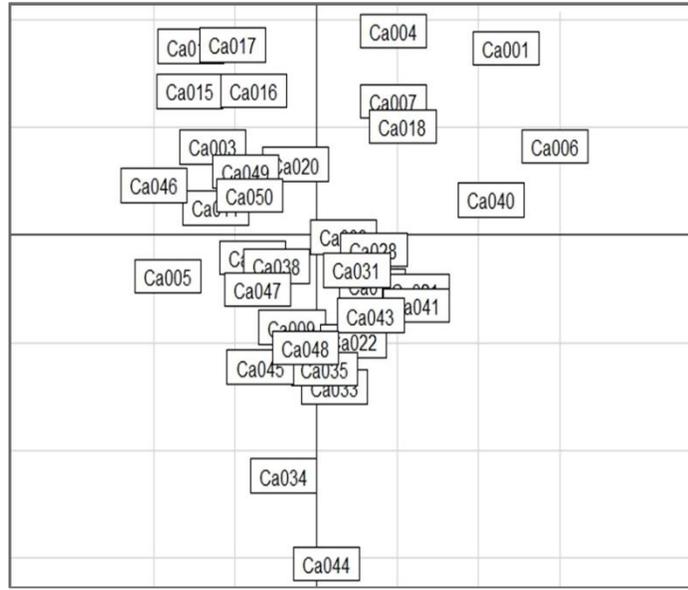


**Figura 67.** Estimación del número de componentes utilizando el logaritmo de la probabilidad media ( $\text{LnP}[D]$ ) derivado de  $\Delta k$  para  $k$  de 1 a 8, para el análisis con seis marcadores moleculares microsatélites (SSR) en muestras silvestres.



**Figura 18.** Estructura genética de muestras de procedencia silvestre de camarón blanco, evaluada con dos componentes genéticos (valor de  $K$  obtenido del Delta  $K$  y el valor promedio de  $K$  obtenido a partir de marcadores microsatélites (SSR)).

Con respecto al análisis discriminante de componentes principales (ADCP) no es posible detectar una agrupación clara, esto utilizando los dos principales ejes (Figura 19), los cuales explican el 10.6 % de la variación total de los individuos analizados (Tabla 15, Anexo V).

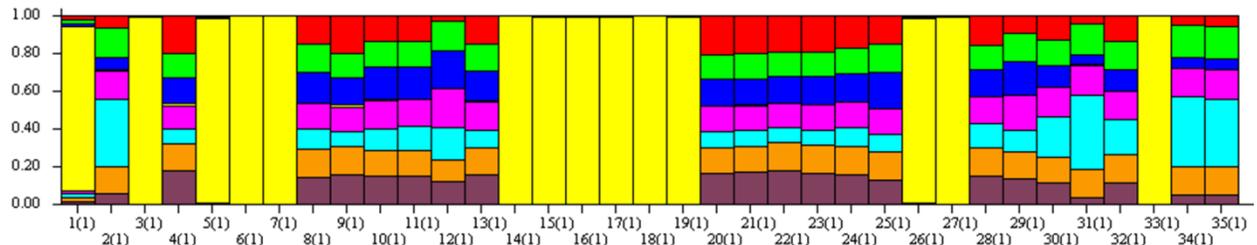


**Figura 19.** Plano cartesiano del análisis discriminante de componentes principales para el lote de muestras silvestres mexicana analizada con marcadores microsatélites (SSR). El eje X, indica el componente principal 1, el eje Y indica el componente principal 2.

### 3.3.2. Estructuración y diferenciación genética en un lote de muestras silvestres: marcadores SNP

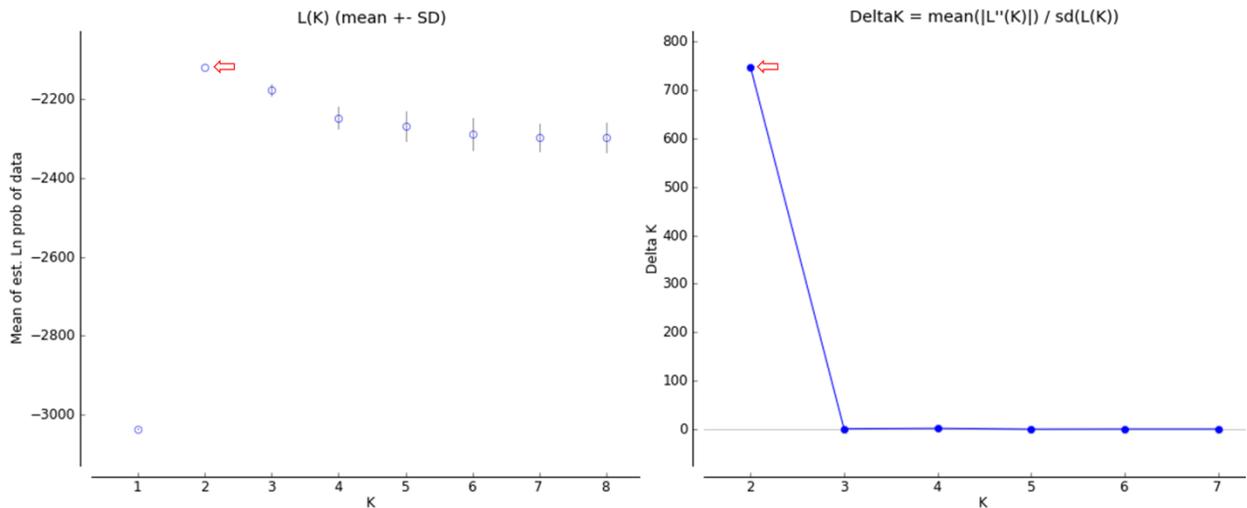
Al igual que en el caso de marcadores SSR, el primer análisis exploratorio para el lote muestras silvestres evaluada con marcadores SNP, se hizo utilizando un  $K = 8$ , esto considerando los seis puntos de muestreo (Figura 4) más dos componentes extras.

En la figura 20, se resumen los resultados obtenidos considerando cada uno de los ocho componentes genéticos, donde es clara la agrupación de 14 individuos que presentan más del 90% de similitud en su genoma (componente amarillo).

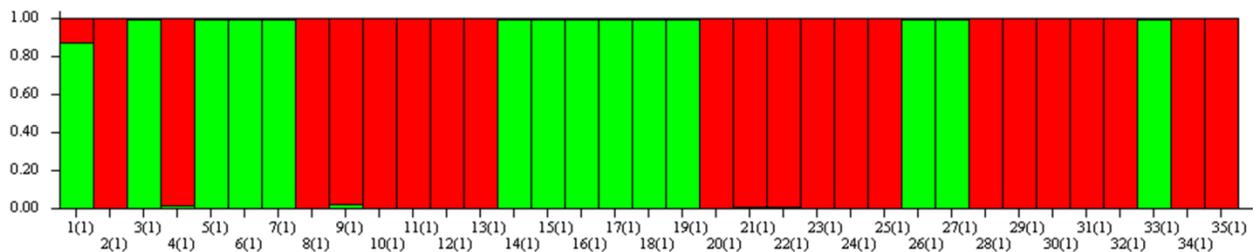


**Figura 20.** Estructura genética de un lote de muestras silvestres de camarón blanco evaluada con ocho componentes genéticos (valor de  $K$  asignado) obtenido a partir de marcadores SNP.

En concordancia con el análisis con marcadores SSR, a partir de los resultados obtenidos de marcadores SNP del programa Structure Harvester, se determinó que las muestras silvestres pertenecen a dos componentes genéticos (Figura 21). Sin embargo, la agrupación obtenida con marcadores SNP resulta diferente a la obtenida con marcadores SSR. En el componente 1 (color verde) se encuentran agrupados 14 individuos y en el componente 2 (color rojo) se encuentran 21 (Figura 22), en el Anexo IV (Figura 29 y Tabla 14) se describe a que componente (verde o rojo) pertenece cada individuo evaluado.

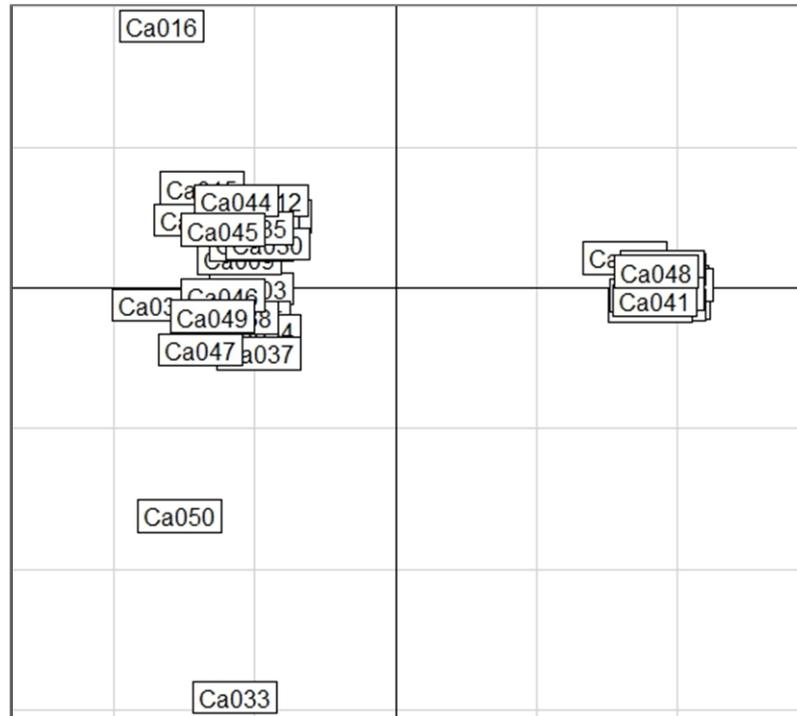


**Figura 21.** Estimación del número de componentes utilizando el logaritmo de la probabilidad media (LnP[D]) derivado de  $\Delta k$  para k de 1 a 8, para el análisis con 104 marcadores moleculares SNP en muestras de procedencia silvestre.



**Figura 22.** Estructura genética de muestras silvestres de camarón blanco evaluada con dos componentes genéticos (valor de K obtenido del Delta K y el valor promedio de K) obtenido a partir de marcadores SNP.

La agrupación resultante del análisis de estructura es similar a la reflejada en el ADCP realizado a las muestras silvestres, donde los mismos individuos son agrupados en dos componentes principales (Figura 23), asimismo la varianza explicada por estos componentes corresponde al 68.5 % (Tabla 16, Anexo V).

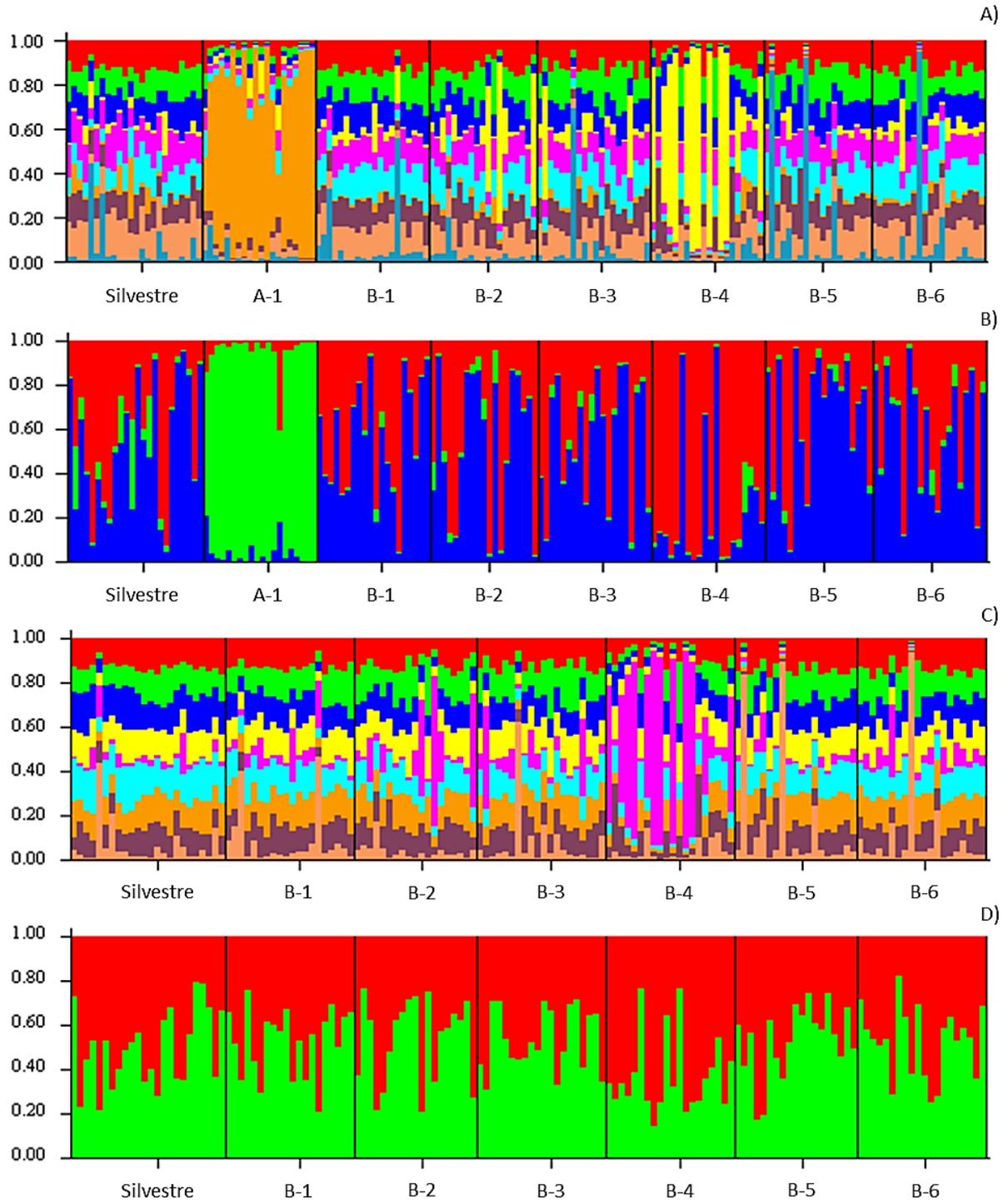


**Figura 23.** Plano cartesiano del análisis discriminante de componentes principales para las muestras silvestres mexicana analizada con 104 marcadores SNP. El eje X, indica el componente principal 1, el eje Y indica el componente principal 2.

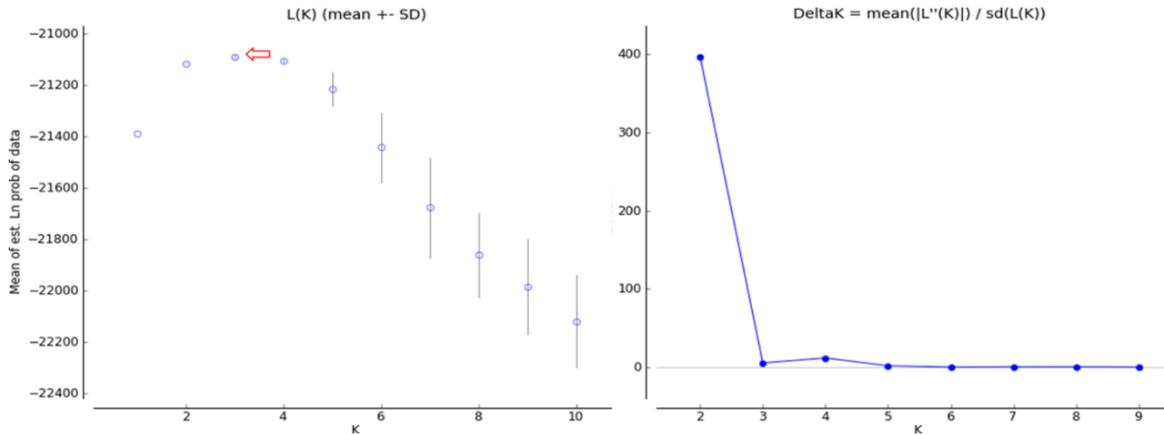
### 3.3.3. Estructura y diferencia genética líneas de cultivo: marcadores SNP

Para determinar la estructura genética en líneas de cultivo, se realizó un primer análisis exploratorio del número más probable de componentes genéticos  $K = 10$ , esto considerando el lote de muestras silvestres y las siete líneas de cultivo y agregando dos componentes extras.

Los resultados obtenidos a partir del análisis con diez, posibles componentes (Figura 24, A) mostró un agrupamiento de las muestras silvestres con cinco de las seis líneas de la empresa B (B-1, B-2, B-3, B-5 y B-6) y se pudo identificar que la línea A-1 muestra patrones diferentes del resto de las líneas de cultivo analizadas. Lo que coincide con los resultados de la prueba de Evanno (Figura 25), donde se encuentran tres componentes genéticos (Figura 24, B). Debido a la gran diferencia observada en la línea A-1, esta fue eliminada en un posterior análisis donde se usó  $K = 9$  (Figura 24, C), observándose que el lote de muestras y todas las líneas se agrupan en dos componentes, el primer componente está conformado por el lote de muestras silvestres y las líneas B-1, B-2, B-3, B-5, B-6, mientras que en el segundo componente sólo se encuentra la línea B-4 (Figura 24, D).

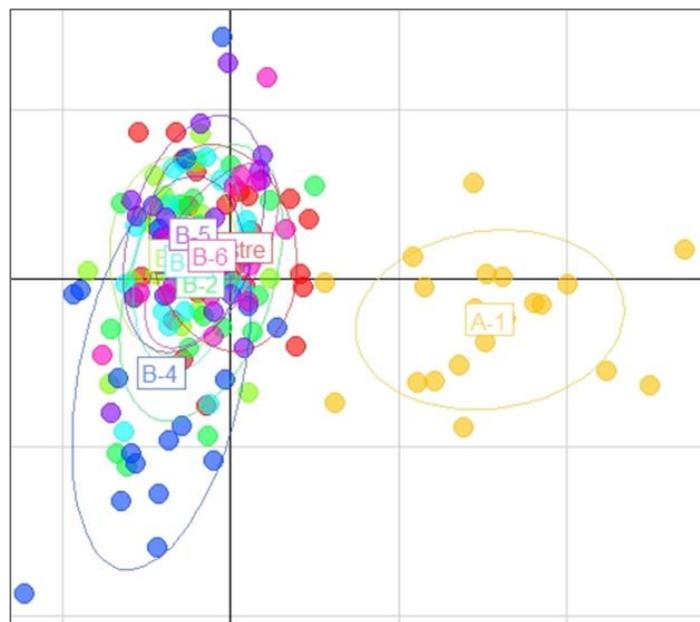


**Figura 24.** Estructura genética de un lote de muestras silvestres y siete líneas de cultivo de camarón blanco, evaluada con marcadores SNP. A) Análisis de todas las líneas utilizando diez componentes genéticos (valor de K asignado); B) Análisis con todas las líneas con tres componentes genéticos  $K = 3$  (K asignado a partir de los resultados con prueba de Evanno). C) Análisis con nueve componentes genéticos, excluyendo la línea A-1 (valor de K asignado); D) Análisis con las líneas excluyendo a la línea A-1 con dos componentes genéticos  $K = 2$  (K asignado a partir de los resultados con la prueba de Evanno). Cada color indica un componente genético diferente.



**Figura 25.** Estimación del número de componentes utilizando  $\text{LnP}(D)$  derivado de  $\Delta K$  para  $K$  de 1 a 10, para el análisis con 136 SNP en un lote de muestras silvestres y siete líneas de cultivo.

Con respecto al ADCP realizado para el lote de muestras silvestres y todas las líneas de cultivo ( $n = 7$ ), se mantiene el mismo patrón con respecto a la línea A-1, en donde ésta se separa y muestra un patrón disperso del resto de las líneas de cultivo quienes se agrupan claramente con las muestras silvestres (Figura 26). Asimismo, en este análisis la línea B-4 aunque se agrupa con las líneas de la empresa B y a las muestras silvestres de camarón blanco, son las muestras de cultivo que mayor dispersión presentan. El porcentaje de variación explicada utilizando los dos principales componentes corresponde al 18.8% del total (Tabla 17, Anexo V).



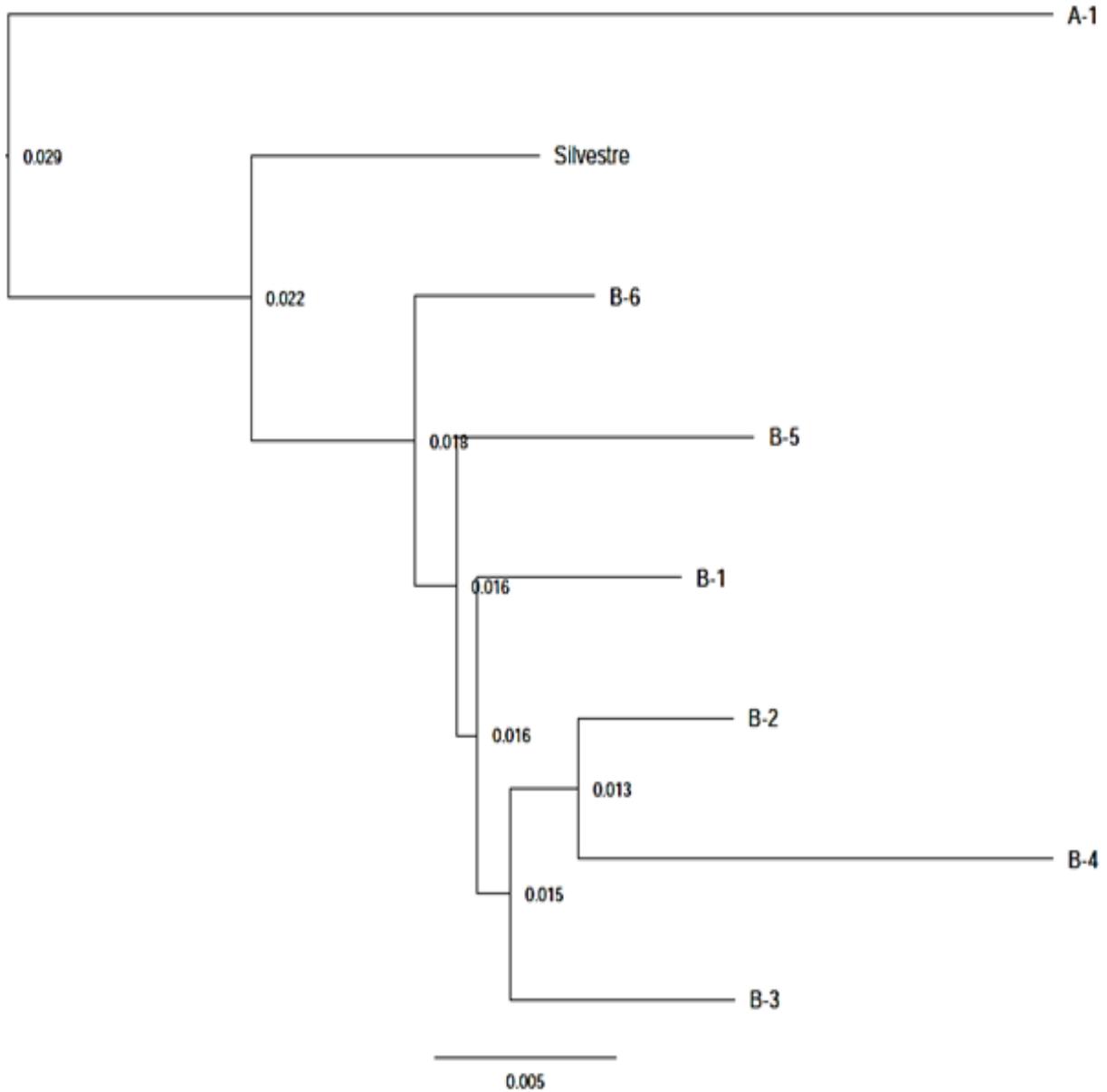
**Figura 26.** Plano cartesiano del análisis discriminante de componentes principales por individuo y por líneas. Elipses indican agrupamiento de individuos en el lote de muestras silvestres y las siete líneas de cultivo. El eje X, indica el componente principal 1, el eje Y indica el componente principal 2.

De acuerdo a los valores de obtenidos de coeficiente de fijación ( $F_{ST}$ ) pareados, se indican diferencias genéticas entre la línea A-1 con respecto a todas las líneas de la empresa B y a las muestras silvestres (Tabla 9). Además, el valor de  $F_{ST}$  entre los individuos silvestre y la línea B-4 ( $F_{ST} = 0.037$ ) resultó ser significativamente diferente. Asimismo, al comparar entre las seis líneas pertenecientes a la empresa B se muestran diferencias genéticas entre las líneas B-4 y B-5 con un valor de  $F_{ST}$  de 0.021 ( $p < 0.000061$ ) (Tabla 9).

**Tabla 9.** Matriz de comparación entre los valores  $F_{ST}$  de un lote de muestras silvestre y siete líneas de cultivo de camarón blanco. Valores resaltados con rojo son estadísticamente significativos comparados con un valor de significancia aplicando la corrección de Dunn Šidák ( $p < 0.000061$ ).

	Silvestre	A-1	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	B-6
Silvestre	-							
A-1	<b>0.070</b>	-						
B-1	0.015	<b>0.075</b>	-					
B-2	0.014	<b>0.060</b>	-0.001	-				
B-3	0.010	<b>0.073</b>	0.001	-0.003	-			
B-4	<b>0.037</b>	<b>0.084</b>	0.008	0.006	0.004	-		
B-5	0.012	<b>0.070</b>	-0.001	0.002	0.007	<b>0.021</b>	-	
B-6	0.013	<b>0.056</b>	-0.002	-0.003	0.003	0.013	0.001	-

Por otra parte, los resultados del análisis de distancias genéticas de Nei (1972), coincide con la información obtenida a partir del análisis de agrupamiento,  $F_{ST}$  pareado y el ADCP, el cual separa con mayor distancia genética a la línea A-1 del clado formado por el resto de las líneas. Además, separa la línea B-4 de las muestras silvestres y el grupo formado por el resto de las líneas de la empresa B (B-5, [B-1, B-6] y [B-2, B-3]) (Figura 27).



**Figura 27.** Distancias genéticas de Nei (1972), de un lote de muestras silvestres y siete líneas de cultivo de camarón blanco evaluada con 136 marcadores SNP.

La estructura genética de las líneas de cultivo se evaluó también mediante un AMOVA en cuatro niveles jerárquicos utilizando el  $F_{ST}$  (Tabla 10). La variación más alta fue detectada entre individuos (96.1 %), seguido por la variación entre grupos (4.02 %) y la variación entre líneas dentro de los grupos (0.43 %) y la variación más baja se presentó entre individuos dentro de las líneas (-0.57). Asimismo, el único valor que fue estadísticamente significativo fue la variación entre poblaciones dentro de los grupos (Tabla 10).

**Tabla 10.** Análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) de siete líneas de cultivo y un lote de muestras silvestres de *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Grados de libertad (g. l) y porcentaje de la variación molecular (% variación). Se explica por el nivel jerárquico. Significancia estadística ( $p < 0.05$ ). El número de grupos se estableció por Structure, K =3. Grupo 1: A-1, Grupo 2: Silvestres, B-1, B-2, B-3, B-5, B-6 y Grupo 3: B-4.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	% de variación.	F <sub>ST</sub>	P
Entre grupos	2	107.477	4.020	0.040	ns
Entre líneas dentro de los grupos	5	76.006	0.430	0.004	*
Entre los individuos dentro de las líneas	154	1988.236	-0.570	-0.006	ns
Entre individuos	162	2116.500	96.110	0.039	ns
Total	323	4288.219			

## Capítulo 4. Discusión

---

### 4.1. Generalidades de los microsatélites

#### 4.1.1. Alelos nulos

Todos los loci evaluados en el presente estudio fueron desarrollados específicamente para camarón blanco (*P. L. vannamei*) (Cruz *et al.*, 2002; Meehan *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2005). Sin embargo, de doce marcadores SSR solamente se pudieron estandarizar seis (50% de éxito), debido principalmente a la presencia de bandas inespecíficas relacionadas quizás con la complejidad de los motivos de repetición de estos loci, a la presencia de motivos dinucleótidos o posiblemente a las condiciones de amplificación *in vitro* de estas regiones (Olejniczak y Krzyzosiak, 2006). Por otra parte, en todas las muestras silvestres se obtuvo una amplificación exitosa en seis loci SSR seleccionados, con una frecuencia promedio de alelos nulos baja ( $7.62 \pm 3.04\%$ ) que no tendrían efectos sobre las estimaciones de diversidad y diferenciación poblacional como sugieren estudios de simulaciones con frecuencias de alelos nulos entre 5 y 8% (Chapuis y Estoup, 2007). Sin embargo, del total de muestras de cultivo (150 camarones) solamente se pudieron obtener productos de 46 (31% de éxito), por lo que no fue posible determinar la diversidad ni diferenciación de las líneas de cultivo con base en estos seis loci SSR. Este resultado pudiera ser atribuible a una alta presencia de alelos nulos en organismos provenientes de cultivo como resultado indirecto de un proceso de selección artificial de fenotipos de interés durante la domesticación de esta especie. Como se observa en otras especies de gran importancia agroeconómica sujetas a domesticación (Asano *et al.*, 2011). O bien, como parte de una selección natural en respuesta a la presencia de patógenos, como se ha observado en humanos, donde el locus Duffy, en el cual un alelo nulo confiere resistencia a la malaria (*Plasmodium vivax*, malaria), este alelo nulo está fijado en varias poblaciones expuestas a la malaria, pero es ausente en otros lugares (Barrett y Schluter, 2008). Dado que es conocido que algunas de las líneas de camarones resistentes a ciertos virus han sido seleccionadas a partir de organismos o familias sobrevivientes a los eventos de mortalidades causados por diferentes patógenos (Doyle y Moss, 2006; Moss *et al.*, 2007).

Los alelos nulos son generados por mutaciones en la región de hibridación de los oligonucleótidos con la secuencia de DNA, generando una reducción o pérdida en la amplificación del producto (Callen *et al.*, 1993). Asimismo, se ha reportado que mutaciones en una sola base, generalmente cuando es la última base del oligonucleótido, es suficiente para que no haya amplificación del fragmento de interés (Holm *et*

*al.*, 2001). Estas mutaciones pueden ser generadas por inserciones o deleciones, siendo más comunes las deleciones. Por otra parte, la presencia de alelos nulos en una población puede afectar directamente el porcentaje de heterocigotos observados, esto debido, a que la presencia de un alelo nulo en uno de los dos alelos puede interpretarse como un individuo homocigoto (Lehmann *et al.*, 1996).

La presencia de alelos nulos en el estudio de poblaciones utilizando marcadores microsatélites ha sido ampliamente reportada, tan solo para humanos se reporta más del 30 % de alelos nulos en estudios sobre genotipificación del cromosoma 16 en familias (Callen *et al.*, 1993). Por otra parte, en un estudio de herencia de 12 microsatélites en *Oncorhynchus mykiss*, se identificó la presencia de alelos nulos en un 16 % en promedio (Ardren *et al.*, 1999). Asimismo, en especies de peneidos como el camarón tigre (*Penaeus monodon*) se reporta para un análisis de estructura poblacional con diez marcadores SSR, la frecuencia de alelos nulos en un 5 % (Mahbub y Snæbjörn, 2016). Por otra parte, en la misma especie Zhu y colaboradores (2017) en un análisis de asignación parental con catorce marcadores SSR detectan el 4.8 % de frecuencia de alelos nulos en individuos de cultivo. Sin embargo, Chapuis y Estoup (2007) indican que valores menores del 20 % de alelos nulos no afectan los resultados de análisis de diversidad genética y estructura poblacional.

#### **4.1.2. Contenido de información polimórfica**

El valor promedio de información polimórfica ( $PIC = 0.823 \pm 0.104$ ) de los seis microsatélites evaluados en el presente estudio, indican un alto polimorfismo de estos marcadores; de acuerdo a la clasificación de Botstein y colaboradores (1980), al ser los promedios superiores de 0.500 (Anexo VI, Tabla 18). En estudios previos, donde han sido utilizados estos marcadores, se reportó un intervalo de 0.195 a 0.873 al evaluar 93 SSR polimórficos (2-11 alelos) en 26 camarones libres de patógenos específicos (SPF shrimp) procedentes de cultivos en Hawái (Meehan *et al.*, 2003). Asimismo, en otro estudio realizado con individuos cultivados en China procedentes de Centro y Sur América, se registró un intervalo de PIC de 0.590 a 0.952 con siete marcadores SSR (Zhang *et al.*, 2014), estando estos valores dentro de los registrados en el presente estudio (0.646 - 0.929). En este estudio, el valor más bajo de PIC se presentó en el locus CNM-MG512 (0.656) asociado con su bajo número de alelos ( $N_a = 8$ ), el cual registró un valor de 0.667, esto puede estar relacionado con la naturaleza de este marcador que fue desarrollado a partir de una secuencia expresable (Pérez *et al.*, 2005) y considerando que el transcriptoma es más conservado que el genoma (Postolache *et al.*, 2014).

La informatividad de los seis loci SSR estandarizados resultó la adecuada para evaluar la diversidad genética en camarones silvestres. Ya que, para el análisis de variabilidad genética es necesario el uso de marcadores que presenten un alto índice de información polimórfica ( $> 0.50$ ), mientras que cuando se presentan valores de PIC inferiores de 0.25 se debe utilizar un mayor número de marcadores para aumentar la resolución del análisis (Juyó-Rojas, 2012).

#### 4.1.3. Variabilidad de marcadores SSR

La variabilidad genética, en términos del número de alelos ( $N_a$ ), fue mayor en el presente estudio (8-23 alelos) que lo reportado en los estudios donde se desarrollaron estos marcadores (4-12 alelos). Sin embargo, el número de muestras utilizado por estos autores fue menor y el origen de las muestras diferente (Tabla 19, Anexo VII) (Cruz *et al.*, 2002; Meehan *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2005).

Con estos seis marcadores se han realizado estudios de variabilidad genética en lotes de cultivo y silvestres (Cruz *et al.*, 2004; Luvesuto *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014). Con respecto a organismos silvestres Valles-Jimenez y colaboradores (2005) al evaluar cuatro localidades (Sinaloa, Guerrero, Guatemala y Panamá) dentro de la distribución natural de *P. (L.) vannamei* con el SSR Pvan1815, detectaron un número de alelos similar al reportado por el presente estudio (12, 16, 16 y 9 respectivamente comparado con 15 alelos (en este estudio), utilizando un número de muestras mayor (40, 44, 48 y 32 respectivamente). El número de alelos encontrados en una población está influenciado por el número de muestras analizadas (Artiles *et al.*, 2015), su origen (silvestre, cultivo) y el tiempo generacional en cultivo; en general, en organismos mantenidos en cautiverio se ha reportado una pérdida de diversidad alélica (Martínez, 2005).

En estudios relacionados con los loci TUMXLv7.56, TUMXLv8.220 y TUMXLv8.256, Zhang y colaboradores (2014) evaluaron siete líneas ( $n = 192$ ) de cultivo introducidas a China procedentes de Centro y Sur América, en donde se registró un menor número de alelos (17.6, 10.9 y 5.3 alelos promedio/locus, respectivamente) en comparación a los reportados en este estudio (23, 20 y 11, respectivamente). En ambos trabajos el TUMXLv7.56 fue el más informativo. Asimismo, en el trabajo de Meehan y colaboradores (2003), donde se utilizaron los loci TUMXLv5.35, TMXLv7.56, TUMXLv8.220 y TUMXLv8.256 para evaluar a 26 camarones de cultivo en Hawái, el número de alelos fue menor (5, 4, 11 y 6, respectivamente) que en este estudio (8, 23, 20 y 11, respectivamente). Sin embargo, en este último estudio la heterocigosidad observada con éstos microsatélites fue mayor que lo reportado aquí, esto

podría estar asociado a la presencia de los alelos nulos detectados para esta población, ya que la presencia de estos puede indicar falsamente una mayor proporción de individuos homocigotos (Lehmann *et al.*, 1996) o bien al buen manejo reproductivo de los organismos en cultivo, dado que si se conocen los genotipos de los padres es posible dirigir las cruzas y aumentar el número de organismos heterocigotos aún con baja diversidad alélica en ellos (Lutz, 2001; Cruz *et al.*, 2004; Luvesuto *et al.*, 2007; Vela-Avitúa *et al.*, 2013).

Por otra parte, dado que el loci CNM-MG512 es parte de una secuencia codificante para un péptido antimicrobiano (Penaeidin-2a precursor; P81057; Blast hit score: 99) relacionado con la respuesta inmune en *Penaeus (L.) vannamei* (Destoumieux *et al.*, 2000; O'Leary y Gross, 2006) se encontró que los parámetros genéticos como el Na, Ra y la Ho presentaron valores bajos (8, 7.35 y 0.229, respectivamente); mientras que el  $F_{IS}$  fue alto (0.684). No obstante, el número de alelos fue menor (6, rango 210-265 pb) y la Ho mayor (0.880) que lo reportado previamente por Pérez y colaboradores (2005) en una muestra de 16 organismos de procedencia silvestre de Ecuador (Tabla 19, Anexo VII). Mientras que, la He fueron similares (0.707 y 0.710, respectivamente) con un valor de  $F_{IS}$  calculado de -0.239. Aun así, en nuestro estudio 3 alelos (245, 249 y 253) representaron el 0.885 de la frecuencia alélica, y los 5 alelos restantes solo el 0.114, aun cuando el tamaño de muestras fue mayor en el presente estudio ( $n=35$ ). Menos alelos y una diversidad alélica más baja en microsatélites derivados del transcriptoma podrían estar indicando una alta presión de selección en estas regiones, que limita la cantidad de mutaciones, pudiendo estar las adaptaciones poblacionales condicionadas a la selección de la variación genética pre existente (Barrett y Schluter, 2008).

El coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) promedio en este estudio fue de 0.629 ( $\pm 0.112$ ) para seis loci evaluados, en comparación con lo registrado por diversos autores, en donde para el SSR Pvan1815 se indican valores desde cero hasta 0.241 en tres poblaciones de cultivo evaluadas con este marcador (Cruz *et al.*, 2004); Zhang y colaboradores (2014) reportan valores de  $F_{IS}$  menores a 0.01 en el SSR TUMXLv7.56, sin embargo para los SSR TUMXLv8.220 y TUMXLv8.246 se reportó un intervalo desde 0.03 hasta de 1.00 en siete poblaciones de cultivo de camarón blanco.

En términos generales, con el uso de estos seis marcadores SSR se reportó para el presente estudio mayor variabilidad genética en comparación con otros estudios donde han sido utilizados estos mismos marcadores para evaluar variabilidad genética tanto en muestras silvestres como en muestras de camarón de cultivo (Cruz *et al.*, 2002; Meehan *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2005; Valles-Jiménez *et al.*, 2005; Luvesuto *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014).

## 4.2. Diversidad genética

### 4.2.1. Lote de muestras silvestres: marcadores microsatélites (SSR) y SNP

El número de alelos registrados para este estudio fue de 14.17 ( $\pm$  6.3) alelos/locus en promedio para los seis loci SSR evaluados, siendo alto en comparación con un estudio realizado por Valles-Jiménez y colaboradores (2005), donde evalúan una posible estructuración en la población silvestre mexicana, utilizando muestras recolectadas en los estados de Sinaloa y Guerrero, donde se registró para cada localidad 8.6 y 7.6 alelos/locus en promedio con cinco SSR, respectivamente. Asimismo, en otro estudio más reciente realizado por Vela-Avitúa y colaboradores (2013), donde evaluaron una muestra poblacional de 55 individuos recolectados en 12 localidades de la costa de Sinaloa, se detectaron 10.2 ( $\pm$  0.86) alelos/locus en promedio con un set de 26 loci SSR evaluados, diferentes a los usados en este estudio. En cambio, el número de alelos en el caso de los marcadores SNP utilizados en este estudio no son comparables, estos fueron 1.89 en promedio por locus, esto es similar a lo reportado por Perez y Max-Aguilar (2016), donde utilizaron marcadores SNP para determinar el parentesco en camarón blanco de cultivo (192 individuos y 76 SNP), en dicho estudio se reportaron 1.97 alelos por locus en promedio, estos valores se deben principalmente a la naturaleza de estos marcadores, los cuales en su mayoría son bialélicos (Edwards *et al.*, 2005). En el análisis estadístico entre el número de alelos obtenidos a partir de marcadores SSR y marcadores SNP se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) (Figura 32, Anexo IX).

En la población silvestre la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) fue ligeramente baja, ya que el promedio de la proporción de individuos heterocigotos fue de 0.326 ( $\pm$  0.121) con marcadores SSR en comparación con lo reportado por Vela-Avitúa *et al.* (2013) donde obtuvieron un valor de 0.440 ( $\pm$  0.05) utilizando 26 loci SSR, pero fue mayor a lo registrado por Valles-Jiménez y colaboradores en el 2005 (0.291) con 5 loci SSR, estos valores fueron para la región de Sinaloa. Asimismo, con marcadores SNP se registró un valor de  $H_o$  de 0.185 en promedio, sin ser estadísticamente diferente entre ambos para esta población (Figura 32, Anexo IX), sin embargo, numéricamente se obtuvo menor proporción de heterocigotos con marcadores SNP que con SSR, esto puede estar influenciado por el número de regiones del genoma analizadas (Liu, 2007).

Con respecto al ajuste del Equilibrio de Hardy-Weinberg con los seis loci SSR utilizados en el presente trabajo, se encontró a todos los loci fuera de equilibrio, siendo similar esto a lo reportado por diversos autores con poblaciones silvestres para esta y otras especies de camarón (Borrel-Pichs, 2002; Casalla-Daza,

2003; Valles-Jimenez *et al.*, 2005; Vela-Avitúa *et al.*, 2013). Lo cual, puede ser explicado principalmente a un déficit de heterocigotos y a la presencia de alelos nulos en las poblaciones analizadas, los cuales (alelos nulos) son causados por mutaciones en la región de hibridación de los oligonucleótidos con la secuencia molde o por errores causados por las técnicas de amplificación (PCR), asimismo, este supuesto indica que las poblaciones estarán en equilibrio cuando las poblaciones tengan reproducción aleatoria, no haya presión por selección natural y no se presente migración entre poblaciones (Beaumont *et al.*, 2010). No obstante, en comparación con los resultados obtenidos con SNP, se registra que todos los 104 loci SNP evaluados se ajustan al EHW (Tabla 8). Las diferencias entre la información que ambos marcadores (SSR y SNP) brindan está asociado al número de sitios evaluados del genoma y a que con marcadores SSR la presencia de alelos nulos o errores de genotipificación son más comunes en comparación con marcadores SNP (Emanuelli *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013).

El valor del  $F_{IS}$  de  $0.629 (\pm 0.112)$  obtenido con SSR para el lote de muestras silvestres indica un alto grado de endogamia. Este valor fue diferente estadísticamente del  $F_{IS}$  obtenido con SNP ( $0.326 \pm 0.271$ ) para el mismo lote de muestras (Figura 34, Anexo IX). Este coeficiente indica la probabilidad de que los individuos serán homocigotos por descendencia (Beaumont *et al.*, 2010), no obstante, los valores obtenidos se encuentran dentro del intervalo reportado por Valles-Jiménez *et al.* (2005) para los estados de Sinaloa y Guerrero ( $0.582$  y  $0.392$  respectivamente) con cinco loci SSR, a diferencia Vela-Avitúa *et al.* en años posteriores (2013) donde reportaron para Sinaloa valores de  $F_{IS}$  de  $0.36 (\pm 0.06)$  utilizando 26 loci SSR. Por otro lado, los coeficientes altos de endogamia obtenidos a partir de los seis marcadores microsatélites utilizados en el presente estudio pueden estar asociados a un efecto Wahlund, el cual indica que una población que se encuentre subdividida puede presentar bajos niveles de heterocigosidad y esto aumentar el  $F_{IS}$  (Hartl y Clark, 1997). Sin embargo, esto también puede estar asociado a la frecuencia de alelos nulos no identificados en la población (Callen *et al.*, 1993; Lehmann *et al.*, 1996), o al exceso de homocigotos en el lote de muestras, lo cual reflejará como resultado bajas proporciones de heterocigosidad observada y a su vez será indicativo de altos índices de endogamia en una determinada población (Mendoza-Cano *et al.*, 2013).

La diferencia entre la información que se obtiene a partir de marcadores microsatélites y marcadores SNP, radica principalmente en las características de ambos marcadores, aunque estos comparten características similares como codominancia, alto polimorfismo, presencia en secuencias codificantes y no codificantes (Vignal *et al.*, 2002; Liu y Cordes, 2004; Beaumont *et al.*, 2010); han sido reportado con mayor resolución los SNP, los cuales permiten determinar con mayor precisión la variación y diferenciación

genética a escalas espaciales finas, así como proporcionar información más significativa acerca del nivel de flujo de genes entre diferentes poblaciones (Latch *et al.*, 2011; Defaveri *et al.*, 2013).

En este estudio se utilizaron seis marcadores microsatélites, de los cuales solo uno (CNM-MG512) está relacionado con una región codificante, a diferencia de los 104 SNP utilizados, los cuales fueron desarrollados a partir de secuencias codificantes (EST) previamente reportadas en el banco de genes (NCBI). Se ha reportado que la ubicación en el genoma de los marcadores utilizados para evaluar diversidad genética influye en la información que estos generan. Defaveri y colaboradores (2013) evaluaron la diversidad genética en el pez *Gasterosteus aculeatus*, utilizando marcadores SSR y SNP que se encontraban en regiones codificantes y no codificantes. Determinaron que con marcadores SSR la información varía dependiendo del origen de estos, a diferencia que con marcadores SNP, donde la información no varía con respecto al origen. Asimismo, Kostamo *et al.* (2012) indica que el uso de marcadores SSR en regiones codificantes generalmente determinan baja variabilidad genética global, selección natural más fuerte y frecuente, así como mayor divergencia entre poblaciones, a diferencia de estudios donde son utilizados marcadores neutrales.

En comparación, la cantidad de marcadores utilizados entre SSR y SNP es significativa, ya que en este estudio fueron seis SSR y 104 SNP, algunos autores indican que para hacer comparable la información entre ambos marcadores en estudios de diversidad genética es necesario que por cada microsatélite deben utilizarse entre 1.7 y 5.5 SNP (Thalamuthu *et al.*, 2005; Gärke *et al.*, 2012). En estudios con ganado Schopen y colaboradores (2008) determinaron que por cada set de seis marcadores microsatélites deben ser utilizados 1.3 SNP y para un set de 12 SSR deben ser 2.3 SNP. Sin embargo, estos autores mencionan que estas proporciones varían entre especies; en este estudio se utilizó una proporción de 1 SSR: 17.33 SNP.

Perez y Max-Aguilar (2016) publicaron el primer artículo haciendo una comparación entre marcadores microsatélites y SNP para evaluar rastreabilidad del pedigrí en camarón blanco (*P. L. vannamei*). En este estudio utilizaron una proporción de 1 SSR: 7.6 SNP, y se concluyó que con marcadores SSR el porcentaje de asignación parental solamente alcanza un 83.3 % de certeza y con marcadores SNP la asignación parental correcta alcanza un 97.7%. Entre otro de los estudios realizado en Peneidos, se encuentra el realizado por Sellars y colaboradores (2014) en donde hicieron una comparación entre marcadores SSR y SNP para asignación de pedigrí en el camarón tigre (*Penaeus monodon*) en este trabajo se determina con microsatélites un porcentaje de asignación del 81.7 % a diferencia de con marcadores SNP, donde se

asignó un porcentaje del 99.7% de asignaciones correctas, en este estudio se utilizó una proporción de 1 SSR: 9.38 SNP.

El lote de muestras evaluado en el presente estudio presentó índices de variabilidad genética moderada, esto en términos heterocigosidad observada y coeficiente de endogamia (0.187 y 0.291 respectivamente) con marcadores SNP, otros autores han reportado para poblaciones silvestres mayor heterocigosidad observada (0.291) en comparación con este estudio, sin embargo, también reportan coeficientes de endogamia más altos, de hasta 0.582 en la región de Sinaloa (Valles-Jiménez *et al.*, 2005). El presente estudio es la primera evaluación reportada para muestras de camarón blanco silvestre utilizando marcadores SNP, en donde los resultados obtenidos muestran que esta técnica es adecuada para su uso en poblaciones silvestres de esta especie.

#### **4.2.2. Lote de muestras silvestres y siete líneas de cultivo: marcadores SNP**

El intervalo en el número de alelos y la riqueza alélica (1.5 – 2) encontrado en este estudio es similar a lo reportado por Perez y Max-Aguilar (2016) para *Litopenaeus vannamei* en condiciones de cultivo, así como para *Penaeus monodon* en condiciones de cultivo (Sellars *et al.*, 2014), esto debido a la naturaleza bialélica de los marcadores SNP (Edwards *et al.*, 2005).

La heterocigosidad observada de todas las líneas de cultivo evaluadas tuvieron un intervalo de 0.29 a 0.34, este valor es similar a lo reportado por Perez y Max-Aguilar (2016) donde indican valores de  $H_o$  de 0.340 ( $\pm 0.140$ ). Asimismo, en otros estudios realizados para esta misma especie en condiciones de cultivo, pero con marcadores SSR se han reportados valores superiores a los de este estudio, por ejemplo, Vela-Avitúa y colaboradores (2013) reportó una  $H_o$  de 0.440 utilizando 26 loci SSR. Por otra parte, Rezaee *et al.* (2016) evalúan la variabilidad genética en tres líneas en cultivo de camarón blanco, donde determinan valores de  $H_o$  de 0.479, 0.458 y 0.450 obtenido a partir de cuatro loci SSR. Asimismo, Zhang y colaboradores (2014) evaluaron poblaciones en cultivo de esta especie, donde se determinaron valores de heterocigosidad observada de 0.526 y 0.754, esto utilizando seis loci SSR. Sin embargo, es importante resaltar que en estos tres estudios todas las poblaciones analizadas se encontraron fuera del EHW, en contraste con este estudio y con el realizado por Perez y Max-Aguilar (2016) donde todos los marcadores SNP analizados estuvieron en EHW, lo cual radica en la cantidad de sitios del genoma evaluados con SNP, los cuales permiten mayor resolución en el análisis.

Con respecto al coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) detectado para cada una de las líneas y la población silvestre con marcadores SNP, se determinó a la población silvestre en ligera endogamia, esto con un valor de  $F_{IS}$  de 0.129, siendo este valor más bajo que lo reportado previamente para poblaciones silvestres mexicanas, Valles-Jiménez y colaboradores (2005), reportan valores de  $F_{IS} = 0.582$  para la región de Sinaloa, por otra parte Vela-Avitúa y colaboradores (2013) reportaron un coeficiente de endogamia de 0.388. Asimismo, en relación al  $F_{IS}$  obtenido de las siete líneas de cultivo, estos valores son bajos en comparación a lo registrado por Luvesuto y colaboradores (Luvesuto *et al.*, 2007) donde evaluaron con cuatro marcadores la diversidad genética de tres lotes de reproductores de cultivo de camarón blanco, registrando valores de  $F_{IS}$  de 0.583, 0.319 y 0.355. En el 2010, Souza de Lima y colaboradores con cinco loci SSR evalúan dos laboratorios de producción de nauplios de camarón blanco, estos autores registran valores de  $F_{IS}$  de 0.380 y 0.248. Por otra parte, Rezaee y colaboradores (2016) evaluando tres laboratorios de producción en Irán, detectan  $F_{IS}$  de 0.397, 0.421 y 0.430, esto con cinco loci SSR, todos estos autores coinciden los valores de endogamia altos. Sin embargo, Perez y Max-Aguilar(2016) con un panel de 76 SNP utilizados en un laboratorio de producción de nauplio de camarón blanco identifica un coeficiente de endogamia igual a cero (0) indicando esto que las líneas evaluadas se encuentran en panmixia. En este estudio y con 104 marcadores SNP, las únicas líneas que encontraron en esta condición (panmixia) fueron de la empresa B (líneas B-2 y B-5), y el resto se encontraron en ligera endogamia, a diferencia de la línea de la empresa A, la cual registró en coeficiente de endogamia que la ubica en ligera exogamia.

En términos generales, del lote de muestras silvestres y las siete líneas de cultivo, la línea A-1 fue la que presentó mayor diversidad genética en términos de heterocigosidad observada, ajuste al Equilibrio de Hardy Weinberg y coeficiente de endogamia, esto se contrasta con lo reportado por diferentes autores (Cruz *et al.*, 2004; Luvesuto *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014; Rezaee *et al.*, 2016), donde señalan que líneas de organismos en cautiverio presentan menores índices de diversidad en comparación con muestras de origen silvestre; estos resultados pueden estar asociados al origen de la línea A-1.

La línea de la empresa A, es procedente de la empresa Konabay Marine Resources (<https://www.konabaymarine.com/>), ubicada en Hawái. Esta empresa tiene un programa de mejoramiento genético, el cual ha mantenido una presión por selección artificial sobre estas líneas por aproximadamente 21 años. Por ello, se esperaría que el índice de endogamia de esta empresa fuese alto. Sin embargo, esta línea se registró como ligeramente exogámica. Ha sido reportado por algunos autores que es posible mejorar la diversidad genética en individuos en cultivo siguiendo el pedigrí de estos y generando programas de mejoramiento genético óptimos, detectando que el coeficiente de endogamia

puede disminuir o mantenerse de generación en generación (Lutz, 2001; Cruz *et al.*, 2004; Luvesuto *et al.*, 2007; Vela-Avitúa *et al.*, 2013).

### **4.3. Estructura y diferenciación genética**

#### **4.3.1. Lote de muestras silvestres: marcadores microsatélites (SSR) y SNP**

La eficiencia de los dos marcadores fue comprobada al analizar la población silvestre, ya que ambos marcadores detectan la estructuración dentro de esta población, esta se divide en dos componentes genéticos de acuerdo a los resultados obtenidos a partir del análisis de agrupación (Figura 19 con SSR y Figura 23 con SNP). Sin embargo, el ADCP no coincide entre ambos marcadores, ya que con SSR (Figura 19) no es posible detectar estructuración en la población y con marcadores SNP si se define la estructuración de la población silvestre en dos grupos (Figura 23). No obstante, en este análisis ambos marcadores son representados con diferente porcentaje de variación explicada con los dos principales componentes, con SSR se explica un 10.64 % de la variación total y con SNP un 68.46 %. Esto se asocia a la naturaleza de cada uno de los marcadores y al tipo de información que estos pueden proporcionar, por ejemplo, en marcadores microsatélites el número posible de alelos es variable (alto), a diferencia de los marcadores SNP, los cuales en su mayoría han sido reportado como bialélicos, lo que indica que solo se pueden encontrar dos alelos, por este motivo la heterocigosidad observada solo puede tener una proporción máxima de 0.5 (Edwards *et al.*, 2005; Defaveri *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017).

Con respecto a la estructuración de las poblaciones mexicanas de camarón blanco son pocos los estudios realizados, dentro de estos se encuentra dos realizados por Valles-Jiménez y colaboradores (2005 y 2006) donde utilizan cuatro localidades dentro de la distribución natural de esta especie (Sinaloa, Guerrero, Guatemala y Panamá). En el estudio realizado en 2005, evalúan con cinco loci SSR la estructuración de dichas localidades y en el estudio del 2006, realiza el mismo análisis, pero con marcadores RFLP con DNA de la región control mitocondrial. En ambos estudios se determinó que dentro de la distribución de *P. (L.) vannamei* se presenta una diferenciación genética, al menos entre las localidades analizadas; esto refuerza lo encontrado en este estudio, ya que es posible la estructuración de la población silvestre dentro de la región de Sonora, posiblemente debido a la presencia de barreras físicas u oceanográficas que no permiten

que haya flujo genético entre grupos de individuos de esta misma especie y lo cual generé una estructuración dentro estas poblaciones.

#### **4.3.2. Lote de muestras silvestres y líneas de cultivo: marcadores SNP**

Todos los análisis realizados para determinar estructuración (análisis de agrupamiento por similitud de frecuencias alélicas,  $F_{ST}$  pareado, análisis de componentes principales y distancias genéticas de Nei) indican que las líneas de cultivo y las muestras silvestres se dividen en tres grupos. De los cuales se agrupa a las líneas B-1, B-2, B-3, B.5, B-6 y la población silvestre como uno, a la línea B-4 como un segundo grupo y por último la línea A-1. Debido a que se detectaron diferencias genéticas de la línea A-1 con respecto a todas las muestras restantes, esto puede estar relacionado al origen de estas muestras y al tiempo que llevan sometidas a selección artificial (Apartado 4.2.2).

El  $F_{ST}$  obtenido de las líneas evaluadas y la población silvestre presentó un intervalo de -0.001 hasta 0.084, de acuerdo a este parámetro los valores deben ser siempre positivos, valores cercanos a cero (0) indican similitud entre las poblaciones y valores cercanos a uno (1) indican mayores diferencias entre poblaciones; asimismo, cuando se obtienen valores negativos estos son considerados como cero (0) (Loeza - Quintana, 2011). De acuerdo a la escala de significancia de los valores de  $F_{ST}$  de Hartl y Clark (1997) (Tabla 21, Anexo X), indican a la línea A-1 como moderadamente diferente ( $> 0.15$ ) del resto de las líneas de cultivo y la población silvestre; al igual que la comparación entre la población silvestre y la línea B-4 como moderadamente diferentes entre sí ( $F_{ST}=0.021$ ). Estas diferencias pueden estar asociadas a los procesos de selección dirigida a la que los individuos en programas de selección genética son sometidos (Martínez, 2005; Defaveri *et al.*, 2013). Sin embargo, la significancia de esta escala, puede variar dependiendo de la especie y de sus estrategias de reproducción (Hartl y Clark, 1997).

## Capítulo 5. Conclusiones

---

- 5.1. La diversidad genética en términos de heterocigosidad esperada y observada, número de alelos y coeficiente de endogamia entre marcadores SSR y SNP indican que el lote de muestras silvestres presenta baja diversidad genética.
- 5.2. Los microsatélites TUMXLv5.35, Pvan1815, TUMXLv7.56, TUMXL8.220, TUMXLv8.256 y CNM-MG512 presentan alelos nulos, por lo cual no son adecuados para evaluar diversidad genética en las líneas de cultivo de la empresa A y B.
- 5.3. A partir de los análisis de frecuencias alélicas y ADCP se registró estructuración frágil dentro del lote de muestras silvestres, al ser evaluados con marcadores moleculares SSR y SNP.
- 5.4. El uso de marcadores SNP en análisis de diversidad y estructuración genética, permite obtener resultados con mayor resolución y con mayor certeza que con el uso de marcadores microsatélites.
- 5.5. Los parámetros de diversidad genética (heterocigosidad observada y esperada, número de alelos y coeficiente de endogamia) indican que la línea A-1 de la empresa B con mayor diversidad genética, seguida por las líneas de la empresa B y por último la que presentó menores índices de diversidad genética pero no significativos fue el lote de muestras silvestres.
- 5.6. Con los parámetros de estructuración genética (frecuencias alélicas,  $F_{ST}$ , ADCP, distancias genéticas de Nei y AMOVA) se encontraron diferencias genéticas entre el lote de muestras silvestres, la línea A-1 (empresa A) y la línea B-4 (empresa B), asimismo, la línea A-1 mostró ser genéticamente diferente de todas las líneas de la empresa B.
- 5.7. El bajo índice de endogamia y la alta diversidad genética de las líneas de reproductores indican que ambas empresas realizan un manejo adecuado de individuos en sus programas de crianza selectiva, los cuales están basados en el seguimiento de pedigrí con marcadores genéticos.

## Capítulo 6. Recomendaciones

---

- 6.1. Seleccionar marcadores microsatélites con motivos de repetición trinucleótidos o tetranucleótidos, ya que estos están reportados en la literatura con menor probabilidad de generar bandas inespecíficas, así como seleccionar microsatélites perfectos (con solo un motivo de repetición)
  
- 6.2. Para determinar estructuración en el lote de muestras silvestres de la región de Sonora, es necesario aumentar el número de muestras, así como las regiones de muestreo, esto con el fin de tomar muestras que sean más representativas de la región y permitan determinar diferencias genéticas entre puntos de muestreo.

## Referencias

---

- Ardren, W. R., Borer, S., Thrower, F., Joyce, J. E. y Kapuscinski, A. R. 1999. Inheritance of 12 microsatellite loci in *Oncorhynchus mykiss*. American Genetic Association, 90 (5), 529–536. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jhered/90.5.529>
- Artiles, A., Rodríguez, I., Pérez, A. y Espinosa, G. 2015. Limitada variabilidad genética de la quinta introducción en Cuba de *Litopenaeus vannamei* estimada con el uso de marcadores microsatélites. PhD Proposal, 1, 1–4. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Asano, K., Yamasaki, M., Takuno, S., Miura, K., Katagiri, S., Ito, T. y Matsuoka, M. 2011. Artificial selection for a green revolution gene during japonica rice domestication. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(27), 11034–11039. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019490108>
- Barrett, R. D. H. y Schluter, D. 2008. Adaptation from standing genetic variation. Trends in ecology and evolution, 23(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.09.008>
- Beaumont, A., Boudry, P. y Hoare, K. 2010. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture (1ra. ed.). John Wiley & Sons.
- Bentsen, H. y Olesen, I. 2002. Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates. Aquaculture, 204(3–4), 349–359. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00846-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00846-8)
- Bonami, J., Hasson, K., Mari, J., Poulos, B. y Lightner, D. 1997. Taura syndrome of marine penaeid shrimp : characterization of the viral agent. Journal of General Virology, 78, 313–319.
- Borrel-Pichs, Y. 2002. Loci microsatélites como marcadores genéticos para la mejora del rendimiento en acuicultura de especies marinas. Tesis de doctorado en Ciencias. Universidad de Oviedo.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. y Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32(3), 314–31. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1686077&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R. y Philips, M. 2004. Introduction and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 79.
- Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Phillips, H. A., Richards, R., Mulley, J. C. y Sutherland, G. R. 1993. Incidence and Origin of “ Null ” Alleles in the ( AC ) n Microsatellite Markers. Am. J. Hum. Genet., 52, 922–927.
- Casalla-Daza, R. 2003. Medición de distancias genéticas en poblaciones de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en la costa ecuatoriana. Tesis de maestría en Ciencias. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Chapuis, M. P. y Estoup, A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Molecular Biology and Evolution, 24(3), 621–631. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl191>
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B. y Volckaert, F. A. M. 2006. Microsatellites and their genomic distribution , evolution , function and applications : A review with special reference to fish genetics. Elsevier, 255,

1–29. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.031>

- Ciobanu, D. C., Bastiaansen, J. W. M., Magrin, J., Rocha, J. L., Jiang, D. H., Yu, N. y Mileham, A. J. 2010. A major SNP resource for dissection of phenotypic and genetic variation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Animal Genetics*, 41(1), 39–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01961.x>
- CONAPESCA. 2013. Anuario estadístico de acuacultura y pesca, 2013.
- CONAPESCA. 2014. Anuario estadístico de acuacultura y pesca, 2014.
- CONAPESCA. 2015. Anuario estadístico de acuacultura y pesca, datos preliminares 2015.
- Coombs, J. A., Letcher, B. H. y Nislow, K. H. 2008. Create: A software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. *Molecular Ecology Resources*, 8(3), 578–580. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.02036.x>
- Cruz, P. 2003. Identificación, caracterización y herencia de microsatélites y su aplicación como marcadores moleculares en un programa de mejoramiento de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de doctora en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Cruz, P., Ibarra, A., Mejía-Ruiz, H., Gaffney, P. y Pérez-Enríquez, R. 2004. Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine Biotechnology* (New York, N.Y.), 6(2), 157–64. <https://doi.org/10.1007/s10126-003-0017-5>
- Cruz, P., Mejía-Ruiz, H., Pérez-Enríquez, R. y Ibarra, M. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Molecular Ecology Notes*, 2, 239–241. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278>
- Cuéllar-Anjel, J. 2012. Síndrome de taura. Manual de Pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos, 1–18.
- Cuéllar-Anjel, J. 2013. Síndrome de mortalidad temprana (EMS), enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND). Institute for International Cooperation in Animal Biologics, 1–7.
- Curtis, H., Barnes, N., Schnek, A. y Massarini, A. 2008. *Biología*. (Schnek, A. y Massarini, A., Eds.) (7 ma.). España: Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Defaveri, J., Viitaniemi, H., Leder, E. y Merilä, J. 2013. Characterizing genic and nongenetic molecular markers: Comparison of microsatellites and SNPs. *Molecular Ecology Resources*, 13(3), 377–392. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12071>
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Bulet, P. y Bachère, E. 2000. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cellular and molecular life sciences*, 57(8), 1260–1271. <https://doi.org/10.1007/PL00000764>
- Doyle, R. y Moss, D. 2006. Shrimp Copyright : Inbreeding strategies effective against. *Global Aquaculture Advocate*, (May), 2–4.
- Du, Z., Ciobanu, D. C., Onteru, S. K., Gorbach, D., Mileham, A. J. y Jaramillo, G. 2009. A gene-based SNP linkage map for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Animal Genetics*, 41(3), 286–294. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.02002.x>
- Earl, D. A. y VonHoldt, B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Ecanno method. *Conservation Genetics Resources*, 2(4),

- 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Edwards, D., Forster, J. W., Chagné, D., Batley, J. y Definition, S. N. P. 2005. WHAT ARE SNPs ? (pp. 41–52). Springer.
- Emanuelli, F., Lorenzi, S., Grzeskowiak, L., Catalano, V., Stefanini, M., Troglio, M. y Grando, M. S. 2013. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. *BMC Plant Biology*, 13(1), 39. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-39>
- Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier, L., Laval, G. y Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1(47).
- FAO. 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <https://doi.org/978-92-5-308275-9> ISSN1020-5500
- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Freitas, P., Manoel, P. y Manoel, G. 2005. Assessment of the genetic diversity in five generations of a commercial broodstock line of *Litopenaeus vannamei* shrimp. *Journal of Biotechnology*, 4(12), 1362–1367.
- Galavíz-Silva, L., Molina-Garza, Z. J., Alcocer-González, J. M., Rosales-Encinas, J. L. y Ibarra-Gómez, C. 2004. White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. *Aquaculture*, 242(1–4), 53–68. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.006>
- García, D. K., Dhar, A. K. y Alcivar-Warren, A. 1996. Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveal presence of two microsatellite and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Marine Biotechnology*, 5, 71–83.
- García, K. y Alcivar-Warren, A. 2007. Characterization of 35 new microsatellite genetic markers for the Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Their usefulness for studying genetic diversity of wild and cultured stocks, tracing pedigree in breeding programs, and linkage mapping. *Journal of Shellfish Research*, 26(4), 1203–1216.
- Gärke, C., Ytournal, F., Bed'Hom, B., Gut, I., Lathrop, M., Weigend, S. y Simianer, H. 2012. Comparison of SNPs and microsatellites for assessing the genetic structure of chicken populations. *Animal Genetics*, 43(4), 419–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02284.x>
- Gorbach, D. M., Hu, Z. L., Du, Z. Q. y Rothschild, M. F. 2009. SNP discovery in *Litopenaeus vannamei* with a new computational pipeline. *Animal Genetics*, 40(1), 106–109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01792.x>
- Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86(6), 485–486.
- Guo, S. y Thompson, E. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48, 361–372.
- Gutiérrez-Salazar, G. 2011. Patógenos en *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 (Crustacea Decapoda) en tres sistemas diferentes de cultivo y su asociación con parámetros físicoquímicos y biológicos, en

- Tamaulipas, México. Tesis de doctora en Ciencias. Univeridad Autònoma de Nuevo León.
- Hartl, D. y Clark, A. 1997. Principles of populations genetics (Tercera ed). Sinauer Associates, INC.
- Holm, L., Loeschcke, V. y Bendixen, C. 2001. Elucidation of the Molecular Basis of a Null Allele in a Rainbow Trout Microsatellite. *Marine Biotechnology*, 3, 555–560. <https://doi.org/10.1007/s10126-001-0057-7>
- Ihaka, R. y Gentleman, R. 1996. R: a language fot data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphics Statistical*, 5, 299–314.
- Jombart, T. 2008. Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 14(11), 1403–1405.
- Juyó-Rojas, D. 2012. Diversidad genética y estructura poblacional en genotipos diploides de papa. Tesis de Maestría en Ciencias Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>
- Kalinowski, S. T. y Taper, M. L. 2006. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 10(3), 551–555.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carsten, E. B. y Lefkowitz, E. J. 2012. Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Inc, (1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Kostamo, K., Korpelainen, H. y Olsson, S. 2012. Comparative study on the population genetics of the red algae *Furcellaria lumbricalis* occupying different salinity conditions. *Marine Biology*, 159(3), 561–571. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1835-z>
- Langella, O. 1999. *Populacions v.1.2.32*.
- Latch, E. K., Boarman, W. I., Walde, A. y Fleischer, R. C. 2011. Fine-scale analysis reveals cryptic landscape genetic structure in desert tortoises. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027794>
- Lehmann, T., Hawley, W. A. y Frank, H. 1996. An evaluation of evolutionary constraints. *Genetics Society of America*, 144, 1155–1163.
- Li, Z. J. y Cordes, J. F. 2004. DNA markers technologies and their applications in aquaculture. *Aquaculture*, 238(1), 1–37.
- Lightner, D. 2003. The penaeid shrimp viral pandemics due to IHNV, WSSV, TSV and YHV: history in the Americas and current status. 32nd Joint Meeting of the United States-Japan Cooperative Program in Natural Resource, s/n, 20.
- Liu, C., Wang, X., Xiang, J. y Li, F. 2012. EST-derived SNP discovery and selective pressure analysis in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 30(5), 713–723. <https://doi.org/10.1007/s00343-012-1252-2>
- Liu, T., Li, Q., Kong, L. y Yu, H. 2017. Comparison of microsatellites and SNPs for pedigree analysis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture International*, 25(4), 1507–1519. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0127-0>
- Liu, Z. 2007. Single nucleotide polymorphism (SNP). In *Aquaculture genome technologies* (1st ed., p. 545). Blackwell publishing.

- Liu, Z. J. y Cordes, J. F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1–4), 1–37. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.027>
- Loeza - Quintana, T. 2011. Diferencias genéticas entre poblaciones de ostra perlera *Pinctada margaritifera* en la polinesia francesa y relaciones con su cultivo. Tesis de maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- López-Galindo, L. 2014. Evaluación transcriptómica de la respuesta a la exposición a TCMáx en *Litopenaeus vannamei* ablacionados y no ablacionados , aclimatados a diferentes temperaturas. Tesis de maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Lutz, G. (2001). *Practical genetics for aquaculture* (Primera ed). John Wiley & Sons.
- Luvesuto, E., de Freitas, P. D. y Galetti, P. M. 2007. Genetic variation in a closed line of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). *Genetics and Molecular Biology*, 30(4), 1156–1160. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000600021>
- Mahbub, A. y Snæbjörn, P. 2016. Population structure of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* in Bangladesh based on variation in microsatellites and immune-related genes. *Marine Biology Research*, 12(7), 706–714. <https://doi.org/10.1080/17451000.2016.1196820>
- Manoukis, N. C. 2007. FORMATOMATIC: a program for converting diploid allelic data between common formats for populations genetic analysis. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 592–593.
- Manzo-Delgado, H. 2000. Efecto de cuatro densidades de siembra sobre el crecimiento de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado en estanques rústicos en Manzanillo, Colima. Tesis de Mestría en Ciencias. Universidad de Colima.
- Martínez, P. 2005. Aplicaciones de la genética para la mejora de la acuicultura. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía*, 21, 225–238.
- Meehan, D., Xu, Z., Zuniga, G. y Alcivar-warren, A. 2003. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp , *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea : Decapoda]. *Marine Biotechnology*, 5, 311–330. <https://doi.org/10.1007/s10126-002-0092-z>
- Mendoza-Cano, F., Grijalva-Chon, J., Pérez-Enríquez, R., Ramos-Paredes, J. y Varela-Romero, A. 2013. Genetic diversity of mitochondrial DNA from *Litopenaeus vannamei* brodstock used in northwestern Mexico. *Rev. Ciencias Marinas*, 39(4), 400–413. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48029963006>
- Morales -Covarrubias, M., Ruiz-Luna, A., Pereira Moura- Lemus, A., Solis-Montiel, V. y Conroy, G. 2011. Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. *Revista Científica*, 21(5), 434–446.
- Moss, D. R., Arce, S. M., Otoshi, C. A., Doyle, R. W. y Moss, S. M. 2007. Effects of inbreeding on survival and growth of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 272, S30–S37. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.014>
- Muñoz, Y. y Pérez, F. 2004. Identificación de gamilias de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* utilizando marcadores moleculares tipo microsatèlites. *Universidad Central Del Ecuador*, 1–9. Retrieved from <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/1548/1/3069.pdf>
- Nei, M. 1972. Genetic distances between populations. *American Naturalist*, 106, 283–292.
- O’Leary, N. A. y Gross, P. S. 2006. Genomic structure and transcriptional regulation of the penaeidin gene

- family from *Litopenaeus vannamei*. *Gene*, 371(1), 75–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.11.028>
- Olejniczak, M. y Krzyzosiak, W. 2006. Genotyping of simple sequence repeats - Factors implicated in shadow band generation revisited. *Electrophoresis*, 27(19), 3724–3734.  
<https://doi.org/10.1002/elps.200600136>
- Peakall, R. y Smouse, P. E. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Populations genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539.
- Perez-Enriquez, R., Hernández-Martínez, F. y Cruz, P. 2009. Genetic diversity status of White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico. In *Aquaculture* (Vol. 297, pp. 44–50).  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.08.038>
- Perez, F. 2003. Desarrollo de marcadores moleculares tipo microsatélite en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* para mejoramiento genético. *CENAIM Informa*, (Boletín informático No. 92), 3.
- Pérez, F., Ortiz, J., Zhinaulta, M., Gonzabay, C., Calderón, J. y Volckaert, F. A. M. J. 2005. Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus biridy*. *Marine Biotechnology*, 7(5), 554–569.  
<https://doi.org/10.1007/s10126-004-5099-1>
- Perez, R. y Max-Aguilar, A. 2016. Pedigree traceability in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using genetic markers: A comparison between microsatellites and SNP's. *Ciencias Marinas*, 42(2), 227–235.
- Postolache, D., Leonarduzzi, C., Piotti, A., Spanu, I., Roig, A., Fady, B. y Vendramin, G. G. 2014. Transcriptome versus genomic microsatellite markers: highly informative multiplexes for genotyping *Abies alba* mill. and Congeneric Species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(3), 750–760.  
<https://doi.org/10.1007/s11105-013-0688-7>
- Povh, J. a, Lopera Barrero, N. M., Ribeiro, R. P., Lupchinski Jr., E., Gomes, P. C. y Lopes, T. S. 2008. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Ciencia E Investigación Agraria*, 35(1), 5–15. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202008000100001>
- Pritchard, J. k., Stephens, M. y Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Rada, A. y Taboada, G. 1998. Métodos de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en Genética Molecular. Biofarbo.
- Rambaut, A. 2012. FigTree. Edinburgh: UK: University of Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology.
- Raymond, M. y Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86, 248–249.
- Rezaee, S., Farahmand, H. y Nematollahi, M. A. 2016. Genetic diversity status of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using SSR markers in Iran. *Aquaculture International*, 24(2), 479–489.  
<https://doi.org/10.1007/s10499-015-9939-y>
- Sánchez-Martínez, J. G., Aguirre-Guzmán, G. y Mejía-Ruíz, H. 2007. White spot syndrome virus in cultured shrimp: A review. *Aquaculture Research*, 38(13), 1339–1354. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01827.x>
- Santos, C., Rossini, B. C., Galetti, P. M. y Freitas, P. 2010. Genomic annotation characterization of polymorphic EST-SSR loci in *Litopenaeus vannamei* shrimp and transferability to others penaeid

species. Unpublished.

- Scarborough, J., Cowles, D. y Carter, R. 2002. Microsatellites in shrimp species. In *Modern approaches to the study of Crustacea* (pp. 291–299). Springer US.
- Schopen, G. C. B., Bovenhuis, H., Visker, M. H. P. W. y Van Arendonk, J. A. M. 2008. Comparison of information content for microsatellites and SNPs in poultry and cattle. *Animal Genetics*, 39(4), 451–453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01736.x>
- Sellars, M. J., Dierens, L., McWilliam, S., Little, B., Murphy, B., Coman, G. J. y Henshall, J. 2014. Comparison of microsatellite and SNP DNA markers for pedigree assignment in Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*, 417–426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03243.x>
- Semagn, K., Babu, R., Hearne, S. y Olsen, M. 2014. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding*, 33(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9917-x>
- Singh, N., Choudhury, D. R., Singh, A. K., Kumar, S., Srinivasan, K., Tyagi, R. K. y Singh, R. 2013. Comparison of SSR and SNP markers in estimation of genetic diversity and population structure of Indian rice varieties. *PLoS ONE*, 8(12), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084136>
- Souza de Lima, A. P., Bezerra Cabral da Silva, S. M., Cavalcanti Oliveira, K. K., Maggioni, R. y Moura Coimbra, M. R. 2010. Genetics of two marine shrimp hatcheries of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in Pernambuco, Brazil. *Ciencia Rural*, 40(2), 325–331. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000008>
- Thalamuthu, A., Mukhopadhyay, I., Ray, A. y Weeks, D. E. 2005. A comparison between microsatellite and single-nucleotide polymorphism markers with respect to two measures of information content. *BMC Genetics*, 6(Suppl 1), S27. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-S1-S27>
- Tóth, G., Gáspári, Z. y Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10(7), 967–981. <https://doi.org/10.1101/gr.10.7.967>
- Treece, G. y Yates, M. 1993. *Manual de laboratorio para el cultivo de larvas de camarón peneido* (No. TAMU-SG-93-504).
- Valles-Jimenez, R., Cruz, P. y Perez-Enriquez, R. 2005. Population Genetic Structure of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA Variation. *Marine Biotechnology*, 6, 475–484. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-3138-6>
- Valles-Jimenez, R., Gaffney, P. M. y Perez-Enriquez, R. 2006. RFLP analysis of the mtDNA control region in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) populations from the eastern Pacific. *Marine Biology*, 148(4), 867–873. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0122-2>
- Varela-Mejías, A. y Peña-Navarro, N. 2014. Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS / AHPNS) en camarones cultivados : Una revisión. *Repertorio Científico*, 17(January), 25–30.
- Vargas-Alarc, G., Tovilla-z, C. y Fragoso, M. 2013. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rsNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas.
- Vázquez-Lobo, A. y García-Morales, A. 2014. Microsatélites. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos, (Hancock 1999), 75–100. Retrieved from [http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id\\_pub=710](http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_pub=710)

- Vela-Avitúa, S., Motalado, H., Márquez-Valdelamar, L., Campos-Montes, G. y Castillo-Juárez, H. 2013. Decline of genetic variability in a captive population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using microsatellite and pedigree information. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(4), 1–10. <https://doi.org/10.2225/vol16-issue4-fulltext-11>
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M. y Eggen, A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Sciencce*, 34, 275–305. <https://doi.org/10.1051/gse>
- Wang, X., Rinehart, T., Wadl, P., Spiers, J., Hadziabdic, D., Windham, M. y Trigiano, R. 2009. A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles. *African Journal of Biotechnology*, 8(11), 2432–2436. <https://doi.org/10.4314/ajb.v8i11.60628>
- Wolfus, G., García, D. y Alcivar-Warren, A. 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture Magazine*, 152, 35–47.
- Yu, M., Cheng, Y. y Rothschild, M. F. 2006. SNP analysis of Molting related genes in *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* shrimp (Brief report). *Archiv Tierzucht*, 49(4), 411–412.
- Yu, Y., Wei, J., Zhang, X., Liu, J., Liu, C., Li, F. y Xiang, J. 2014. SNP discovery in the transcriptome of white pacific shrimp *Litopenaeus vannamei* by next generation sequencing. *PLoS ONE*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087218>
- Zhang, K., W., W., L I, W., Zhang, Q. y Kong, K. 2014. Analysis of genetic diversity and differentiation of seven stocks of *Litopenaeus vannamei* using microsatellite markers. *Oceanic and Coaestal Sea Research*, 13(4), 647–656. <https://doi.org/10.1007/s11802-014-2208-2>
- Zhi-Ying, J., Xiao-Wen, S., Li-Quin, L. y Qing-Quans, L. 2006. Isolation and characterization of microsatellite markers from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Molecular Ecology Notes*, 6, 1282–1284. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01515.x>
- Zhu, K., Yu, W., Huang, J., Zhou, F., Guo, H., Zhang, N. y Zhang, D. 2017. Parentage determination in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture International*, 25(2), 827–836. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0082-1>

## Anexos

---

### Anexo I

**Tabla 61.** Mezcla maestra para la amplificación de regiones microsatélites. Se indica la concentración inicial, final y el volumen final.

Compuesto	Concentración inicial	Concentración final	Mezclar 1 X
Amortiguador PCR	10 X	1X	1 $\mu$ L
BSA	10 $\mu$ g/ $\mu$ L	0.2 $\mu$ g/ $\mu$ L	0.2 $\mu$ L
Mix de dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.2 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	0.6 $\mu$ L
Oligonucleótido sentido	10 $\mu$ m	0.3 $\mu$ m	0.3 $\mu$ L
Oligonucleótido anti sentido	10 $\mu$ m	0.3 $\mu$ m	0.3 $\mu$ L
Taq polimerasa	5 U/ $\mu$ L	0.1 U/ $\mu$ L	0.2 $\mu$ L
DNA genómico	-	150 ng/ $\mu$ L	3 $\mu$ L
Agua PCR	-	-	4.2 $\mu$ L
		Volumen final:	10 $\mu$ L

## Anexo II

**Tabla 72.** Loci amplificados para *P. (L.) vannamei*. Se indica el número de acceso a GenBank, el locus, la secuencia de los oligonucleótidos utilizados (sentido y anti sentido), el tamaño esperado reportado (Te), la temperatura de hibridación reportada (Tm), la referencia, por último, con un asterisco se indica los pares de oligonucleótidos utilizados en el presente estudio.

Genbank	Locus	Oligonucleótidos	Te (pb)	Tm (°C)	Referencia	Usados
AF360055	TUMXLv7.56	F: AGGTAGGGAAGTCGTGAGGG R: CCATGGCTTTCCTTCTTTTC	327	59	Meehan <i>et al.</i> , 2003	**
AF360023	TUMXLv5.35	F: CTGCTAATTGAATTTTCAGG R: ACAGATAACCTAACTGACGC	104	52	Meehan <i>et al.</i> , 2003	**
AF360076	TUMXLv8.256	F: GGA CT CACACTTCTGGTTC R: GGCTGCACCTTGTAAGTC	166	55	Meehan <i>et al.</i> , 2003	**
AF360072	TUMXLv8.220	F: GATGTGGTTGATGAAGTGATG R: CGCATTATCTAAATGGCAAG	261	59	Meehan <i>et al.</i> , 2003	**
AF006629	TUI3224R	F: ACTAGTGGATCTGTCTATTCAT R: ATACCCACCCATGCATGTTA	185	44	García y Alcivar-Warren, 2007	
DQ658189	HLJN-001	F: GCACCTGAAGGACATGTGTG R: ACAACCAGCCTGTCCTGTTT	263-500	60	Zhi-Ying <i>et al.</i> , 2006	
DQ658196	HLJN-008	F: CGTAAGTCCTGCAAAGAAACT R: GCCGTTCAACTATATATCAGCA	316-454	60	Zhi-Ying <i>et al.</i> , 2006	
AY369256	Lvan1	F: GCCATAAACGCAAGACTGAG R: GCAGGTATACGGTCATGTGTA	136-146	56	Freitas <i>et al.</i> , 2007	
DQ988335	E4	F: ATAAGAAGGTCGTTTCTCTC R: AATACGACTCAACTATAGGG	279-326	53	Freitas <i>et al.</i> , 2007	
AY062928	Pvan1758	F: TATGCTCGTTCCTTTGCTT R: TTGAAGGAAAAGTGTGGGG	163-189	55	Cruz <i>et al.</i> , 2002	
AY062925	Pvan1815	F: GATCATTCGCCCTCTTTTT R: ATCTACGGTTCGAGAGCAGA	126-141	55	Cruz <i>et al.</i> , 2002	**
*DQ206401.1	CNM-MG512	F: TGGAACCTGGCTTGA R: TCCTAAATACACGGACACT	249-257	59	Pérez <i>et al.</i> , 2005	**

Asterisco (\*) Indica SSR desarrollado a partir de secuencias expresables (EST). Dos asteriscos (\*\*) indican los SSR utilizados en este estudio. F: Forward: sentido, R: reverse: anti sentido, \*Utilizados: en el presente estudio

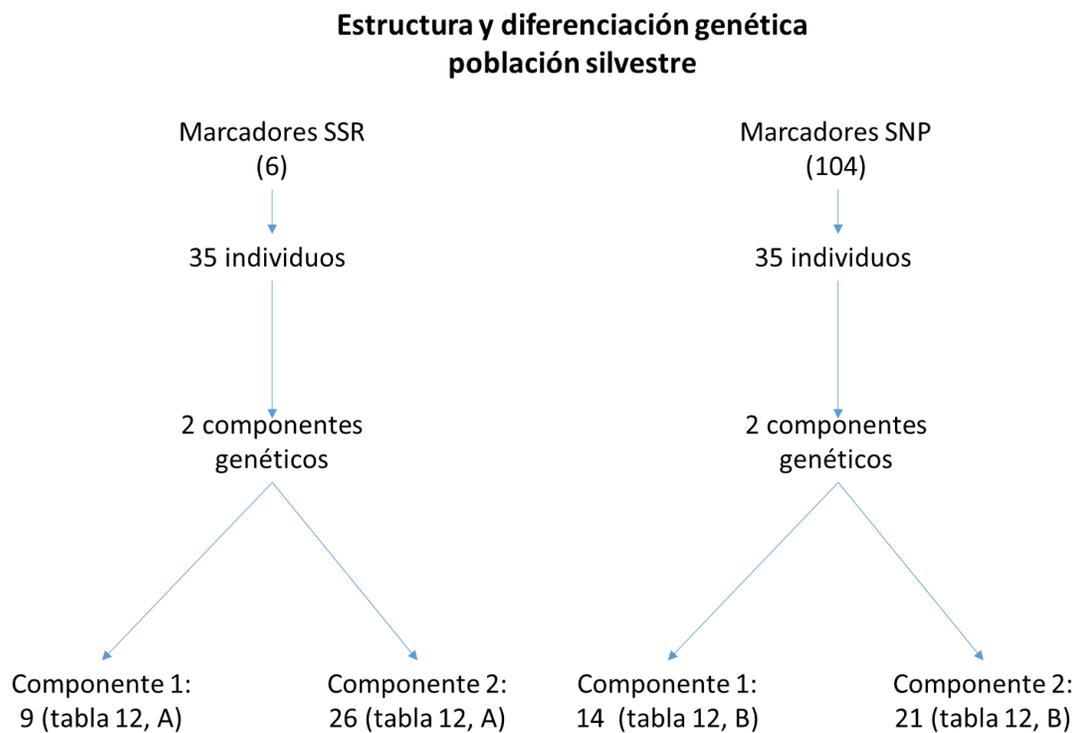
## Anexo III

**Tabla 83.** Frecuencia alélica por locus amplificado con marcadores microsatélites en el lote de muestras silvestres de camarón. Con énfasis en el alelo con mayor frecuencia.

TUMXLv5.35		Pvan1815		TUMXLv7.56		TUMXLv8.220		TUMXLv8.256		CNM-MG512	
Alelo	Frec.	Alelo	Frec.	Alelo	Frec.	Alelo	Frec.	Alelo	Frec.	Alelo	Frec.
124	0.029	112	0.029	242	0.015	137	0.018	151	0.04545	205	0.043
138	0.147	126	0.057	248	0.015	179	0.036	154	0.24242	209	0.029
140	0.338	128	0.100	283	0.152	181	0.018	157	0.22727	241	0.014
142	0.191	130	0.157	298	0.061	207	0.089	166	0.10606	245	0.357
144	0.206	132	0.029	301	0.030	209	0.107	178	0.0303	249	0.371
146	0.044	134	0.043	304	0.030	241	0.036	181	0.13636	253	0.157
148	0.015	136	0.129	308	0.045	245	0.036	187	0.04545	257	0.014
150	0.029	138	0.086	312	0.030	261	0.018	199	0.09091	367	0.014
		142	0.243	319	0.076	269	0.054	202	0.01515		
		148	0.014	325	0.015	285	0.107	205	0.01515		
		156	0.057	331	0.136	291	0.054	214	0.04545		
		162	0.014	336	0.076	299	0.054				
		168	0.014	342	0.015	305	0.036				
		212	0.014	372	0.015	309	0.054				
		220	0.014	402	0.045	321	0.018				
				406	0.015	339	0.036				
				426	0.061	351	0.107				
				439	0.015	363	0.036				
				456	0.015	377	0.036				
				472	0.091	385	0.054				
				484	0.015						
				490	0.015						
				498	0.015						

\*Recuadro marcado con gris indica el alelo con mayor frecuencia.

## Anexo IV



**Figura 28.** Resumen del número de individuos dentro de cada componente genética en el lote de muestras de procedencia silvestre detectadas con ambos marcadores moleculares (SSR y SNP).

**Tabla 14.** Ancestría inferida para cada individuo del lote de muestras silvestres, para determinar el porcentaje de pertenencia a un determinado componente.

A) Marcadores SSR				B) Marcadores SNP			
Muestra	Comp. 1	Comp. 2	Pertenencia	Muestra	Comp. 1	Comp. 2	Pertenencia
Ca001	0.017	0.983	Comp. 2	Ca001	0.872	0.128	Comp. 1
Ca003	0.524	0.476	Comp. 1	Ca003	0.006	0.994	Comp. 2
Ca004	0.03	0.97	Comp. 2	Ca004	0.997	0.003	Comp. 1
Ca005	0.048	0.952	Comp. 2	Ca005	0.017	0.983	Comp. 2
Ca006	0.009	0.991	Comp. 2	Ca006	0.995	0.005	Comp. 1
Ca007	0.055	0.945	Comp. 2	Ca007	0.999	0.001	Comp. 1
Ca008	0.032	0.968	Comp. 2	Ca008	0.999	0.001	Comp. 1
Ca009	0.058	0.942	Comp. 2	Ca009	0.004	0.996	Comp. 2
Ca011	0.183	0.817	Comp. 2	Ca011	0.015	0.985	Comp. 2
Ca012	0.974	0.026	Comp. 1	Ca012	0.007	0.993	Comp. 2
Ca015	0.636	0.364	Comp. 1	Ca015	0.002	0.998	Comp. 2
Ca016	0.99	0.01	Comp. 1	Ca016	0.002	0.998	Comp. 2
Ca017	0.99	0.01	Comp. 1	Ca017	0.006	0.994	Comp. 2
Ca018	0.083	0.917	Comp. 2	Ca018	0.999	0.001	Comp. 1
Ca019	0.03	0.97	Comp. 2	Ca019	0.998	0.002	Comp. 1
Ca020	0.143	0.857	Comp. 2	Ca020	0.997	0.003	Comp. 1
Ca021	0.01	0.99	Comp. 2	Ca021	0.999	0.001	Comp. 1
Ca022	0.013	0.987	Comp. 2	Ca022	0.999	0.001	Comp. 1
Ca028	0.011	0.989	Comp. 2	Ca028	0.999	0.001	Comp. 1
Ca031	0.027	0.973	Comp. 2	Ca031	0.002	0.998	Comp. 2
Ca033	0.145	0.855	Comp. 2	Ca033	0.013	0.987	Comp. 2
Ca034	0.09	0.91	Comp. 2	Ca034	0.01	0.99	Comp. 2
Ca035	0.134	0.866	Comp. 2	Ca035	0.004	0.996	Comp. 2
Ca037	0.956	0.044	Comp. 1	Ca037	0.004	0.996	Comp. 2
Ca038	0.972	0.028	Comp. 1	Ca038	0.003	0.997	Comp. 2
Ca040	0.014	0.986	Comp. 2	Ca040	0.992	0.008	Comp. 1
Ca041	0.01	0.99	Comp. 2	Ca041	0.999	0.001	Comp. 1
Ca043	0.021	0.979	Comp. 2	Ca043	0.003	0.997	Comp. 2
Ca044	0.017	0.983	Comp. 2	Ca044	0.004	0.996	Comp. 2
Ca045	0.2	0.8	Comp. 2	Ca045	0.002	0.998	Comp. 2
Ca046	0.27	0.73	Comp. 2	Ca046	0.002	0.998	Comp. 2
Ca047	0.176	0.824	Comp. 2	Ca047	0.002	0.998	Comp. 2
Ca048	0.018	0.982	Comp. 2	Ca048	0.999	0.001	Comp. 1
Ca049	0.978	0.022	Comp. 1	Ca049	0.002	0.998	Comp. 2
Ca050	0.864	0.136	Comp. 1	Ca050	0.002	0.998	Comp. 2

\*Renglones con banda gris indican individuos pertenecientes a otro componente. Comp.: componente

## Anexo V

**Tabla 95.** Porcentaje de variación explicada por dos ejes utilizando seis marcadores microsatélites en el análisis de componentes principales de un lote de muestras silvestres de camarón blanco.

Eje	1	2
%	5.412	5.233
Acumulado	5.412	10.645

**Tabla 106.** Porcentaje de variación explicada por dos ejes utilizando seis marcadores SNP en el análisis de componentes principales con 35 muestras de un lote silvestres de camarón blanco.

Eje	1	2
%	56.181	12.282
Acumulado	56.181	68.463

**Tabla 117.** Variación explicada por dos ejes utilizando marcadores SNP en análisis de componentes principales de un lote de muestras silvestres y de siete líneas de cultivo de camarón blanco.

Eje	1	2
%	11.34	7.48
Acumulado	11.34	18.82

## Anexo VI

**Tabla 128.** Escala de significancia para el contenido de información polimórfica de los seis marcadores microsatélites utilizados en este estudio.

Intervalo	Significancia
<0.25	Ligeramente informativos
0.25 – 0.5	Razonablemente informativos
>0.5	Altamente informativos

(Botstein *et al.*, 1980)

## Anexo VII

**Tabla 19.** Comparación entre el número de alelos y heterocigosidad observada obtenida a partir de los seis microsatélites utilizados para evaluar al lote de muestras silvestres (n = 35) utilizadas en este estudio y los resultados obtenidos por los autores que desarrollaron estos marcadores.

Locus	Otros autores			Este estudio		Referencias
	Procedencia de muestras	Na	Ho	Na	Ho	
TUMXLv5.35	Cultivo	5	0.4	8	0.147	Meehan <i>et al.</i> , 2003
Pvan1815	Cultivo	12	0.53	15	0.371	Cruz <i>et al.</i> , 2002
TUMXLv7.56	Cultivo	4	0.75	23	0.485	Meehan <i>et al.</i> , 2003
TUMXLv8.220	Cultivo	11	0.75	20	0.393	Meehan <i>et al.</i> , 2003
TUMXLv8.256	Cultivo	6	0.67	11	0.333	Meehan <i>et al.</i> , 2003
CNM-MG512	Ecuador / silvestres	6/4	0.71	8	0.229	Pérez <i>et al.</i> , 2005

Anexo VIII

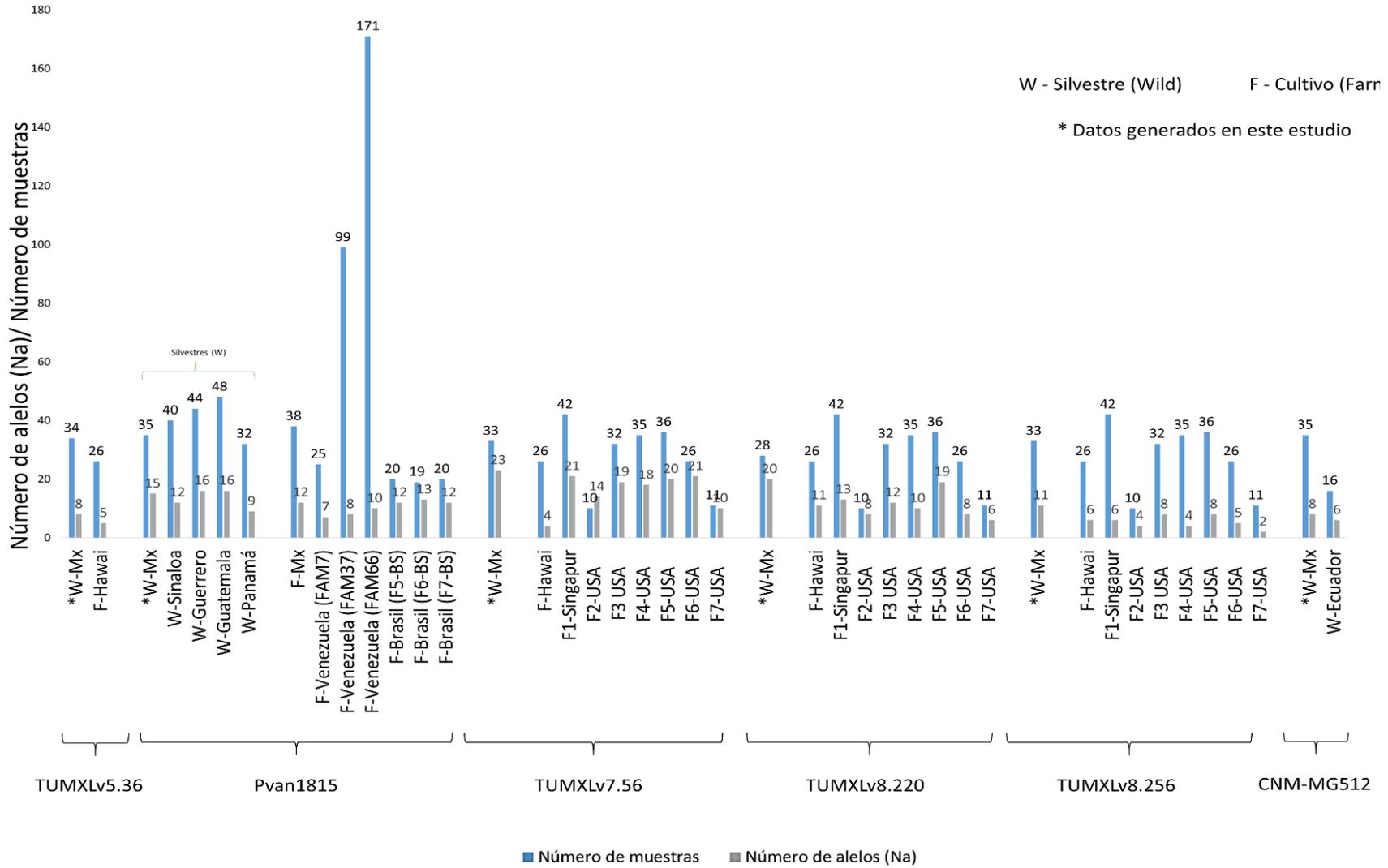
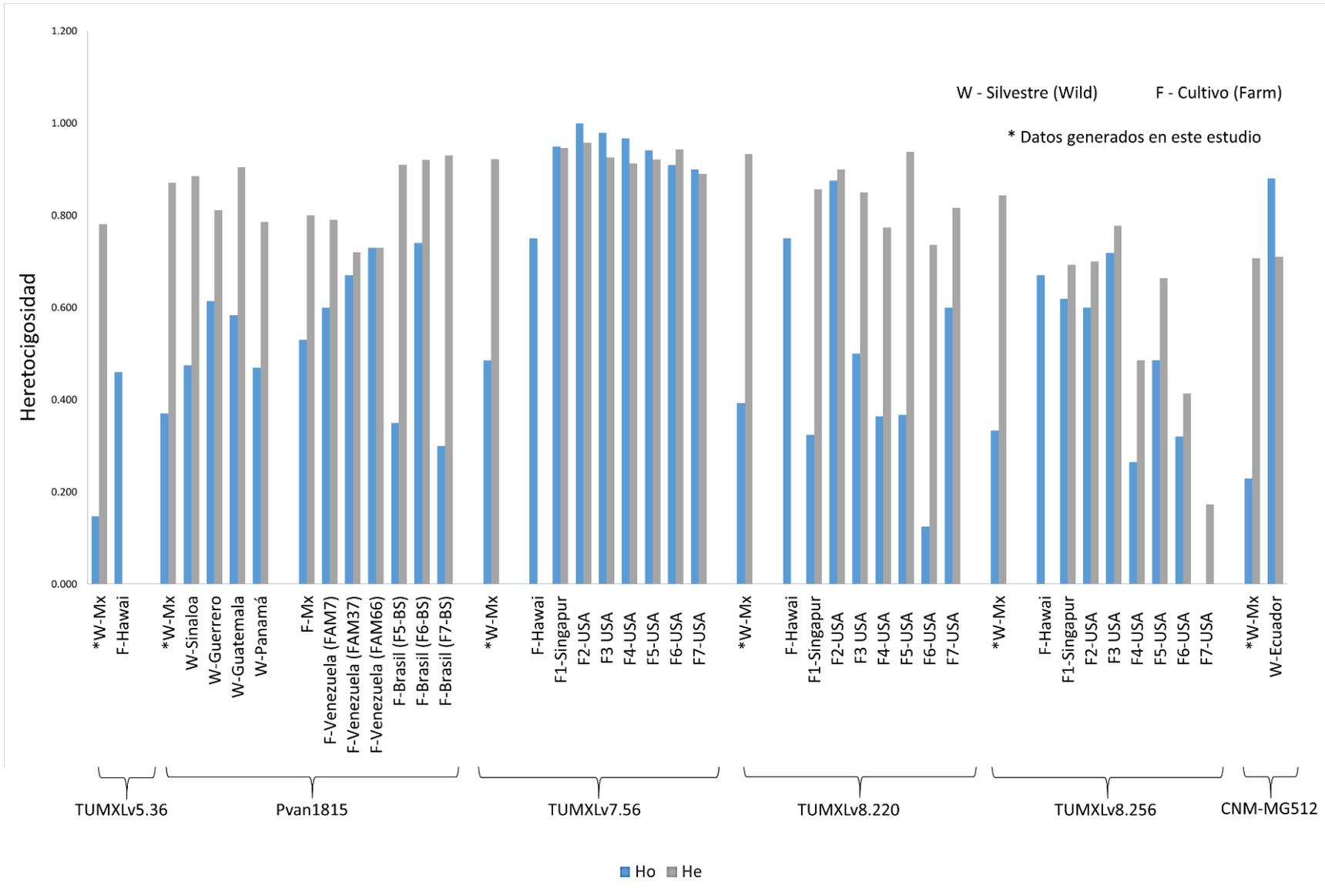
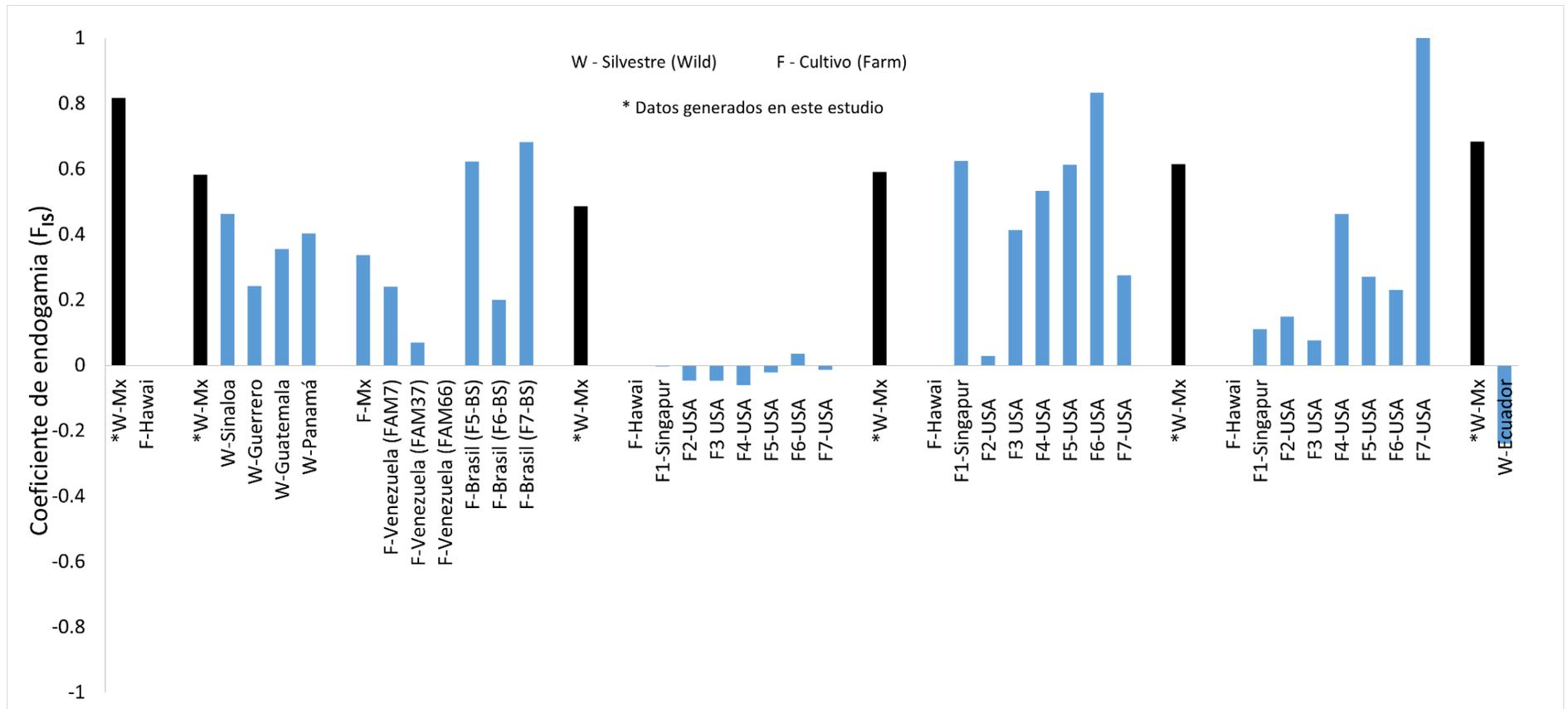


Figura 29. Número de muestras y número de alelos para los microsatélites evaluados en este estudio y en los utilizados para comparar la información obtenida.

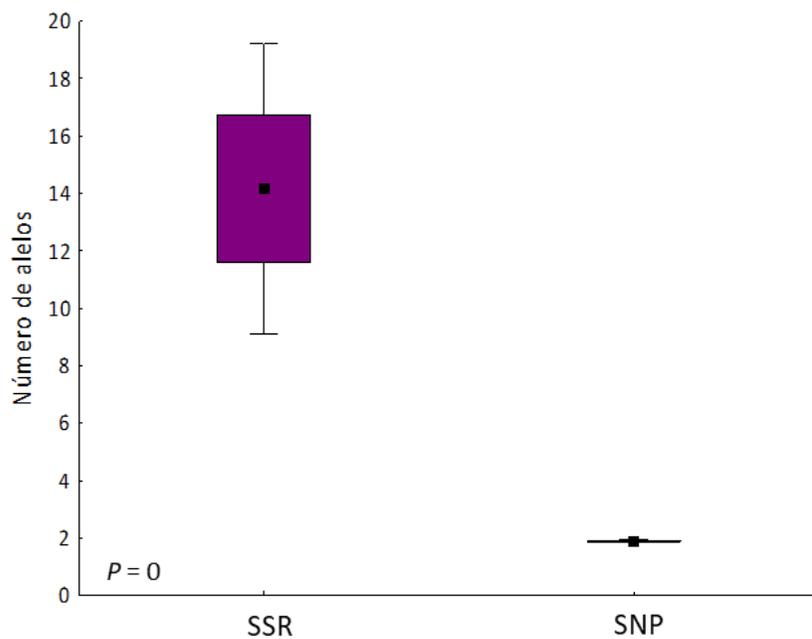


**Figura 30.** Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) obtenidas en este estudio a partir de seis marcadores SSR y resultados obtenidos en otros estudios con los mismos marcadores SSR.

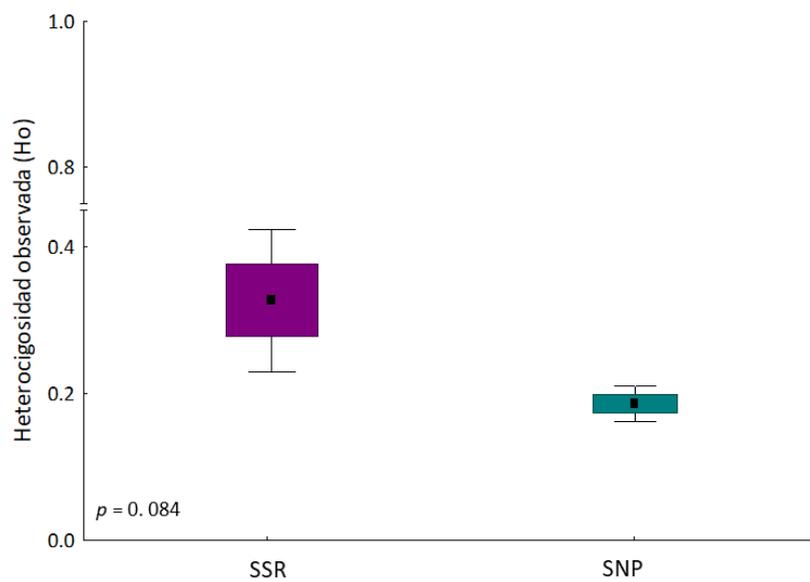


**Figura 31.** Coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) obtenidos para el lote de muestras silvestres con seis marcadores SSR y resultados obtenidos en otros estudios comparando con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

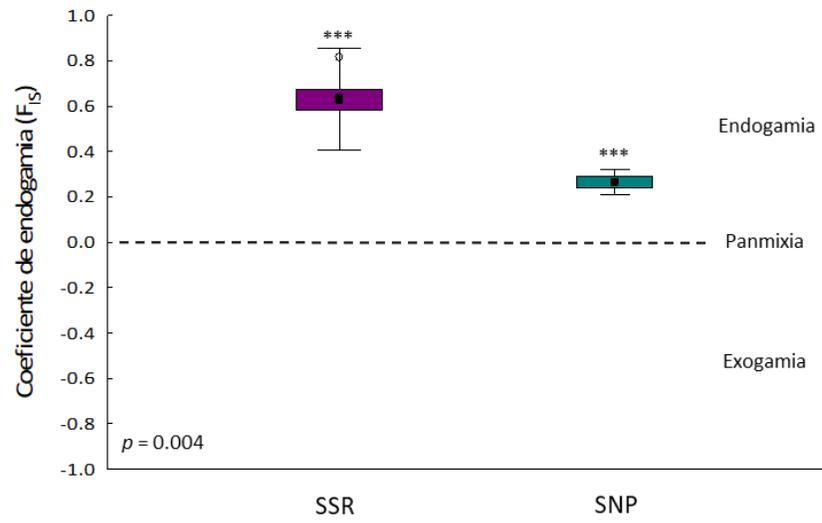
## Anexo IX



**Figura 32.** Número de alelos obtenidos para el lote de muestras silvestres, utilizando marcadores microsatélites y SNP.



**Figura 33.** Heterocigosidad observada en un lote de muestras silvestres mexicanas; comparando marcadores microsatélites y SNP.



**Figura 34.** Coeficiente de endogamia obtenido a partir de marcadores microsatélites y SNP en un lote de muestras de camarón blanco silvestre mexicana.

**Anexo X****Tabla 20.** Escala de significancia de valores de  $F_{ST}$  para comparaciones entre poblaciones.

<b>Intervalo</b>	<b>Significancia</b>
0.00 – 0.05	Pequeñamente diferentes
0.05 – 0.15	Moderadamente diferentes
0.15 – 0.25	Altamente diferentes
> 0.25	Muy altamente diferentes

(Hartl y Clark, 1997)

