



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

Determinación de paternidad y relaciones genéticas en
camarón blanco del Pacífico (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*)
usando microsatélites

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A
ANA LAURA TAPIA GARCÍA

Tutor: HÉCTOR CASTILLO JUÁREZ
COMITÉ TUTORAL: HUGO H. MONTALDO VALDENEGRO
HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA

MÉXICO D. F.

2010

Dedicatoria

Dedico este proyecto en primer lugar a mis padres, Salvador y Catalina a quienes les debo todo lo que soy. A mi héroe, mi ejemplo, mi mejor maestro, mi padre: el “Dr. Tapia” quien me enseñó cuanto pudo mientras estuvo presente y al final de cada consejo o regaño, terminaba diciendo: - Sólo quiero que seas feliz-. A la mujer más dulce, sensible e incansable que conozco: mi madre. A mis hermanos Salvador, Paco y Rocío (mi hermana preferida del mundo) por seguir compartiendo mi vida y estar ahí pase lo que pase.

A mi tío Vicente, tía Mary, Ale y Tony por abrirme las puertas de su casa y brindarme un hogar.

A Sergio Vela (mi Sensei) por sus enseñanzas en el laboratorio y por ser además del equipo de shrimpers, un gran amigo.

A mis amigos y compañeros: José Francisco Rivera, Bárbara Acosta, Omar Abed Torres, Adrian Guzmán, Gabriel Campos, Karina Ueno, Abril Herrera, Fabiola Batalla, Felipe Román, Marco Antonio Segura, Pedro Pablo Torres.

A mis nuevos alumnos que me enseñan a ser maestra...

...a todos aquellos que con su presencia en mi vida siguen formando la persona que soy.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM y fue parcialmente financiado con recursos del Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos CONACYT-SAGARPA-2005-12100 en conjunto con fondos de la empresa Maricultura del Pacífico S.A. de C.V.

Gracias a mi tutor el Dr. Héctor Castillo por presentarme el mundo de la Genética y la Acuicultura y guiarme durante este proceso con toda la sabiduría, amabilidad y sencillez que lo caracterizan.

A mi comité tutorial: Dr. Hugo Montaldo por toda su paciencia y dirección en mi tesis y Dr. Humberto Ramírez por estar siempre presente.

A la empresa Maricultura del Pacífico S. A. de C. V. en especial al Ing. Cesáreo Cabrera, Ing. Juan Carlos Quintana, Ing. Alfonso Martínez y M. en C. Erika Trani gracias por el financiamiento y el apoyo durante mis estancias en las instalaciones.

Personal del Instituto de Biología de la UNAM en especial a la M. en C. Laura Márquez.

A mi familia, compañeros y amigos.

Gracias a todos.

RESUMEN

TAPIA GARCÍA ANA LAURA. Determinación de paternidad y relaciones genéticas en camarón blanco del Pacífico (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*) usando microsatélites. (Bajo la dirección de HÉCTOR CASTILLO JUÁREZ, HUGO HORACIO MONTALDO VALDENEGRO y HUMBERTO RAMIREZ MENDOZA).

La inferencia de paternidad usando microsatélites se ha utilizado en algunos programas de mejoramiento genético en acuicultura para establecer pedigríes. El objetivo de este estudio fue determinar la precisión en la asignación de la paternidad de una población seleccionada de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*), usando microsatélites; y evaluar el uso de estos marcadores genéticos en la estimación de relaciones y distancias genéticas dentro de una población seleccionada de camarón cultivado, individuos de una línea distinta e individuos silvestres. Se determinó la paternidad en una población de camarones usando 8 microsatélites. Se determinaron las probabilidades de exclusión para cada locus (P_{excl1}) y la probabilidad de exclusión combinada (P_{excl2}) en la elección de los loci. La asignación de la progenie con la madre correcta fue del 70.7 %, 80.5% para el padre correcto y 60.2% de asignaciones para ambos padres. Los estadísticos F de Wright, indican una mayor distancia entre la población de camarones silvestres con respecto a las poblaciones de camarones cultivados. La correlación entre la coancestría genealógica y la coancestría molecular indica que únicamente el 9.6 % de la variabilidad de ambas coancestrías es común, y revela que el método molecular no estima adecuadamente la coancestría. La ventaja de incluir información molecular es elevada cuando la información disponible incluye un número considerable de progenitores y descendientes, no obstante, ni la información genealógica ni la molecular por sí solas son suficientes para monitorear poblaciones pequeñas cuando el pedigrí es poco profundo. En conclusión, el poder de exclusión de los microsatélites de este estudio se vio mermado por la presencia de alelos nulos y la información molecular en este estudio no fue suficiente para ser incluida en un

programa de mejoramiento genético debido al sesgo en la estimación de coancestría, a causa del tipo y número de microsatélites que se utilizaron.

Palabras clave: Asignación de paternidad, probabilidad de exclusión, distancias genéticas, coancestría, Acuicultura.

ABSTRACT

TAPIA GARCÍA ANA LAURA. Determination of paternity and genetic relationships of Pacific white shrimp (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*) using microsatellites. (Directed by HÉCTOR CASTILLO JUÁREZ, HUGO HORACIO MONTALDO VALDENEGRO and HUMBERTO RAMIREZ MENDOZA).

The inference of paternity using microsatellites has been used in some breeding programs in aquaculture to establish pedigrees. The aim of this study was to determine the accuracy in paternity assignment of a selected population of Pacific white shrimp (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*) using microsatellites, and evaluate the use of these genetic markers in the estimation of relationships and genetic distances in a selected population of farmed shrimp, individuals of a different line and wild individuals. We assing paternity in a population of shrimp using 8 microsatellites. We determined the probability of exclusion for each locus (Pexcl1) and the combined exclusion probability (Pexcl2) in the choice of loci. Allocation of the progeny with the correct mother was 70.7%, 80.5% for the true father and 60.2% correct assignments for both parents. Wright's F statistics indicate a greater distance between the wild shrimp population with respect to the cultured shrimp populations. The correlation between the genealogical coancestry and molecular coancestry indicates that only 9.6% of the variability of both coancestries is common, and reveals that the molecular method are not properly estimated coancestry. The advantage of including molecular information is high when the information available includes a considerable number of parents and progeny, however, neither genealogical nor molecular information by themselves are sufficient for monitoring small populations when the pedigree is shallow. In conclusion, the power of exclusion of microsatellites in this study was decreased by presence of null alleles and molecular information in this study was not enough to be included in a breeding program due to bias in the estimation of coancestry, because of the type and number of microsatellites that were used.

Keywords: Paternity assignment, probability of exclusion, genetic distances, coancestry, Aquaculture.

CONTENIDO

Resumen.....	iii
Abstract.....	v
Lista de cuadros.....	ix
1.- Introducción.....	1
1.1 Producción de camarón cultivado.....	3
1.2 Marcadores Moleculares.....	4
1.2.1 Tipos de marcadores y contenido de información polimórfica (PIC).....	4
1.3 Microsatélites.....	5
1.3.1 Generación de microsatélites.....	6
1.3.2 Uso de microsatélites en análisis de paternidad.....	8
1.3.3 Probabilidad de exclusión en asignaciones de paternidad.....	10
1.3.4 Alelos nulos.....	12
1.3.5 Determinación de relaciones de parentesco y distancias genéticas usando microsatélites.....	14
2.- Justificación.....	17
3.- Objetivos.....	18
4.- Hipótesis	19
5. Material y métodos.....	20
5.1 Animales y muestras.....	20
5.2 Elección de los loci	20
5.3 Extracción de ADN y genotipificación	21
5.4 Análisis de frecuencias alélicas.....	21
5.5 Asignación de paternidad.....	23
5.6 Determinación de relaciones de parentesco y distancias genéticas usando microsatélites.....	23
5.7 Correlaciones.....	23

6.- Resultados.....	24
6.1 Elección de loci.....	24
6.2 Análisis de frecuencias alélicas.....	24
6.3 Asignación de paternidad.....	26
6.5 Determinación de relaciones genéticas.....	27
7.- Discusión.....	29
8. Conclusiones.....	33
9.- Literatura citada.....	35

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Trabajos realizados que utilizan microsatélites en la determinación de paternidad	9
Cuadro 2. Detalle de los microsatélites a usar en este estudio.....	22
Cuadro 3. Número de alelos, probabilidad de exclusión (Pexcl1), Contenido de información Polimórfica (PIC) y probabilidad de exclusión acumulada (Pexcl2)	25
Cuadro 4. Número de alelos (k), número de individuos (N), número de heterocigotos (Het), número de homocigotos (Hom), Heterocigosidad observada (HObs), heterocigosidad esperada (HExp), contenido de información polimórfica (PIC) y frecuencia de alelos nulos (F null).....	26
Cuadro 5. Porcentaje de asignaciones correctas de la progenie con sus verdaderos padres.....	27
Cuadro 6. Estadísticas de los coeficientes de coancestría genealógica.....	27
Cuadro 7. FIS Deficiencia de heterocigotos dentro de la población.....	28
Cuadro 8. FST Deficiencia de heterocigotos debido a la subdivisión de la población.....	28
Cuadro 9. FIT Deficiencia de heterocigotos en la población total.....	28

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo y domesticación del camarón ha traído consigo la incorporación de programas de selección con el objeto de producir camarones con desempeños superiores en peso, resistencia a enfermedades y sobrevivencia. En nuestro país, dichos programas iniciaron en 1998 y han ido incorporando tecnologías como el BLUP¹ que eran de uso común en la selección avícola y ganadera (Castillo-Juárez *et al.*, 2005). La estimación de los valores genéticos de los individuos evaluados mediante BLUP permite seleccionar de una manera más eficiente a los reproductores, ya que predice de forma insesgada y precisa el valor genético aditivo de los candidatos a reproductores (Lynch y Walsh, 1998).

Los programas de mejoramiento genético de cualquier especie incluyen un proceso de selección de reproductores, lo que ocasiona que la variación genética disminuya paulatinamente a mediano y largo plazo. En especies acuícolas, la importancia de conocer las relaciones genéticas es ilustrado en forma muy completa por Ponzoni *et al.* (2010) para el caso de la Tilapia del Nilo. Wolfus (1997) menciona la importancia de mantener niveles suficientes de variación en poblaciones de peneidos debido a que la respuesta genética en un programa de selección, depende en gran parte de la variabilidad genética.

Un requisito primordial para el desarrollo de un programa de mejoramiento de especies acuícolas es mantener información confiable del pedigrí (Jerry *et al.*, 2004). Con el fin de utilizar información familiar para las evaluaciones genéticas, reducir el incremento de la endogamia y las pérdidas de variación genética derivadas de los programas de selección, se requiere conocer la genealogía de los animales involucrados en los programas de selección de especies acuícolas. Si se tiene la identificación individual y la de la familia de procedencia, es posible

¹ Por sus siglas en inglés, Mejor Predictor Lineal Insesgado (de los valores genéticos de los individuos evaluados).

conocer las relaciones genéticas existentes en la población evaluada (Gjedrem, 2005). Conservar información de las relaciones genealógicas entre individuos de múltiples generaciones permite el diseño de programas de mejoramiento que maximicen la respuesta genética, reduciendo los efectos detrimentales y la acumulación de consanguinidad (Jerry *et al.*, 2004).

Para obtener la supervivencia, crecimiento de cada familia y mantener la información de pedigrí, la progenie de cada grupo familiar es a menudo aislada y sembrada en depósitos separados hasta que son lo suficientemente grandes para etiquetarlos físicamente (elastómeros). Lo anterior no sólo implica mayores costos por aumentos de las necesidades de espacio y mano de obra, sino que también introduce efectos ambientales (densidad del tanque, calidad del agua, disponibilidad de comida, etc.) que pueden confundirse con los efectos genéticos (efecto materno, paterno, familia), reduciendo la precisión de la selección (Herbinger *et al.*, 1999).

La inferencia de paternidad usando marcadores altamente polimórficos y codominantes se ha utilizado en algunos programas de mejoramiento genético en acuicultura como una vía para establecer pedigríes (Norris *et al.*, 2000; Hara y Sekino, 2003; Castro *et al.*, 2007, Navarro *et al.*, 2008). El uso de marcadores de ADN como los microsatélites permite que la progenie de diferentes familias sea criada comunalmente y las familias de origen sean asignadas retrospectivamente (Jerry *et al.*, 2004, Herbinger *et al.*, 1999).

1.1 PRODUCCIÓN DE CAMARÓN CULTIVADO

La camaronicultura es una actividad de importancia económica creciente en México. La captura anual es de aproximadamente 73 mil toneladas con una producción de camarón cultivado de alrededor de 77 mil toneladas. El cultivo de los camarones marinos, practicado en varios países de América Latina, se ha revelado como una actividad económicamente rentable que ha propiciado el aumento del interés de los gobiernos por incorporar esta actividad a sus estrategias de desarrollo (Lobato, 1992).

El camarón es la tercera especie en volumen de producción en México, pero la primera en valor a nivel nacional, ya que aporta el 44% del valor de la producción pesquera nacional lo que equivale a 3,359.528 millones de pesos en 2005, contribuyendo con casi dos terceras partes del valor de la producción total, incluyendo la captura (SAGARPA, 2005).

En México, 21 laboratorios productores de larvas de camarón de los estados de Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Colima y Yucatán, producen más de 90% de las larvas que se destinan a la producción nacional (Panorama Acuícola, 2004).

Maricultura del Pacífico, S.A. de C.V. es una empresa productora de nauplios y poslarvas de camarón desde PL5 hasta PL20 y ofrecen disponibilidad de venta desde enero a septiembre. Cuenta con dos laboratorios de producción localizados en el Municipio de Rosario, Sinaloa y en Bahía Kino, Sonora. En el laboratorio de Rosario también se encuentra la granja de reproductores, un núcleo de mejoramiento genético, las instalaciones de maduración y el 50% de la cría de larvas, el otro 50% se encuentra en Bahía Kino. La producción anual (2009-2010) de este laboratorio es de alrededor de dos mil millones de larvas, con un rendimiento de de 30 a 35 millones de nauplios diarios y una producción de 90,000 nauplios por hembra (Panorama Acuícola, 2002).

1.2 MARCADORES MOLECULARES

Debido a que todos los organismos son sujetos a presentar mutaciones como resultado de las operaciones normales de las células y sus interacciones con el ambiente, se produce variación genética (polimorfismo). A través de la evolución, diferentes tipos de mutaciones pueden existir en algunas especies determinadas; el número, grado y tipo de mutaciones definen en parte la variación genética dentro de las especies (Lewin, 2004). La tecnología de los marcadores de ADN puede aplicarse para revelar estas mutaciones (Beaumont y Hoare, 2003).

1.2.1 Tipos de marcadores y contenido de información polimórfica (PIC)

Los marcadores moleculares se clasifican en dos categorías: tipo I, son marcadores asociados con genes de información conocida; incluyen Aloenzimas, ADN mitocondrial (mtDNA) y Marcadores de Secuencias Expresadas (ESTs). Los marcadores del tipo II se asocian con segmentos genómicos anónimos, entre ellos se encuentran los ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD), microsatélites (también llamados Secuencias Simples Repetidas -SSR- o Secuencias Cortas Repetidas en Tándem -STR-), Polimorfismo de un solo Nucleótido (SNP) y Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restrición (RFLP-PCR). Tales marcadores, han sido ampliamente utilizados en estudios de genética de poblaciones, cuyas caracterizaciones de la diversidad genética y divergencias dentro y entre poblaciones son basadas en supuestos de equilibrio Hardy-Weinberg y en su neutralidad (Liu y Cordes, 2004).

La utilidad de los marcadores moleculares puede ser determinada basándose en el contenido de información polimórfica (PIC). El PIC se refiere al valor del marcador para detectar polimorfismo en una población; depende del número de alelos detectables y de la distribución de sus frecuencias, y equivale a 1 menos la suma de los cuadrados de todas las frecuencias alélicas (Liu y Cordes, 2004).

1.3 MICROSATÉLITES

Los microsatélites consisten en múltiples copias de Secuencias Simples Repetidas en tándem, el tamaño de la secuencia que se repite es de 1 a 6 pares de bases. Se ha encontrado gran abundancia de este tipo de marcadores en todas las especies estudiadas. En peces se ha estimado que ocurren una vez cada 10 pb (Wright, 1993). Tienden a distribuirse uniformemente en el genoma tanto en regiones codificantes, regiones intrónicas así como en secuencias fuera de los genes (Goldstein y Schlötterer, 1999).

La mayoría de los microsatélites son de tamaño relativamente pequeño, y van de algunos pocos repetidos hasta algunos cientos. Este tamaño es importante para facilitar la genotipificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). El gran número de alelos por locus hacen este tipo de marcadores los más elevados en cuanto a valores PIC comparados con cualquier otro marcador de ADN (Liu y Cordes, 2004).

El polimorfismo de los microsatélites se basa en el tamaño de las secuencias debido a variaciones en el número de unidades repetidas contenidas por los alelos en un locus específico. La tasa de mutación reportada por generación es de 10^{-2} eventos por locus por replicación en *Escherichia coli*; de entre 10^{-4} y 10^{-5} en levaduras y de 10^{-3} a 10^{-4} en ratones y se cree que ésta es causada por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN, lo que da como resultado diferencias en el número de unidades repetidas. A pesar de los mecanismos específicos, cambios en el número de unidades repetidas pueden dar lugar a un gran número de alelos a cada locus de microsatélite en la población (Goldstein y Schlötterer, 1999).

Los microsatélites han sido utilizados ampliamente en investigaciones acuícolas, incluyendo estudios de mapas genómicos, de parentescos y de estructura familiar. Varios estudios han demostrado la posibilidad de utilizar los

microsatélites para determinar paternidad (Cuadro 1), analizar pedigrís e identificar especies (Herbinger *et al.*, 1999; Hara y Sekino, 2003; Dong *et al.*, 2006; Jerry *et al.*, 2006). También se han utilizado como herramienta importante en la evaluación de la variación genética (Xu *et al.*, 2001; Vela, 2008), y estrategias de mejoramiento genético (Hayes *et al.*, 2006; Jerry *et al.*, 2004). Adicionalmente, estos marcadores ofrecen nuevas perspectivas para estudios de subestructuras de poblaciones estrechamente relacionadas, muestras de poblaciones de una reducida escala geográfica y poblaciones de camarones silvestres (Xu *et al.*, 2001).

Se puede lograr un incremento significativo en el número de muestras por día si se utilizan secuenciadores automáticos en el análisis de los microsatélites, marcando uno de los iniciadores con un fluoróforo que emite una coloración específica y que permite identificar los alelos del microsatélite con precisión (Goldstein y Schlötterer, 1999). La conservación de las regiones que flanquean al microsatélite permite la amplificación interespecífica (Castro *et al.*, 2007) y el uso de PCR multiplex, lo que significa la amplificación simultánea de múltiples loci con una sola muestra de ADN en una simple reacción de PCR (Navarro *et al.*, 2008).

1.3.1 Generación de Microsatélites

Los microsatélites pueden ser generados a partir de marcadores de secuencias expresadas. Pérez *et al.* (2005), descargaron 5,832 ESTs de *L. vannamei* de Marine Genomics repository, realizaron búsquedas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) por medio de Bioedit Sequence Alignment Editor v 7.0.1 y después de usar un software llamado TRF (Tandem Repeats Finder), obtuvieron 475 repeticiones tipo microsatélite; de estas secuencias se eliminaron 191 repeticiones que corresponden a colas poli(A) o a que las repeticiones se encontraban al inicio o al final de la secuencia lo que excluía el diseño de iniciadores. De un total de 284 secuencias que contenían 89 repeticiones diferentes fueron aisladas. Las repeticiones más frecuentes fueron trinucleótidos, mononucleótidos y

dinucleótidos, en ese orden. En este estudio, las repeticiones tipo microsatélite tuvieron una frecuencia de una SSR cada 40.1 kb y al genotipificar peneidos, el 56% de los productos amplificados (de un total de 59 productos) presentaron entre 2 y 9 alelos.

Cui *et al.* (2005) obtuvieron el genoma completo del pez globo (*T. rubripes*) de DNA Databank Japan (DDBJ), y encontraron 49,647 secuencias simples repetidas. Las SSR con valor de 100 fueron identificadas y caracterizadas utilizando TRF. Los tipos de SSR más frecuentes fueron di-, tetra-, tri-, penta-, exa- y mononucleotida (en ese orden). De estas SSR, las 20 más frecuentes representaron el 98.1% del total, con 5 a 25 alelos por locus.

En un estudio realizado por Wuthisuthimethavee *et al.* (2003) nueve secuencias repetidas sintetizadas y marcadas con biotina fueron hechas para una biblioteca de microsatélites en el camarón tigre negro (*Penaeus monodon* Fabricius). El ADN genómico de estos organismos fue parcialmente digerido con una mezcla de cuatro enzimas de restricción (*EcoRV*, *DraI*, *HaeIII* y *SmaI*). Los productos digeridos fueron separados en gel de agarosa y los fragmentos de 300-1000 pb fueron recuperados en una membrana NA 45 DEAE e insertados en *E. coli* y después desnaturalizados y rehibridizados en presencia de cantidades iguales de nueve oligonucleótidos biotinizados. Después, los fragmentos de ADN complementario (ADNc) a los microsatélites fueron recuperados magnéticamente y amplificados por PCR. Los fragmentos amplificados fueron cortados con *EcoRI* e insertados en el plásmido pBLUESCRIPT SK; al final, los plásmidos ligados fueron electroporados en *Escherichia coli* XL, seleccionados por su resistencia a ampicilina, aislados y caracterizados.

1.3.2 Uso de Microsatélites en análisis de paternidad

Con la aparición de marcadores genéticos eficaces y el surgimiento de software con programas matemáticos para calcular parentescos es posible analizar relaciones genéticas y herencia en sistemas acuícolas (Norris *et al.*, 2000; Hara and Sekino, 2003; Jerry *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008). Los microsatélites son los marcadores moleculares más utilizados en asignaciones de paternidad, ya que el número de alelos y los elevados niveles de polimorfismo detectable presentado por los microsatélites permiten obtener exitosamente genotipos únicos para cada individuo Liu y Cordes, 2004).

Norris *et al.* (2000) demostraron que se puede determinar la paternidad y las relaciones de parentesco en 10 familias de salmones mezcladas en el mismo estanque, en ausencia de identificaciones físicas (elastómeros) y/o información de pedigrí. Usando 8 microsatélites se asignaron ambos padres correctamente a su progenie con un 95% de confiabilidad. Estos mismos microsatélites fueron capaces de discriminar con la misma precisión (95%) entre individuos relacionados y no relacionados con pedigrí desconocido. En el cuadro 1 se presentan algunos estudios en sistemas acuícolas que utilizaron los microsatélites en la determinación de paternidad.

La capacidad de tener identificación de un gran número de individuos y familias es clave para tener una elevada confiabilidad en programas de mejoramiento genético, incluyendo la capacidad de cuantificar interacciones entre genotipos y su ambiente. Muchos programas de mejoramiento genético en camarones se han basado en una mezcla de selección masal con selección familiar fenotípica, pero en ésta y otras especies altamente prolíficas, el número de animales que pueden ser físicamente elastomerizados (identificados) y seleccionados individualmente es restringido (Jerry *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Trabajos realizados que utilizan microsatélites en la determinación de paternidad

Autor	Especie	STR utilizados	Precisión en la asignación	Familias	Padres	Indiv. totales
Norris <i>et al.</i> 2000	Salmón (<i>Salomé salar</i>)	8	95%	10 2 ½ hermanos	10 ♀ 2 ♂	25 3 x fam.
Hara y Sekino 2003	Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	17	*	6	6 ♀ 8 ♂	169 28 x fam.
Jerry <i>et al.</i> 2004	Camarón (<i>P. Japonicus</i>)	6	47%	22	22 ♀ 168 ♂	110 nauplios 5 x fam.
Dong <i>et al.</i> 2006	Camarón (<i>F. chinensis</i>)	4-5	95-97%	6 2 ½ hermanos	5 ♀ 6 ♂	198 nauplios 20 x fam.
Castro <i>et al.</i> 2007	Gilthead seabream (<i>Spaurus aurata</i>)	5	93%	*	159	996 larvas
Navarro <i>et al.</i> , 2008	Gilthead seabream (<i>Sparus auratus</i> L.)	17	100%		66 padres	148
	Red porgy (<i>Pagrus pagrus</i> L.)	12	*	*		*
	Redbanded seabream (<i>P. auriga</i> , <i>Valenciennes</i>)	13	*			*

* Sin datos

El uso de ADN en análisis de paternidad como marcador biológico tiene el potencial de superar muchas de las limitaciones impuestas por las identificaciones convencionales ya que es menos invasiva, retrospectiva y al aplicarla después de la fase de crecimiento los animales pueden ser evaluados. Otra ventaja es que al mismo tiempo que la progenie se asigna, los padres pueden ser utilizados para estimar relaciones genéticas entre los individuos (Jerry *et al.*, 2004). El mayor beneficio del uso de ADN en los programas de mejoramiento es que las familias pueden ser criadas comunalmente minimizando así la confusión de los efectos genéticos y ambientales (Herbinger *et al.*, 1999).

1.3.3 Probabilidad de exclusión en asignación de paternidad

Cervus (Marshall *et al.*, 1998) es un programa que evalúa la factibilidad de asignar la paternidad basado en las reglas mendelianas usando las frecuencias alélicas de la población en cuestión. La probabilidad promedio de exclusión se define como la probabilidad promedio de excluir a un individuo cualquiera no relacionado como padre de un descendiente dado. Por ejemplo, si se considera un locus autosómico neutral con dos alelos A y B en una población bajo equilibrio Hardy-Weinberg, para un descendiente AA, una exclusión ocurre si el padre candidato no es AA o cualquiera de los heterocigotos $k-1$ (AX). Para un descendiente heterocigoto AB, una exclusión ocurre si el padre candidato no es AA, BB o cualquiera de los heterocigotos $k-1$ AX o BX. El padre heterocigótico AB es candidato cuando existen grupos de descendientes con genotipos AX o BX (Jamieson, 1994). El programa calcula la probabilidad de no exclusión promedio para un padre candidato, la probabilidad de no exclusión cuando se conoce el genotipo del otro progenitor y la probabilidad de no exclusión del par de padres candidatos. Los genotipos de los padres candidatos se comparan con el genotipo de cada descendiente de tal manera que aquellos que presenten una o más incongruencias mendelianas son excluidos como padres (Marshall *et al.*, 1998).

Las probabilidades de exclusión para cada locus (P_{excl1}) y probabilidad de exclusión combinada (P_{excl2}) se pueden determinar a partir de las frecuencias alélicas de los loci presentes en la población según Jamieson y Taylor (1997) como:

$$P_{excl1} = 1 - 4 \sum_{i=1}^n P_i^2 + 2 \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right)^2 + 4 \sum_{i=1}^n P_i^3 - 3 \sum_{i=1}^n P_i^4$$

Donde P_i es la frecuencia del alelo i .

$$P_{excl2} = 1 - (1 - P_1)(1 - P_2)(1 - P_3) \cdots (1 - P_k)$$

Donde P es la probabilidad de exclusión de k loci.

El contenido de información polimórfica (PIC, Botstein *et al.*, 1980) para cada marcador, se calculó como:

$$PIC = 1 - \sum_i P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

Donde P_i y P_j son las frecuencias del alelo i y j en un locus específico.

La asignación por verosimilitud permite asignar paternidades cuando existen varios progenitores que no pueden ser excluidos en función de incongruencias mendelianas. CERVUS calcula la verosimilitud para inferencia de paternidad y establece valores LOD para el candidato más probable mediante un módulo de simulación (LOD es la probabilidad de paternidad de un macho particular en relación con la probabilidad de paternidad de cualquier otro macho), cuando LOD=0 la probabilidad de paternidad del candidato es igual a la de cualquier individuo tomado a azar, si LOD>0 esta probabilidad aumenta (Marshall *et al.*, 1998).

Jerry *et al.* (2004) evaluaron el potencial de los microsatélites en la asignación de paternidad en camarón Kuruma (*Penaeus japonicus*) usando apareamientos controlados y simulados con el programa CERVUS v1.0 (Marshall *et al.*, 1998). Las simulaciones basadas en las frecuencias alélicas, indicaron que se requieren 9 loci para asignar correctamente ambos padres a la progenie con el 95% de confiabilidad, y 6 loci para asignar la madre a la progenie con un 92% de confiabilidad; sin embargo, al realizar el experimento sólo el 47% de la progenie fue asignada correctamente a la madre, hecho que los autores atribuyen a la calidad del ADN amplificable de la progenie que no pudo ser completamente genotipificada con los 6 loci, al utilizar progenie en su primera fase de vida (nauplios) y a que 5 de los 6 loci no seguían equilibrio Hardy-Weinberg, lo que sugiere la presencia de alelos nulos.

1.3.4 Alelos nulos

Los alelos nulos (también llamados alelos silenciosos) son alelos no amplificados usualmente causados por mutaciones puntuales en los sitios de alineación de los iniciadores (Calleng *et al.*, 1993). Si un alelo nulo se encuentra presente en un heterocigoto se puede tipificar erróneamente como homocigótico. Este error causa observaciones falsas sobre deficiencias de heterocigotos en la población y por lo tanto desequilibrio Hardy-Weinberg. La exclusión puede ser impráctica cuando se tiene un gran número de padres, ya que el número de loci necesario para excluirlos incrementa y bajo la exclusión estricta o la presencia de alelos nulos, un solo error al comparar los alelos puede conllevar a la eliminación errónea de animales como posibles progenitores, o errores en la asignación del grado de parentesco entre individuos (MacAvoy *et al.*, 2008). Los alelos silenciosos pueden ser detectados por asignaciones erróneas entre pares conocidos de madres e hijos y por desviaciones significantes en el equilibrio Hardy-Weinberg (Pemberton *et al.*, 1995).

Simulaciones basadas en datos de frecuencias alélicas de poblaciones de camarón chino (*Fenneropenaeus chinensis*) demuestran que se requieren 4 loci para asignar la paternidad al 95% de la progenie y 5 loci para asignarla al 97%. Cuando se combina los datos de 5 loci, la asignación de la progenie a sus verdaderos padres es del 92.9%. De un total de 215 hijos, el 90.7% fue asignado correctamente a ambos padres después de mezclar las familias. Los resultados obtenidos demuestran que el éxito de la asignación de la progenie con su verdadera madre y padre fue del 88% y 78% respectivamente, lo que es más bajo de lo predicho por la simulación; las discrepancias entre las simulaciones y los datos obtenidos se consideran en gran parte debido a las asignaciones erróneas en los alelos y a la presencia de alelos nulos en 3 de los 5 loci utilizados (Dong *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por MacAvoy *et al.* (2008), se utilizaron 49 microsatélites aislados de mejillones (*Perna canaliculus*) para asignación paternal. Se realizaron simulaciones (CERVUS v3.0; Kalinowski *et al.*, 2007) con el fin de estimar el número de loci requeridos para asignar la paternidad a la descendencia con un nivel determinado de confiabilidad. En este trabajo, se identificaron 10 loci polimórficos como aptos para asignación de paternidad. Las simulaciones predijeron un éxito mayor al 95% en la asignación a partir de los 5 loci con mayor PIC lo que coincidió con los resultados obtenidos a pesar de encontrar evidencia de alelos nulos.

Otra deficiencia de los microsatélites es la amplificación no específica (amplificación de productos secundarios de ADN debido a la unión no específica de iniciadores en la PCR), aunque muchos investigadores dominan el problema optimizando las condiciones de la PCR. La caracterización de genotipos con microsatélites trae complicaciones por la presencia de las llamadas bandas tartamudas (stutter o fantasmas). Dichas bandas son causadas por el deslizamiento de la polimerasa durante la amplificación por PCR, cuyos resultados son productos secundarios que contienen una o más unidades repetitivas menores

con respecto a la longitud del alelo original. Las bandas stutter a veces pueden ser igualmente intensas que las bandas primarias, haciendo difícil la precisión de la caracterización de los genotipos, particularmente en estudios poblacionales. En estudios poblacionales donde no se conoce la relación, la interpretación puede ser problemática (Lui and Cordes, 2004).

Las dificultades para amplificar los microsatélites y la probabilidad de alelos nulos para muchos de los loci son evidencia de que no todos los microsatélites son adecuados para incluirlos como marcadores en la determinación de parentesco (Jerry *et al.*, 2004).

1.3.5 Determinación de relaciones de parentesco y distancias genéticas usando microsatélites

En la crianza animal, el coeficiente de coancestría o parentesco es requerido para estimar parámetros genéticos y llevar a cabo evaluaciones genéticas (Falconer y Mackay, 1996). El coeficiente de coancestría de Malécot (1948) o parentesco genealógico (f_{xy}) calculado del pedigrí mide la probabilidad de identidad por descendencia (IBD) y se define como la probabilidad de que un alelo tomado al azar de un individuo X sea idéntico por descendencia a un alelo tomado al azar del individuo Y en un locus autosómico.

El valor de los marcadores moleculares y los registros de pedigrí por separado o en combinación han sido considerados en la optimización de programas de mejoramiento animal (Fernández *et al.*, 2005). La coancestría molecular o parentesco molecular (f_{ij}) es calculada únicamente con información de marcadores moleculares, hace referencia a la identidad por estado (IBS) (Falconer y Mackay, 1996; Malécot, 1948) y es relacionada con la mayoría de las distancias genéticas entre poblaciones (Eding y Meuwissen, 2001)

Molkin v3.0 es un programa computacional para análisis genético de poblaciones utilizando información de coancestría molecular (Gutierrez *et al.*, 2005) y puede determinar:

-El coeficiente de coancestría molecular (f_{ij}) entre dos individuos i y j , definido como la probabilidad de que dos alelos del mismo locus tomados al azar de dos individuos sean idénticos por estado se calcula como:

$$f_{ij} = 1/4[I_{11} + I_{12} + I_{21} + I_{22}]$$

Donde I_{xy} es 1 cuando el alelo x en el locus l en el individuo i y el alelo y en el mismo locus en el individuo j son idénticos (Caballero y Toro 2002; Eding y Meuwissen, 2001). El valor de la coancestría molecular puede tener sólo cuatro valores: 0, $1/4$, $1/2$ y 1. Este parámetro se puede obtener promediando L loci como:

$$f_{ij} = \frac{\sum_{l=1}^L f_{ij,l}}{L}$$

- La distancia Kinship (D_k) entre dos individuos i y j se calcula como:

$$D_k = ([S_i + S_j]/2) - f_{ij}$$

Donde S_i es la coancestría molecular de un individuo consigo mismo y S_j hace referencia al resto de la población (Caballero y Toro, 2000).

- A nivel poblacional, los estadísticos F de Wright's, F_{IS} , F_{ST} , y F_{IT} , definidos respectivamente como la deficiencia de heterocigotos dentro de la población, la deficiencia de heterocigotos debido a la subdivisión de la población y la deficiencia de heterocigotos en la población total son obtenidos como:

$$F_{IS} = \frac{\bar{F} - \bar{f}}{1 - \bar{f}}$$

$$F_{ST} = \frac{\bar{f} - \bar{f}}{1 - \bar{f}}$$

$$F_{IT} = \frac{\bar{F} - \bar{f}}{1 - \bar{f}}$$

Donde \bar{f} , \bar{F} son respectivamente la media del coeficiente de coancestría y de consanguinidad para la población entera y \bar{f} el promedio de coancestría para la subpoblación (Caballero y Toro, 2002). Hay que destacar que \bar{F} no es la misma que la consanguinidad genealógica, definida como la probabilidad de que un individuo tenga dos alelos idénticos por descendencia pero, la homocigocidad se refiere a la identidad por estado.

2. JUSTIFICACIÓN

En otras especies acuícolas, incluyendo otras especies de camarones, se han determinado paternidades para la construcción de pedigríes y relaciones genéticas, pero no se han realizado estudios de este tipo en el camarón blanco del Pacífico. Las técnicas moleculares como los microsatélites, tienen ventajas en cuanto a la evaluación genética de los animales, en el manejo en etapas tempranas en programas de selección y en el mantenimiento de la variabilidad genética en poblaciones mejoradas; adicionalmente, al ir disminuyendo el costo de estas tecnologías, es probable que en el futuro se puedan usar en los programas de mejora genética de camarones. Los motivos anteriores indican la importancia de realizar estudios que permitan conocer las potencialidades de estas metodologías en la determinación de paternidades y relaciones genéticas en el camarón blanco del Pacífico.

3. OBJETIVOS

1. El objetivo del presente estudio fue determinar la precisión en la asignación de la paternidad de una población seleccionada de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*), perteneciente a la empresa Maricultura del Pacífico S.A. de C.V. usando microsatélites.
2. Evaluar el uso de estos marcadores genéticos en la estimación de las relaciones y distancias genéticas dentro de una población seleccionada de camarón cultivado, individuos de familias de una línea distinta e individuos silvestres.

4. HIPÓTESIS

1. La asignación de paternidad utilizando microsatélites puede ser realizada con una precisión determinada.

2. Existen una correlación positiva entre la coancestría genealógica y la coancestría molecular (calculada a partir de microsatélites) en poblaciones de camarón cultivado.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales y muestras

De una línea de un núcleo genético comercial de camarones seleccionados para crecimiento y supervivencia se utilizaron camarones descendientes de la cruce de 26 camarones machos y 41 hembras en etapa reproductiva (en la que originalmente cada macho fue apareado con dos hembras) sexualmente maduros y con un peso de alrededor de 45 g. Se obtuvo una muestra de 3 descendientes por familia (41 familias producto de cada apareamiento) y se colectaron muestras de pleópodos de los padres que luego de ser identificadas se conservaron en alcohol al 70% según el protocolo de Lightner (1996). Todos los animales con pedigrí conocido, se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas y se obtuvieron del laboratorio de producción de larvas de Maricultura del Pacífico, S.A. de C.V. ubicado en Rosario, Sinaloa.

También se obtuvieron muestras de individuos con pedigrí conocido de una línea independiente de camarones (TEC) cultivados por esta misma empresa que de la misma manera se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas; para esta línea, se tomaron 70 individuos completos y de igual modo se identificaron y conservaron en alcohol al 70%. Todas las muestras se enviaron al laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM.

5.2 Elección de loci

A partir de las frecuencias alélicas de los loci presentes en la población G07 reportados por Vela (2008), se determinó la probabilidad de exclusión para cada locus (P_{excl1}) y la probabilidad de exclusión combinada (P_{excl2}) (Jamieson and Taylor, 1997).

5.3 Extracción de ADN y Genotipificación

El ADN genómico total para el análisis de microsatélites se extrajo del tejido muscular de los padres y de su progenie, utilizando el protocolo DNeasy Tissue Kit. Cada una de las extracciones fue cuantificada mediante espectrofotometría, además de electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Para la genotipificación se realizaron diluciones con el fin de obtener concentraciones de 8 a 12 ng/μl de ADN en todas las muestras. Posteriormente, se realizaron las amplificaciones de los microsatélites en multiplex con el kit Qiagen Multiplex PCR el cual es un kit específico para la optimización de reacciones en multiplex en un termociclador 9700 (Applied Biosystems®), siguiendo los protocolos establecidos por Vela (2008). En el cuadro 2 se muestran los 26 microsatélites en seis grupos multiplex que fueron considerados en la evaluación basada en su poder de exclusión para su posterior uso en la determinación de paternidad. Para comprobar la amplificación de los iniciadores marcados, se realizó visualización mediante geles de agarosa al 3%.

Los productos de PCR se llevaron a resolver mediante electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, capaz de distinguir entre los diferentes fluoróforos con los que fueron marcados los iniciadores. Los electroferogramas resultantes fueron analizados usando el software GeneMapper V3.7 (Applied Biosystems®) para realizar la asignación de alelos y obtener los genotipos de cada individuo.

5.4 Análisis de frecuencias alélicas

Una vez obtenidos los genotipos, se realizó un análisis de frecuencias alélicas con CERVUS v3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007), el cual calcula la frecuencia de cada alelo para cada locus en la población, incluyendo pruebas de equilibrio Hardy-Weinberg, heterocigosidad esperada, heterocigosidad observada, contenido

de información polimórfica (PIC), frecuencia teórica de alelos nulos y las probabilidades de exclusión para el par de padres.

Cuadro 2. Detalle de los microsatélites usados en este estudio

Locus	MgCl ₂ mM	No. Alelos	Heterozigosidad esperada	Temp. de alineación (°C)	Grupo
CNM-MG 479 ^a	2	12	0.85	43	LvMG1
CNM-MG 421 ^a	2	4	0.24	43	
CNM-MG 356 ^a	2	4	0.55	43	
CNM-MG 339 ^a	2	9	0.86	43	
CNM-MG 412 ^a	2	5	0.50	43	
CNM-MG 387 ^a	2	4	0.70	43	
CNM-MG 351 ^a	2	15	0.92	43	LvMG2
CNM-MG 390 ^a	2	5	0.53	43	
CNM-MG 364 ^a	2	7	0.75	43	
CNM-MG 384 ^a	2	9	0.87	43	
CNM-MG 386 ^a	2	4	0.33	43	
CNM-MG 369 ^a	2	7	0.78	43	LvMG3-1
CNM-MG 430 ^a	2	13	0.89	43	
Lvan 07 ^b	1.5	12	0.89	53	
CNM-MG 487 ^a	2	7	0.80	43	LvMG3-2
CNM-MG 496 ^a	2	5	0.68	43	
HLJN-030 ^c	1.5	10	0.78	66.5	
CNM-MG 507 ^a	2	4	0.54	43	
CNM-MG 354 ^a	2	10	0.84	43	LvMG4-1
CNM-MG 362 ^a	2	21	0.94	43	
CNM-MG 380 ^a	2	7	0.76	43	
CNM-MG 371 ^a	2	10	0.86	43	
CNM-MG 416 ^a	2	7	0.80	43	LvMG4-2
Lvan 01 ^b	1.5	6	0.71	53	
Pvan 1758 ^d	1.5	14	0.72	55	
HLJN-004 ^c	1.5	7	0.81	58	

He: Heterozigosidad esperada, a: Pérez *et al.* (2005), b: Freitas *et al.* (2007), c: Zhi-Ying *et al.* (2006), d: Cruz *et al.* (2006).

5.5 Asignación de paternidad

Para asignar las paternidades a los individuos de la progenie se utilizó el programa CERVUS (Kalinowski *et al.*, 2007) que establece un logaritmo de razón de verosimilitud (LOD) para el candidato más probable mediante un módulo de simulación. Los criterios para la elección de los loci a utilizar en la asignación de paternidad, después de realizadas las amplificaciones, fueron que cada locus cubriera con el requisito de mantenerse en equilibrio Hardy-Weinberg, y que hubiera amplificado al menos 5 alelos. Se evaluó la precisión del uso de los microsatélites en la asignación de paternidad como el porcentaje de asignaciones correctas.

5.6 Determinación de relaciones de parentesco y distancias genéticas usando microsatélites

Para probar la hipótesis de relaciones específicas de pedigrí dada la frecuencia de alelos en la población, se realizó la estimación de las relaciones genéticas con el programa Molkin según Gutiérrez *et al.* (2005) en una población seleccionada de camarón cultivado, en individuos de familias de una línea independiente y en individuos silvestres.

5.7 Correlaciones

Finalmente el coeficiente de Correlación de Pearson entre los valores de coancestría molecular y genealógica fueron realizados mediante el programa computacional SPSS v13 para la población de camarones cultivados en la que se contaba con el pedigrí de 5 generaciones.

6. RESULTADOS

6.1 Elección de loci

El número de alelos por locus en los grupos de microsatélites a elegir fue de 2 a 18 (Cuadro 3). La probabilidad de exclusión por locus fue de 0.0170 al 0.4256, encontrándose los valores más bajos en los loci CNMMG 390 y CNMMG 386 que cuentan con dos alelos cada uno; y el porcentaje de exclusión más elevado se obtuvo del locus CNMMG 430 que tiene 11 alelos. En cuanto al Contenido de Información Polimórfica para cada locus que también está relacionado con el poder de exclusión, los valores fueron de 0.184 a 0.814. Los grupos de microsatélites LvMG1, LvMG3 y LvMG5 fueron elegidos para realizar las genotipificaciones por ser los grupos que cuentan con más alelos y por lo tanto con una mayor probabilidad de exclusión combinada (97.98%).

6.2 Análisis de frecuencias alélicas

Un total de 268 individuos fueron genotipificados, incluyendo 41 madres y 26 padres candidatos, 131 descendientes y 70 individuos de la línea independiente (TEC). Los resultados del análisis de frecuencias alélicas realizado se muestran en el cuadro 4. El número de alelos (k) detectados de los 13 microsatélites elegidos fue de 1 a 17 con 6.38 en promedio. La heterocigosidad esperada (HE_{Exp}) y contenido de información polimórfica (PIC) promedio fueron 0.4852 y 0.4527 respectivamente. El locus CNMMG 371 sólo fue identificado en un individuo homocigótico y el locus CNMMG 421 a pesar de estar presente en casi todos los individuos genotipificados, demuestra ausencia total de heterocigotos; otros dos loci (Lvan 07 y CNMMG 354) presentaron deficiencias de heterocigotos y por lo tanto desequilibrio Hardy-Weinberg.

Cuadro 3. Número de alelos, probabilidad de exclusión (Pexcl1), Contenido de Información Polimórfica (PIC) y probabilidad de exclusión acumulada (Pexcl2)

Multiplex	Loci	No. Alelos	Pexcl1	Pexcl2	PIC
LvMG1	CNMMG339 ^b	18 ^b	0.3609	0.36087	0.740
	CNMMG479	13	0.3897	0.60997	0.763
	CNMMG421	5	0.0258	0.62003	0.552
	CNMMG356	9	0.1614	0.68136	0.721
	CNMMG412	7	0.0724	0.70443	0.375
	CNMMG387	8	0.3105	0.79621	0.225
LvMG3	CNMMG369 ^c	10	0.2334	0.84377	0.814 ^c
	CNMMG430 ^d	11	0.4631 ^d	0.91613	0.621
	Lvan07	8	0.3496	0.94545	0.737
LvMG5	CNMMG354	5	0.0980	0.95080	0.437
	CNMMG362	11	0.3106	0.96608	0.720
	CNMMG380	6	0.2419	0.97429	0.656
	CNMMG371	6	0.2176	0.97988 [‡]	0.629
LvMG2	CNMMG351	7	0.2028	0.98396	0.788
	CNMMG390	2	0.0403	0.98461	0.599
	CNMMG364	4	0.2208	0.98801	0.660
	CNMMG384	11	0.4256	0.99311	0.284
	CNMMG386 ^a	2 ^a	0.0170 ^a	0.99323	0.184 ^a
LvMG6	CNMMG416	7	0.3348	0.99550	0.742
	Lvan01	3	0.1332	0.99610	0.516
	Pvan1758	9	0.3806	0.99758	0.765
	HLJN004	3	0.1270	0.99789	0.504
LvMG4	CNMMG487	4	0.1391	0.99818	0.522
	CNMMG496	6	0.1622	0.99848	0.562
	HLJN-030	7	0.0548	0.99856	0.322
	CNMMG507	4	0.1178	0.998730	0.483

[‡] Probabilidad de exclusión combinada de los multiplex elegidos (LvMG1, LvMg3 y LvMG5)

^a Marcador con valores más bajos de alelos, Pexcl1 y PIC

^b Marcador con mayor número de alelos

^c Marcador con valor más elevado de PIC

^d Marcador con valor más elevado de Pexcl1

Cuadro 4. Número de alelos (k), número de individuos (n), número de heterocigotos (Het), número de homocigotos (Hom), Heterocigosidad observada (HObs), heterocigosidad esperada (HExp), contenido de información polimórfica (PIC) y frecuencia de alelos nulos (F null)

Locus	k	n	Het	Hom	HObs	HExp	PIC	HW	F (Null)
CNMMG 339	9	243	169	74	0.695	0.766	0.729	***	+0.0466
CNMMG 356	9	207	66	171	0.319	0.554	0.466	***	+0.2688
CNMMG 387	5	202	71	137	0.351	0.654	0.584	***	+0.2969
CNMMG 412	4	253	67	186	0.265	0.266	0.239	NS	+0.0108
CNMMG 421	1	258	0	258	0.000	0.000	0.000	ND	ND
CNMMG 479	8	258	193	65	0.748	0.703	0.670	NS	-0.0416
CNMMG 369	17	247	238	9	0.964	0.879	0.865	*	-0.0497
CNMMG 430	7	152	80	72	0.526	0.696	0.649	***	+0.1432
Lvan 07	4	35	5	30	0.143	0.188	0.179	ND	+0.1198
CNMMG 354	5	252	44	208	0.175	0.171	0.166	ND	+0.0236
CNMMG 362	7	244	192	52	0.787	0.686	0.632	**	-0.0816
CNMMG 371	1	1	0	1	0.000	0.000	0.000	ND	ND
CNMMG 380	6	245	190	55	0.776	0.745	0.706	***	-0.0198

HW= Significancia de la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg. *** = significativo al 0.1%, . ** = significativo al 0.01%, . * = significativo al 0.001%, NS= no significativo, ND= No realizado

6.3 Asignación de paternidad

Los microsatélites que presentaron problemas de amplificación (CNMMG 371 con un solo alelo y Lvan 07 que sólo amplificó en 35 de 268 muestras) así como los locus deficientes de heterocigotos (CNMMG 421, Lvan 07 y CNMMG 354) fueron eliminados de la asignación de paternidad. Un quinto locus (CNMMG 412) fue eliminado por haber amplificado sólo 4 alelos.

El éxito de la asignación de la progenie con su verdadera madre fue menor a lo predicho por las simulaciones (cuadro 5), con el 70.73% de asignaciones correctas, mientras que las asignaciones de la progenie con su verdadero padre fueron correctas en un 80.48%; sin embargo, el porcentaje de asignaciones

correctas para ambos padres fue del 60.16%. Al utilizar sólo los 4 microsatélites más polimórficos y que presentaron una menor frecuencia de alelos nulos el éxito en la asignación correcta para padre, madre y par de padres fue de 64.12%, 40.46% y 31.30% respectivamente.

Cuadro 5. Porcentaje de asignaciones correctas de la progenie para ambos padres.

Número de loci	Madre	Padre	Ambos padres
8	70.73	80.48	60.16
4 más polimórficos	40.46	64.12	31.30
4 menos polimórficos	22.90	29.77	10.69

6.4 Determinación de relaciones genéticas

Al realizar la estimación de relaciones con el programa Molkin (cuadro 6), se obtuvieron los datos de la coancestría promedio dentro de las poblaciones, el promedio de la distancia Kinship y los estadísticos F de Wright tomando en cuenta la población seleccionada de camarón cultivado, la población de la línea independiente y los individuos silvestres.

Cuadro 6. Estadísticas de los coeficientes de coancestría genealógica

Coefficiente o estimador	Cultivados	Tec	Silvestres	Cultivados/Tec/Silvestres
Coancestría genealógica	0.0666			
Coancestría molecular	0.287558	0.261444	0.167978	0.261827
Consanguinidad	0.319402	0.325986	0.429233	0.339252
Distancia kinship	0.372143	0.00000	0.546639	0.407799
Distancia de alelos compartidos	0.595419	0.639304	0.780622	0.718211
Fis	0.044697	0.087390	0.314000	0.104887
Fst	0.000000	0.000000	0.000000	0.074747
Fit	0.044697	0.401549	0.314000	0.171795

Los resultados de los estadísticos F de Wright, entre poblaciones se muestran en los cuadros 7, 8 y 9 e indican una mayor distancia entre la población de camarones silvestres con respecto a las poblaciones de camarones cultivados y del Tec.

Cuadro 7. Fis Deficiencia de heterocigotos dentro de la población

	Cultivados	Tec	Silvestres
Cultivados			
Tec	0.056147		
Silvestres	0.109751	0.192757	

Cuadro 8. FST Deficiencia de heterocigotos debido a la subdivisión de la población.

	Cultivados	Tec	Silvestres
Cultivados			
Tec	0.008637		
Silvestres	0.084145	0.106407	

Cuadro 9. FIT Deficiencia de heterocigotos en la población total.

	Cultivados	Tec	Silvestres
Cultivados			
Tec	0.064299		
Silvestres	0.184661	0.278653	

El coeficiente de correlación de Pearson entre la coancestría genealógica y la coancestría molecular para la población del núcleo genético fue de 0.031 ($p=0.016$) lo que indica que únicamente el 9.6 % de la variabilidad de ambas coancestrías es común, y revela que el método molecular no estima adecuadamente la coancestría.

7. DISCUSIÓN

Cuando se manejan programas de mejoramiento genético, en especies altamente prolíficas como es el caso, es importante mantener la información de las relaciones genealógicas entre individuos de múltiples generaciones (Jerry *et al.*, 2004), así como tener en cuenta la necesidad de mantener un balance de la ganancia genética a corto y largo plazo y la necesidad de mantener a largo plazo la viabilidad de un programa de selección (Ponzoni *et al.*, 2010). Convencionalmente, se han utilizado implantes físicos como los elastómeros en el camarón blanco del Pacífico para marcar individuos y familias (Caceci *et al.*, 1999; Godin *et al.*, 1996). El uso de marcadores genéticos eficaces en sistemas acuícolas se ha ido implementando con el paso del tiempo (Norris *et al.*, 2000; Hara y Sekino, 2003; Jerry *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008). Los microsatélites son los marcadores moleculares más utilizados en asignaciones de paternidad, ya que el número de alelos y elevados niveles de polimorfismo detectable presentado por los microsatélites permiten obtener exitosamente genotipos únicos para cada individuo (Liu y Cordes, 2004).

La asignación de paternidad trata de reconstruir patrones de parentesco entre los diferentes individuos de una población e incluye algún grado de error. La exclusión de paternidad, se basa en reglas de herencia mendeliana y se utilizan las incompatibilidades entre padres y progenie para rechazar hipótesis particulares de parentesco y, en teoría se pueden definir y asignar al par de padres para cada individuo de la progenie, especialmente en condiciones donde son pocos los padres potenciales y se tienen marcadores altamente polimórficos (Golubov y Ortega, 2007).

La probabilidad promedio de exclusión tiene una elevada correlación con el número de alelos por locus, entre más alelos se encuentren presentes, mayor será la probabilidad de exclusión para el marcador en cuestión (Marshall *et al.*, 1998); este cálculo se realiza con el fin de ir eliminando loci que pueden acarrear futuras

complicaciones en la asignación de paternidad. La probabilidad promedio de exclusión combinada, es la representación de las probabilidades promedio de exclusión de todos los marcadores a considerar, motivo por el cual el primer filtro en la elección de los loci a utilizar en la asignación de paternidad es precisamente esta probabilidad; no obstante, la probabilidad de exclusión combinada, supone que todos los individuos están completamente genotipificados, por lo tanto, la probabilidad real de exclusión no puede ser substancialmente alta si faltan genotipos. Otros autores (Castro *et al.*, 2007, Navarro *et al.*, 2008) han realizado asignaciones de paternidad con un gran éxito debido al poder de exclusión de sus marcadores y por lo tanto al elevado número de alelos por locus (>10), mientras que el poder de exclusión de los marcadores utilizados en este estudio se vio mermado por la presencia de alelos nulos.

En la realización de este trabajo se encontraron dificultades en la genotipificación de todos los individuos. Una vez realizada la genotipificación, se decidió utilizar sólo 8 loci en la asignación de paternidad debido a que al realizar un análisis de los datos obtenidos se encontró presencia de alelos nulos (Calleng *et al.*, 1993) o no amplificados, lo cual puede llevar a la eliminación errónea de individuos como posibles progenitores y errores en la asignación de parentescos. De modo que estos loci fueron eliminados.

El uso de marcadores genéticos eficaces ha propiciado el surgimiento de software con programas matemáticos para asignar paternidades, calcular parentescos, analizar relaciones genéticas y herencia en sistemas acuícolas (Norris *et al.*, 2000; Hara y Sekino, 2003; Jerry *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008).

La asignación por máxima verosimilitud permite asignar paternidades cuando existen varios progenitores que no pueden ser excluidos en función de incongruencias mendelianas. CERVUS calcula la máxima verosimilitud para inferencia de paternidad y establece valores LOD para el candidato más probable

mediante un módulo de simulación. La precisión en la asignación de paternidad depende del número y variabilidad de microsatélites, y del número de posibles parejas de padres a elegir. Entre más familias se tengan en un programa genético, se requieren más microsatélites (Marshall *et al.*, 1998). En este caso la precisión en la asignación de paternidades fue del 70.73% para la madre correcta, 80.48% para el padre correcto y 60.16% para el par de padres correctos lo cual coincide con los porcentajes obtenidos en un estudio realizado en camarón Kuruma (*Penaeus (marsupenaeus) japonicus*) por Jerry *et al.* (2004).

La información genealógica provee potencialmente una herramienta muy poderosa en el mantenimiento de la diversidad genética y niveles bajos de consanguinidad, minimizando la coancestría global del pedigrí al menos por un periodo de tiempo considerado (10 generaciones). El uso exclusivo de información de marcadores provee valores limitados para el mantenimiento de la diversidad genética. El valor y grado de polimorfismo de los marcadores a ser usados en el parentesco molecular tienen que ser muy elevados para imitar el comportamiento del parentesco genealógico apoyándose en la estrategia a corto plazo y permanecer moderado a largo plazo especialmente para genomas grandes (Fernández *et al.*, 2005).

Minimizar la coancestría es el método más efectivo de mantener la diversidad genética cuando el pedigrí completo es conocido. Cuando el origen de los individuos es desconocido o existen incertidumbres en cuanto a su ancestría, la eficiencia del método es disminuida y pueden seguirse varios procesos. El más clásico es suponer que estos individuos son los fundadores. Otra posibilidad es ignorarlos o considerar sólo la parte conocida de sus genomas (Caballero y Toro, 2000).

Los resultados F_{ST} entre poblaciones de este estudio coinciden con el trabajo realizado por Vela (2008) e indican que las poblaciones de camarón cultivado

presentan distancias menores entre ellas que cuando se comparan contra la población silvestre.

La ventaja de incluir información molecular es elevada cuando la información disponible incluye un número considerable de progenitores y descendientes; cuando mas descendientes pueden ser generados y genotipificados, esta ventaja puede ser mayor, especialmente cuando se combina con datos genealógicos en especies con genomas pequeños. Sin embargo, en situaciones reales (especies con grandes genomas y limitado número de marcadores disponibles) probablemente sea más eficiente una fuente disponible de ampliación de la población o un mejor control del pedigrí y el uso restringido de marcadores más específicos para resolver las incertidumbres del pedigrí (Fernández *et al.*, 2005). No obstante, ni la información genealógica ni la molecular por sí solas son suficientes para monitorear poblaciones pequeñas cuando el pedigrí es poco profundo (Álvarez *et al.*, 2007).

En cuanto al camarón blanco del Pacífico (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*) se han realizado trabajos de estimación de heredabilidad del peso corporal en múltiples ambientes (Castillo *et al.*, 2007), se han generado algunos marcadores de tipo microsatélite (Freitas *et al.*, 2007; Zhi-Ying *et al.*, 2006, Pérez *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2002) y se han realizado mas estudios sobre variabilidad genética (Vela, 2008, Valles-Jimenez *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2002; Wolfus *et al.*, 1997), no obstante no existen trabajos de determinación de paternidad y relaciones genéticas en esta especie de camarones.

Sería de gran utilidad realizar estudios de este mismo tipo en los que se incluyan un mayor número de microsatélites aprovechando la ventaja de que estos marcadores pueden ser amplificados en PCRs multiplex, lo cual permitirá reducir los costos económicos, el tiempo por reacción y optimizar los análisis de reconstrucción de genealogías y de variabilidad genética en poblaciones.

8. CONCLUSIONES

Los programas de mejoramiento genético de cualquier especie incluyen un proceso de selección de reproductores, lo que ocasiona que la variación genética disminuya paulatinamente. Un requisito primordial para el desarrollo de un programa de mejoramiento de especies acuícolas es mantener información confiable del pedigrí. La inferencia de paternidad usando marcadores altamente polimórficos y codominantes se ha utilizado en algunos programas de mejoramiento genético en acuicultura como una vía para establecer pedigríes.

Las técnicas moleculares como los microsatélites, tienen ventajas en cuanto a la evaluación genética de los animales, en el manejo en etapas tempranas en programas de selección y en el mantenimiento de la variabilidad genética en poblaciones mejoradas; adicionalmente, al ir disminuyendo el costo de estas tecnologías, es probable que en el futuro se puedan usar en los programas de mejora genética de camarones.

La reconstrucción de pedigríes a través de la asignación de paternidad incluye algún grado de error, razón por la que se calculan las probabilidades de exclusión con el fin de ir eliminando loci que pueden acarrear futuras complicaciones en la asignación de paternidad, sin embargo, el poder de exclusión de los marcadores utilizados en este estudio se vio mermado por la presencia de alelos nulos.

Con el uso de marcadores se han creado programas computacionales que permiten optimizar el tiempo en la asignación de paternidades y aumentar la precisión de las asignaciones. También se han desarrollado programas que permiten obtener coancestrías de poblaciones enteras a través de marcadores moleculares que después se pueden comparar con las coancestrías genealógicas cuando el pedigrí es conocido y la utilidad final es mantener la diversidad genética minimizando la coancestría; sin embargo ni la información genealógica ni la

molecular por sí solas son suficientes para monitorear poblaciones pequeñas cuando el pedigrí es poco profundo.

Finalmente, se puede concluir que la información molecular obtenida en este trabajo no es suficiente para ser incluida en un programa de mejoramiento genético debido al sesgo en la estimación de coancestría, a causa del tipo y número de microsatélites que se utilizaron.

9. LITERATURA CITADA

- Alvarez, I., Royo, L. J., Gutierrez, J. P., Fernandez, I., Arranz, J. J. and Goyache, F. 2007. Relationship between genealogical and microsatellite information characterizing looses of genetic variability: Empirical evidence from the rare Xalda sheep breed. *Livestock Science*. 111:204-212.
- Beaumont, A. R. and Hoare, K. 2003. Cap. 2 How can Genetic Variation be measured?. In: Beaumont, A. R. and Hoare, K. 2003. *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture*. Blackwell Science Ltd. University of Wales, Bangor, UK. pp 19.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, and Davis RW, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314– 331.
- Caballero, A. and Toro, M. A. 2000. Interrelations between effective population size and other pedigree tools for the management of conserved populations. *Genet. Res.* 75, 331-343
- Caballero, A. and Toro, M. A. 2002. Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conserv. Gen.* 3:289-299.
- Caceci, T., Smith, S. A., Toth, T. E., Duncan, R. B. and Walker, S. C. 1999. Identification of individual prawns with implanted microchip transponders. *Aquaculture*. 180,41-51
- Calleng, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Phillips, H. A., Richards, R. I., Mulley, J. C. and Sutherland, G. R. 1993. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am. J. Genet.* 52, 92-927.
- Castro, J., Pino, A., Hermida, M., Bouza, C., Chavarrías, D., Merino, P., Sanchez, L. and Martínez, P. 2007. A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Spaurus aurata*). *Aquaculture*. 272, 210-216.

- Castillo-Juárez, H., Montaldo, V. H. H., Arechavaleta, V. M. E. y Campos-Montes, G. R. 2005. Programa de Mejora Genética del Camarón Blanco del Pacífico en México. Ponencia 2do Foro Internacional de Acuicultura.
- Castillo-Juárez, H., Montaldo, V. H. H., Arechavaleta, V. M. E. y Alonso, M. R. A. 2006. Mejorar es la consigna. Desarrolla Maricultura del Pacífico Programa de Mejora Genética del Camarón Blanco del Pacífico en México con resultados positivos. Panorama Acuícola. Vol, 36-40.
- Castillo-Juárez, H., Quintana, C. J. C., Campos-Montes, G., Cabrera, V. C., Martínez, O. A. and Montaldo, V. H. H. 2007. Heredability for body weight at harvest size in the pacific White shrimp. *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, from a multi-environment experiment using univariate and multivariate animal models. Aquaculture. 273, 42-49.
- Cui, J. Z., Shen X. Y., Yang, G. P., Gong, O. L. and Gu, O. O. 2005. Characterization of microsatellite DNAs in *Takifugu rubripes* genome and their utilization in the genetic diversity analysis of *T. rubripes* and *T. pseudommus*. Aquaculture. 250,129-137.
- Cruz, P., Mejia-Ruiz, C. H., Pérez-Enriquez, R., and Ibarra, A. M. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Mol. Ecol. Notes. 2. 239-241.
- Dong, S., Kong, J., Zhang, T., Meng, X. and Wang, R. 2006. Parentage determination of chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) based on microsatellite DNA markers. Aquaculture. 258, 283-288
- Eding, H and Meuwissen, T. H. E. 2001. Marker-based estimates of between individuals using DNA fingerprinting. Hum. Biol. 65:875-895
- Falconer, D. S., Mackay, T. F. C. 1996. Introducción a la genética cuantitativa, 4th ed. Longman Group Essex, Inglaterra, p. 58
- Fernandez, J., Villanueva, B., Pong-Wong, R. and Toro, M. A. 2005. Efficiency of the use of pedigree and molecular marker information in conservation programs. Genetics. 170: 1313-1321.

- Freitas, P. D., Jesus, C. M., Galeti, P. M. 2007. Isolation and characterization of new microsatellite loci in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and cross-species amplification in other penaeid species. *Mol. Ecol. Notes.* 7, 324-326.
- Gjedrem T. 2005. Selection and Breeding Programs in Aquaculture. Dordrecht:Springer. pp 364.
- Godin, D.M., Carr, W.H., Hagino, G., Segura, F., Sweeney, J.N., Blankenship, L., 1996. Evaluation of a fluorescent elastomer internal tag in juvenile and adult shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 139, 243– 248.
- Goldstein, D.B., Schlötterer, C., 1999. Microsatellites: evolution and applications. Oxford University Press, New York, NY.
- Golubov, J., Ortega J. 2007. Cap. 5. Los análisis de Paternidad, ¿Para qué nos sirven? En: Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X., 2007. *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México.
- Gutiérrez, J.P., Royo, L.J., Álvarez, I., Goyache, F. (2005) MolKin v2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. *Journal of Heredity*, 96: 718-721.
- Hara, M., Sekino, M., 2003. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture* 217, 107–114.
- Hayes, B., He, J., Moen, T. and Benneitz, J. 2006. Use of molecular markers to maximize diversity of founder populations for aquaculture breeding programs. *Aquaculture* 255, 573-578.
- Herbinger, C.M., O'Reilly, P.T., Doyle, R.W., Wright, J.M., O'Flyman, F., 1999. Early growth performance of Atlantic salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. *Aquaculture* 173, 105–116.
- Jamieson, A. and Taylor S. C. S. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics.* 28, 397-400.

- Jerry, D.R., Stewart, T., Purvis, I.W., Piper, L.R., 2001. Evaluation of visual implant elastomer and alphanumeric internal tags as a method to identify juveniles of the freshwater crayfish, *Cherax destructor*. *Aquaculture* 193, 149– 154.
- Jerry, D.R., Preston, N.P., Crocos, P.J., Keys, S., Meadows, J.R.S., Li, Y., 2004. Parentage determination of Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellite markers (Bate). *Aquaculture* 235, 237–247.
- Jerry, D.R., Preston, N.P., Crocos, P.J., Keys, S., Meadows, J.R.S., Li, Y., 2006. Application of DNA parentage analyses for determining relative growth rates of *Penaeus japonicus* families reared in commercial ponds. *Aquaculture* 254, 171-181.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L. and Marshall, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16, 1099-1106.
- Lewin B. (2004). Part 1 Genes in: *Genes VIII*. Oxford University Press. USA. pp 53
- Lightner, DV. 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures of diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Bayton Roge, LA, USA.
- Linch, M. and Wals B. 1998. *Genetics and Analysis of Cuantitative Traits*. Sinauer Associates, Inc. U.S.A. pp 121-123
- Liu, Z. J. and Cordes J. F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*. 238:1-37.
- Lobato, P. G. 2002. Estudio Socioeconómico del Camarón Realizado por Sociedades Cooperativas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). México, D.F. 1992.
- MacAvoy, E. S., Wood, A. R. and Gardner, J. P. A. 2008. Development and evaluation of microsatellite markers for identification of individual Greenshell mussels (*Perna canaliculus*) in a selective breeding programe. *Aquaculture*. 274, 41-48.
- Malécot, G. 1948. *Les Mathématiques de l'hérédité*. Masson, Paris.

- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B. and Pemberton, J. M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7, 639-655.
- Navarro, A., Badilla, R., Zamorano, M. J., Pasamontes, V., Hildebrant, S., Sánchez J. J. and Alfonso, J. M. 2008. Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species: Gilthead seabream (*Sparus auratus*), red porgy (*Parus pargus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies. *Aquaculture.* 285, 30-37.
- Norris, A.T., Bradley, D.G., Cunningham, E.P. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture.* 180, 247-264.
- Norris, A.T., Bradley, D.G., Cunningham, E.P. 2000. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture.* 182,73-83.
- Panorama Acuícola. 2004. ANPLAC. Asociación Nacional de Productores de Larva de Camarón (Artículo de fondo). 10, 56-59
- Panorama Acuícola. 2002. Oferta de nauplios y poslarvas de camarón, en México, un compendio de las principales opciones. XX, XX-XX.
- Pemberton, J. M., Slate, J., Bancroft, D. R. and Barret, A. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.* 4, 249-252.
- Pérez, F., Ortiz, J., Zhinauala, M., Gonzabay, C., Calderón, J., Volckaert, F., 2005. Development of EST-SSR markers by data mining in three species of Shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus birdy*. *Marine Biotechnology.* 7,554-569.
- Ponzoni, R. W., Khaw, H. L., Nguyen, N. H., Hmzah, A. 2010 . Inbreeding and effective population size in the Malaysian nucleus of the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture.* 302, 42-48.

- SAGARPA (2005), Crece producción de camarón en México. Num. 329/05. (en línea) <http://www.sagarpa.gob.mx/cgcs/boletines/2005/noviembre/B329.pdf> - Consulta: 23 octubre de 2007.
- Valles-Jimenez, R., Cruz, P., Perez-Enriquez, R., 2004. Population Genetic structure of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology* 6, 475-484.
- Vela, A. S. 2008. Evaluación de la variabilidad genética en poblaciones seleccionadas y silvestres de camarón blanco del pacífico (*Litopenaeus vannamei*) usando microsatélites. Tesis de maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
- Wolfus, G.M., García, D.K., and Alcivar-Warren A. 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture*. 152,35-47.
- Wright, J.M., 1993. DNA fingerprinting in fishes. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier, Amsterdam, pp. 58–91.
- Wuthisuthimethavee, S., Lumubol, P., Vanavichit, A., Tragoonrung, S., 2003. Development of microsatellite markers in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) *Aquaculture*. 224,39-50
- Xu, Z., Primavera, J.H., Pena, L.D., Pettit, P., Belak, J., Alcivar-Warren, A. (2001) Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* 199, 13–40.
- Zhi-Ying, J., O-Wen, S. X., Li-Qun, L., Da-Yu, L. and Qing-Quan, L. 2006. Isolation and characterization of microsatellite markers from Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) *Mol. Ecol. Notes*. 6, 1282-1284.