

# VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOCI MICROSATÉLITES EN LOS PRIMEROS LOTES DE *Litopenaeus vannamei* INTRODUCIDOS EN CUBA PARA LA ACUICULTURA.

Y.J. Borrell <sup>1,2</sup>, G. Espinosa <sup>1\*</sup>, E. Vázquez <sup>2</sup>, J.A. Sánchez <sup>2</sup> y G. Blanco <sup>2</sup>

(1) Dpto de Bioquímica, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25 No. 455, Plaza, Ciudad Habana, Cuba.

(2) Dpto de Biología Funcional, Laboratorio de Genética Acuicola, Universidad de Oviedo, 33071 Oviedo, España.

(\*) Autor para correspondencia. Email: georgina@fbio.uh.cu

## RESUMEN

En este trabajo se han utilizado 4 loci microsatélites para hacer una caracterización genética de los dos primeros lotes de individuos de la especie *Litopenaeus vannamei* introducidos en Cuba para el cultivo y para valorar también, desde el punto de vista genético, la posibilidad de crear un banco de reproductores a partir de estos lotes. Los resultados obtenidos indican niveles de variación genética (heterocigosidad media  $H_o=0,560$ , número medio de alelos  $N_a=7,5$ ) inferiores a los que previamente se han informado en otras poblaciones salvajes y de cultivo de la especie. Los niveles de relación genética entre individuos (grado de parentesco) son, al menos en uno de los lotes, significativamente altos (Lote 1  $r_{media}=-0.0080$ , Lote 2  $r_{media}=+0,1515$ ). Se recomienda una estrategia de recopilación de la mayor variación genética posible, ya sea a partir de las poblaciones salvajes de origen de estos lotes de cultivo, ó a partir de cruzamientos entre lotes de origen común pero genéticamente diferentes. Para ello es necesario implementar herramientas como la crío-conservación de gametos y el genotipado con loci microsatélites para evitar cruzamientos entre individuos emparentados y seguir la heredabilidad de caracteres de interés para el cultivo.

Palabras clave: microsatélites; variabilidad genética; cultivo de camarones; *Litopenaeus vannamei*

## ABSTRACT

Four microsatellite loci have been used in this work to characterize the first two stocks of *Litopenaeus vannamei* introduced in Cuba for aquaculture; the possibility of establish an efficient broodstock is also evaluated. Our results show levels of genetic variation (mean heterozygosity  $H_o=0,560$ , mean number of alleles  $N_a=7,5$ ) lower than other previously reported for wild and cultured populations in this specie. Relatedness coefficients show that at least in one of the stock under analysis exist high degrees of kinship among individuals (Stock 1 mean  $r=-0.0080$ , Stock 2 mean  $r=+0.1515$ ). It is advisable to collect all the possible genetic variation that exists in the source wild shrimp population or even from other broodstocks genetically different although sharing the same origin in order to establish the first broodstock. We propose a strategy that includes gametes crío-conservation and the use of microsatellite to avoid endogamy and calculate heritability of economically interesting traits.

Key words: microsatellite; genetic variability; shrimp cultura; *Litopenaeus vannamei*

En la declaración final de la reunión para el desarrollo de la acuicultura celebrada en Bangkok (2000), se establecieron como prioritarias varias líneas de acción que incluían el desarrollo y utilización de mejores prácticas para la domesticación y manejo de los bancos de reproductores a través de la aplicación de técnicas genéticas. El hecho comprobado es que la genética puede ser una herramienta relevante para el incremento de la productividad y sostenibilidad de la acuicultura como industria, a través de su incidencia en aspectos como una mayor supervivencia, mejor utilización de los recursos, reducción de los costos y mayor protección ambiental (Benzie, 1996; Bartley, 1998; Knibb, 2000).

Las técnicas moleculares de análisis del ADN han potenciado los programas de selección genética en muchas especies a través de dos elementos: la selección asistida por marcadores moleculares (M.A.S) y el establecimiento de pedigrees que permitan evitar la endogamia en los procesos de selección. Los microsatélites parecen estar distribuidos por todo el genoma (Dib y col., 1996; Dietrich y col., 1996) y esta característica permite que estén siendo utilizados en el mapeo genético de los genomas de muchas especies (O'Connell y Wright, 1997). Estos experimentos son de importancia capital en la búsqueda y utilización de QTL's (Quantitative Traits Loci) que facilitan la selección asistida por marcadores moleculares y potencian la acuicultura (Danzmann y col., 1997; Lie y col., 1997; Jackson y col., 1998). Los

microsatélites, además de ubicuos, son codominantes y muy variables, lo que facilita el marcaje genético en las estaciones de cultivo de peces (Norris y col., 2000; Jackson y col., 2003; Borrell y col., 2004). Así se evitan procesos de depresión endogámica frecuentes al utilizar como reproductores a individuos muy emparentados (Gjerde y col., 1983; Kincaid, 1983; Sbordoní y col., 1986; Su y col., 1996). El marcaje genético facilita además el cálculo de heredabilidad para caracteres de interés y permite la cría en los mismos estanques de familias diferentes (desde edades tempranas), disminuyendo los gastos en el cultivo y la variación ambiental en los programas de selección genética (Herbinger y col., 1999; Norris y col., 2000).

Para iniciar el cultivo de cualquier especie es imprescindible, en aras de evitar una disminución significativa de variabilidad genética, establecer los bancos de reproductores a partir de un lote fundador con altos niveles de variación genética, con un número elevado de individuos (más de 50), mantener tamaño efectivos grandes por generación de cultivo, mantener una proporción de sexos 1:1 y cruzar siempre individuos no relacionados (Allendorf y Ryman, 1987). En *Marsupenaeus japonicus*, Sbordoní y col. (1986) consignaron una disminución progresiva de la variación genética utilizando aloenzimas desde  $H_o=0,102$  en la generación 1 hasta  $H_o=0,018$  en la generación 7, aparejada a una disminución significativa (de más de un 40%) en la productividad de la estación. Resultados similares han sido informados para *L.stylirostris* (Bierne y col., 2000); *P.monodon* (Xu y col., 2001) y *L.vannamei* (García y col., 1994; Wolfus y col., 1997). Para el seguimiento de los niveles de variabilidad genética en poblaciones en cultivo los loci microsatélites, a partir de sus altos niveles de variación, han demostrado una mayor resolución y sensibilidad (Benzie, 2000).

En 2004 se introdujeron en Cuba dos lotes de *L.vannamei* con el objetivo de comenzar su engorde y posterior comercialización. El cultivo se realiza en estaciones comerciales anteriormente utilizadas para el cultivo de la especie autóctona *L.schmitti*. El origen y metodología de obtención de estos lotes es hasta el momento desconocido. El único dato disponible es que están seleccionados para crecimiento y resistencia ante infecciones virales (Ministerio de la Pesca, Cuba). En este trabajo nos proponemos hacer una evaluación de los niveles de variación genética presentes en estos individuos y valorar hasta que punto se podría, partiendo de esta base, establecer bancos de reproductores de la especie en nuestro país.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### Muestras

Se analizaron dos muestras escogidas al azar en los dos lotes de *Litopenaeus vannamei* que han sido introducidos en Cuba para el cultivo en el 2004 (Lote 1, n=45 individuos, Lote 2, n=40 individuos). Se almacenaron en etanol (99%) dos pleópodos de cada individuo para los análisis de ADN en el caso del Lote 1 y larvas completas en el Lote 2.

### Loci microsatélites, condiciones de amplificación y electrofóresis.

El ADN se extrajo utilizando la resina Chelex® 100 (Walsh y col., 1991) a partir de muestras de músculo de los pleópodos de los individuos (Lote 1) o las larvas completas (Lote 2). Se analizaron cuatro loci microsatélites: *M-1* aislado en *L.vannamei* por Wolfus y col. (1997) y los loci *Pvan0040*, *Pvan1578* y *Pvan1815* obtenidos en la especie por Cruz y col. (2002).

Los loci microsatélites se amplificaron mediante PCR utilizando una mezcla de 25 µl compuesta por 10ng de ADN por muestra, 2,0 mM de  $MgCl_2$ , 200µM de cada desoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 3ng/µl de cada iniciador, tampón de reacción 10X y 1 unidad de *Taq*-polimerasa. Los programas empleados para amplificar cada locus (temperaturas de hibridación) fueron los siguientes: *M1* (54°C), *Pvan0040* (48°C), *Pvan1578* (52°C), y *Pvan1815* (50°C), siguiendo la misma rutina de 95°C 5 minutos y 35 ciclos de 95°C 1 minuto, temperatura de hibridación 30 segundos, 72°C 30 segundos y luego 10 minutos a 72°C como paso final de polimerización. Los productos de las amplificaciones se aplicaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (6%) y se revelaron mediante tinción con plata (Promega Silver sequence™ DNA Staining). Se estimaron las tallas de estos productos de amplificación por comparación con reacciones de secuencias con tallas conocidas del vector pUC 19 (Amersham Sequencing Kit).

### Análisis de Diversidad Genética.

El número de alelos en cada loci microsatélite ( $N_a$ ), los porcentajes de loci polimórficos ( $P_{0,95}$ ), las heterocigosidades observadas ( $H_o$ ), y esperadas ( $H_e$ ) (Nei, 1978), se calcularon utilizando el programa estadístico Biosys-1 (Swofford y Selander, 1981).

El programa Fstat 2.9.3 (Goudet, 2001; actualizado a partir de Goudet, 1995) se utilizó para estimar las desviaciones de equilibrio de Hardy Weinberg en las poblaciones a partir de la significación de los valores de  $F_{is}$  encontrados. Fstat 2.9.3 también se utilizó para calcular los valores de  $F_{ST}$  entre pares de muestras, y sus valores de  $p$  asociados, antes y después de la corrección de Bonferroni (Rice, 1989).

### Relaciones de parentesco.

Los coeficientes de relación genética ( $r$ ) entre individuos se calcularon utilizando el programa Relatedness 5.0.6 (Queller y Goodnight, 1989). A partir de los genotipos de marcadores codominantes este programa calcula los coeficientes de relación genética ( $r$ ) por pares de individuos. La fórmula básica para los cálculos es:

$$r = \frac{\sum_x \sum_k \sum_l (P_{xy} - P^*)}{\sum_x \sum_k \sum_l (P_x - P^*)}$$

donde  $x$  es individuos,  $k$  loci y  $l$  posiciones alélicas (Ej.:  $l=1$  para individuos haploides y 2 para individuos diploides).

Las variables en la ecuación son:

$P_x$ : frecuencia encontrada en el individuo  $x$ , locus  $k$  y posición alélica  $l$ . Este valor en un individuo diploide debe ser 0, 0,5 ó 1,0.

$P_y$ : frecuencia del mismo alelo en el grupo de individuos con el que se compara  $x$  (aquellos con respecto a los cuales se quiere medir la relación genética).

$P^*$ : frecuencia de ese alelo en toda la población excluyendo a todos los posibles parientes de  $x$ .

Teóricamente,  $r$  entre individuos ó grupos de individuos que comparten ambos parentales (hermanos completos) debe ser como media  $r=0,5$ , mientras que medios hermanos que sólo comparten un 25% de su genoma, deben exhibir medias de  $r=0,25$  e individuos no relacionados deben exhibir medias situadas en los valores  $r \leq 0$  (ver Queller y Goodnight, 1989).

### Procedimiento estadístico

Se utilizaron pruebas no paramétricas de comparaciones de medias (Prueba de Mann-Whitney) para estimar las diferencias en cuanto a las distribuciones y media de los coeficientes de relación genética ( $r$ ) entre lotes (SPSS10.0).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### La variación genética presente en los lotes.

En este trabajo se realizó un análisis genético, basado en el estudio de la variación microsatélite, con muestras de los dos primeros lotes de *Litopenaeus vannamei* introducidos en Cuba para el cultivo. Los niveles de variación encontrados, así como las desviaciones de los equilibrios de Hardy-Weinberg (valores de  $F_{is}$ ) se reflejan en la Tabla 1. Los cuatro loci microsatélites ( $M1$ ,  $Pvan0040$ ,  $Pvan1578$ ,  $Pvan1815$ ) resultaron polimórficos en los dos lotes en estudio. En el Lote 1 se detectó una heterocigosidad media de  $H_o=0,667$  y un número medio de alelos de  $N_a=9,25$ . En el Lote 2 los niveles de variación genética ( $H_o=0,454$  y  $N_a=5,75$ ) son inferiores a los detectados en el Lote 1 (Tabla 1). Ambos lotes exhiben alelos privados con frecuencias génicas elevadas (Lote 1: 18 alelos exclusivos, sumatoria de las frecuencias en alelos exclusivos para  $M1=0,377$ ,  $Pvan0040=0,244$ ,  $Pvan1578=0,357$ ,  $Pvan1815=0,442$ ; Lote 2: 4 alelos exclusivos, sumatoria de las frecuencias para alelos exclusivos en  $Pvan0040=0,090$ ,  $Pvan1578=0,289$ ,  $Pvan1815=0,275$ ) (Fig. 1). Ambos lotes exhiben por lo tanto una heterogeneidad genética que se refleja en el valor de  $F_{ST}$  entre lotes ( $F_{ST}=0.0955$   $p \leq 0,05$ ).

Wolfus y col. (1997) informan, en sus estudios genéticos dentro del programa de EUA para el cultivo del camarón *L.vannamei*, polimorfismos microsatélites del 100%, 97,6% y 45% en lotes de una, tres y siete generaciones en cultivo. Heterocigosidades observadas del 0,95-0,96, 0,91 y 0,39 para los tres lotes en estudio y número de alelos de 22-23, 17 y 4 alelos. Estas poblaciones en cultivo tienen su origen en poblaciones salvajes de México, Ecuador y Guatemala implicadas en un programa de manejo, basado en la utilización de loci microsatélites. Cruz y col. (2004) refieren niveles de polimorfismo, heterocigosidad observada y número de alelos que se mantienen relativamente altos luego de 2 generaciones de cultivo de *L.vannamei* y que incluso se incrementan a partir del enriquecimiento de la variabilidad genética del cultivo con padres de origen salvaje (G0:  $H_o=0,650$   $N_a=7,5$ ; G1:  $H_o=0,710$   $N_a=9,0$ ; G2:  $H_o=0,720$   $N_a=10$ ). No obstante en este caso, la presencia de 4 alelos

Tabla 1. Parámetros de diversidad genética y desviación de los equilibrios de Hardy-Weinberg ( $F_{IS}$ ) de 4 loci microsatélites en los dos primeros lotes para el cultivo de la especie *Litopenaeus vannamei* introducidos en Cuba. n: Número de muestras. He: heterocigosidad esperada según Nei (1978). Ho: heterocigosidad observada. Na: número de alelos.

POBLACIONES										
Lote 1						Lote 2				
Locus	n	He	Ho	Na	$F_{IS}$	n	He	Ho	Na	$F_{IS}$
<i>M1</i>	41	0,840	0,585	11	+0,305 **	31	0,656	0,484	7	+0,265*
<i>Pvan0040</i>	41	0,728	0,488	6	+0,332**	39	0,397	0,179	5	+0,551**
<i>Pvan1578</i>	42	0,897	0,738	12	+0,179*	38	0,792	0,579	8	+0,272**
<i>Pvan1815</i>	42	0,774	0,857	8	-0,109	40	0,654	0,575	3	+0,123
4 loci microsatélites	41,5	0,810	0,667	9,25	+0,178**	37	0,625	0,454	5,75	+0,275**
Coeficiente de relación genética ( $r$ )		-0,0087±0,0082					+0,1515±0,0099			

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

principales en los dos loci utilizados (*Pvan 1578* y *Pvan 1815*) en los lotes de cultivo refleja, según los autores, ciertos niveles de reducción de variabilidad genética ya presentes en el lote fundador con respecto a la variación que se encuentra en las poblaciones de origen en los Melagos, Venezuela.

En el presente trabajo, a partir del desconocimiento del origen de los individuos introducidos en Cuba, es imposible valorar la magnitud, en cuanto a reducción de variabilidad genética, que presentan estos individuos con respecto a sus poblaciones de origen. Asumiendo, que el tamaño de muestra utilizado en este experimento representa la variabilidad genética total en cada uno de los lotes en estudio (un elemento que no podemos asegurar con exactitud), sería lógico suponer que, luego del proceso de selección para crecimiento y resistencia a enfermedades virales, han perdido variabilidad genética. Wolfus y col. (1997) en una séptima generación de cultivo creada a partir de 3 hembras y un total de 12 cruzamientos, encontraron una heterocigosidad observada del 40% (tal y como se ha detectado en el Lote 2). El Lote 1 exhibe niveles de variación genética similares a los del lote fundador del experimento de Cruz y col (2004). Tal y como se ha visto, si se incorporan padres a la dinámica del manejo para planificar los cruzamientos, que procedan de las poblaciones salvajes de origen ó de líneas de cultivo con orígenes similares pero que atesoran características genéticas diferentes (am-

bos lotes en nuestro experimento exhiben entre sí un número alto de alelos privados con frecuencias significativamente altas), se puede incluso, generación a generación, aumentar los niveles de variación genética y con ello mantener el proceso de selección para los caracteres de interés (crecimiento, resistencia) pero evitando procesos endogámicos de consideración.

Los déficit significativos de heterocigotos y con ellos la ausencia de equilibrio de Hardy-Weinberg en ambos lotes (Lote 1  $F_{IS}=+0,178$   $p \leq 0,01$ ; Lote 2  $F_{IS}=+0,275$   $p \leq 0,01$ , Tabla 1) reflejan probablemente que estamos ante una población sobre la cual se ha ejercido selección (Nei, 1987), aunque no podemos descartar como causas probables una mezcla de individuos con orígenes diferentes en los lotes (Nei, 1987) ó la existencia de alelos nulos en el análisis (Pemberton y col., 1995; McGoldrick y col., 2000, Borrell y col., 2004).

### El parentesco entre individuos.

Entre ambos lotes se han observado también diferencias significativas en cuanto a los niveles de relación genética que exhiben los individuos dentro de los lotes (grado de parentesco) (Lote 1  $r$  media=-0.0087, Lote 2  $r$  media=+0.1515, coeficiente de Mann-Whitney=215757.50  $p \leq 0.001$ ) (Tabla 1, Fig. 2). El Lote 1 exhibe una media en cuanto a coeficientes de relación genética significativamente mayor a la de individuos presumiblemente no

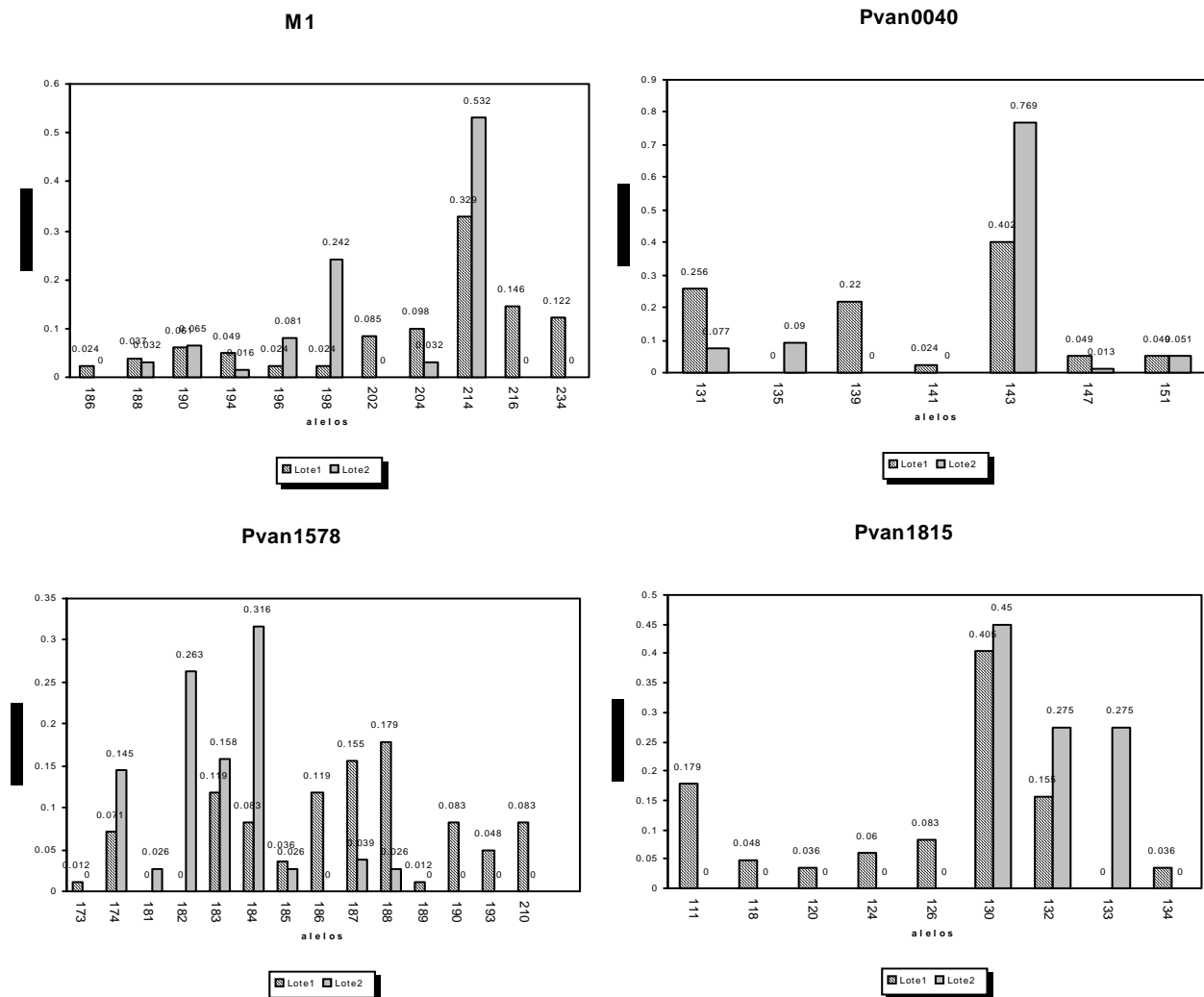


Fig. 1. Frecuencias génicas de 4 loci microsatélites en los dos primeros lotes de *Litopenaeus vannamei* introducidos en Cuba para el cultivo.

emparentados en otras poblaciones en cultivo analizadas previamente por los autores de este trabajo (Salmón atlántico,  $r$  media (individuos no relacionados analizados con 7 loci microsatélites) = -0.0846 (coeficiente de Mann-Whitney=228486,  $p \leq 0.001$ ); (Rodaballo,  $r$  media (individuos no relacionados en estaciones de cultivo comerciales de España analizados con 8 loci microsatélites) = -0.0803 (Coeficiente de Mann-Whitney=326910,  $p \leq 0.001$ ) (Borrell y col., 2002 y 2004). Por otro lado, el grado de parentesco encontrado en el Lote 2 ( $r$  media = +0.1515) se ubica en los valores que habitualmente se encuentran entre individuos con un alto grado de parentesco (Queller y Goodnight, 1989; Norris y col., 2000; Borrell y col., 2002; 2004). Estos resultados sugieren el riesgo que puede implicar el diseño de los cruzamientos

utilizando como reproductores a estos individuos sin alguna metodología, como el coeficiente de relación genética entre individuos, que proporciona información sobre los niveles de endogamia. De esta forma se evitarían los daños considerables a la productividad que se pueden producir por la endogamia. Nuevamente la incorporación de parentales salvajes con el mismo origen, pero con características genéticas diferentes (cruzamientos entre individuos de lotes genéticamente diferentes), parece ser la mejor opción para el establecimiento de un lote de reproductores de *L. vannamei* en Cuba evitando la disminución de la eficacia biológica en los descendientes (disminución de la fertilidad, en el número de huevos, deformaciones morfológicas, etc) (Kincaid, 1983; Gjerde y col., 1983; Sbordoní y col., 1986; Su y col., 1996).

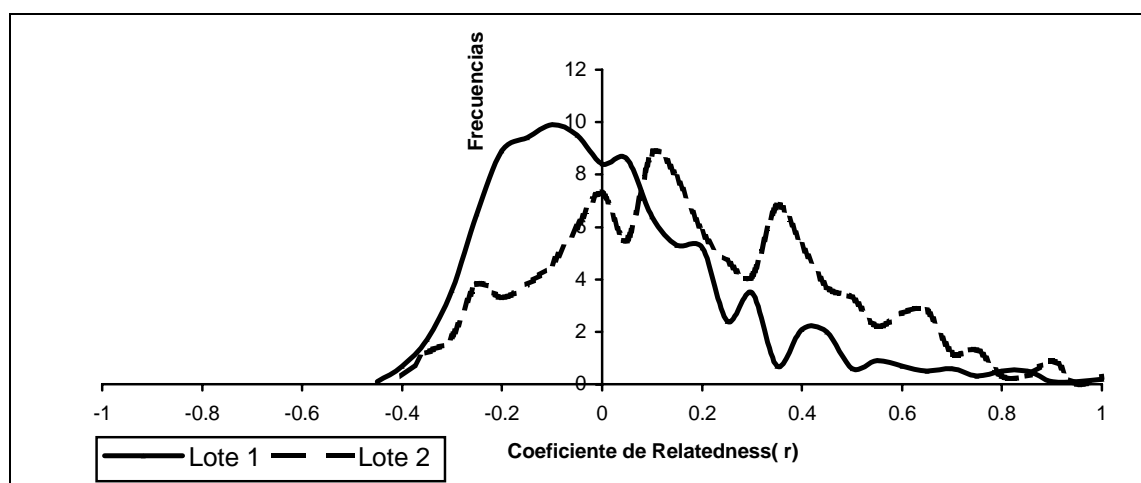


Fig. 2. Distribución de los coeficientes de relación genética (relatedness,  $r$ ) entre pares de individuos dentro de los dos primeros lotes de *Litopenaeus vannamei* introducidos en Cuba para el cultivo, luego del análisis con 4 loci microsatélites.

La importación de *P. monodon*, *M. japonicus* y *L. vannamei* a las estaciones de cultivo de camarón en China en 1993 fueron los causantes de la introducción de virus hasta ese momento ausentes en la región, lo que produjo la mortalidad masiva y el colapso de la cosecha del camarón autóctono *Fenneropenaeus chinensis*, (Anónimo, 1993). En nuestra opinión superados los problemas de sostenibilidad (Primavera, 1998) y de seguridad que conlleva el establecimiento de la acuicultura del camarón *L. vannamei* (una especie exótica con un largo historial de epidemias virales en Latinoamérica), se impone una estrategia que permita recopilar la mayor variación genética posible empleando un origen común para el establecimiento del banco de reproductores, dígase individuos de las poblaciones de origen salvaje, ó establecimiento de cruzamientos entre lotes de cultivo genéticamente diferentes pero con origen común para evitar también los procesos de disrupción génica ó depresión exogámica que produce la mezcla de individuos con orígenes muy diferentes y que dañarían a corto plazo los niveles productivos (Keller y col., 2000; Fenster y col., 2000). Nótese que en esta estrategia la crío-conservación de gametos, y con ellos la conservación de elementos de variación genética procedentes de lotes diferentes separados en el tiempo, puede jugar un papel relevante para conseguir el objetivo que se persigue. Si a esta estrategia unimos la utilización de los marcadores genéticos en la dinámica de los cruzamientos evitando emparejar individuos con un alto grado de parentesco y el empleo de metodologías avanzadas para el cálculo de la heredabilidad de

los caracteres de interés para el cultivo, es posible establecer un banco de reproductores de *L. vannamei* en Cuba

## REFERENCIAS

- Allendorf FW y N. Ryman (1987): Genetic management of hatchery stocks. In: *Population Genetics and Fishery Management* (N. Ryman y F. Utter, eds.), Seattle: University of Washington Press, pp : 141-159.
- Anónimo (1993): China's shrimp crop failure may cause supply-demand imbalance. *Asian. Shrimp News*, 16.
- Bangkok (2000): Aquaculture Development Beyond 2000: The Bangkok Declaration and Strategy. Bangkok. Thailandia, 21 pp.
- Bartley, D.M. (1998): Genetics and breeding in aquaculture: current status and trends. In: *Genetics and Breeding of Mediterranean Aquaculture Species* (D.M. Bartley y B. Basurco, eds), Cahiers Options Vol. 34, pp : 13- 30.
- Benzie, J.A.H. (1996): Penaeid Genetics and Biotechnology. *Second International Conference on the Culture of Penaeid Prawns and Shrimps*, Iloilo City, Philippines.
- Benzie, J.A.H. (2000): Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquaculture Research* 31:95-119.

- Bierne, N., I. Beuzart, V. Vonau, F. Bonhomme y E. Bedier (2000): Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 184:203-219.
- Borrell, Y.J., E. Vázquez, J.A. Sánchez y G. Blanco (2002): Esclarecimiento de relaciones de parentesco en *Salmo salar* L., 1578 utilizando loci microsatélites. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 18(1-4):211-220.
- Borrell, Y.J., J. Álvarez, E. Vázquez, C. Fernández, C. Martínez, J.A. Sánchez y G. Blanco (2004): Applying microsatellites to the management of turbot stocks (*Scophthalmus maximus* L.) in hatcheries. *Aquaculture* 241:133-150.
- Cruz, P., C.H. Mejía-Ruiz, R. Pérez-Enríquez y A.M. Ibarra (2002): Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*. *Molecular Ecology Notes* 2:239-241.
- Cruz, P., A.M. Ibarra, H. Mejía-Ruiz, P.M. Gaffney y R. Pérez-Enríquez (2004): Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Marine Biotechnology* 6:157-164.
- Danzmann, R.G., T.R. Jackson, M.M. Ferguson y P.E. Ihssen (1997): The identification of multiple QTL influencing temperature tolerance in rainbow trout and their phenotypic effects and genomic backgrounds. *Sixth International Symposium on Genetics and Aquaculture*, Stirling, Scotland.
- Dib, C., S. Faure, C. Fizames, D. Samson, N. Drouot, A. Vignal y P. Millasseau (1996): A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380: 152-154.
- Dietrich, W.F., J. Miller, R. Steen, M.A. Merchant, D. Damron-Boles y Z. Husain (1996): A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* 380:149-152.
- Fenster, C.B. y L.F. Galloway (2000): Inbreeding and outbreeding depression in natural populations of *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae). *Conservation Biology* 14 (5):1406-1412.
- García, D.K., M.A. Faggart, L. Rhoades, A. Alcivar-Warren, J.A. Wyban, W.H. Carr y J.N. Sweeney (1994): Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:270-280.
- Gjerde, B., K. Gunnes y T. Gjedrem (1983): Effect of inbreeding on survival and growth in rainbow trout. *Aquaculture* 34: 327- 332.
- Goudet, J. (1995): FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86:485-486.
- Goudet, J. (2001): FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.tml>
- Herbinger, C.M., P.T. O'Reilly, R.W. Doyle, J.M. Wright y F. O'Flynn (1999): Early growth performance of Atlantic salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. *Aquaculture* 173 (1-4):105- 116.
- Jackson, T.M., D.J. Martín-Robichaud y M.E. Reith (2003): Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock. *Aquaculture* 220: 245-259.
- Jackson, T.R., M. Ferguson, R. Danzmann, A. Fishback, P. Ihssen, M. O'Connell y T. Crease (1998): Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families. *Heredity* 80:143-151.
- Keller, M., J. Kollmann y P.J. Edwards (2000): Genetic introgression from distant provenances reduces fitness in local weed populations. *Journal of Applied Ecology* 37:647-659.
- Kincaid, H.L. (1983): Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture* 33, 215-227.
- Knibb, W. (2000): Genetic improvement of marine fish-which method for industry? *Aquaculture Research* 31: 11-23.
- Lie, O., R.G. Danzmann, R. Guyomard, L.E. Holm, B. Hoyheim, R. Powell, A. Slettan y J. Taggart (1997): Constructing a genetic map of salmonid fishes: SALMAP. *Sixth International Symposium on genetics and Aquaculture*, Stirling, Scotland.
- McGoldrick, D.J., D. Hedgecock, L. English, P. Baoprasertkul y R.D. Ward (2000): The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea*

- gigas*): selection and null alleles. *Journal of Shellfish Research* 19 (2): 779–788.
- Nei, M. (1978): Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583–590.
- Nei, M. (1987): *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 432 pp.
- Norris, A.T., D.G. Bradley y E.P. Cunningham (2000): Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture* 182: 73–83.
- O'Connell, M. y J.M. Wright (1997): Microsatellite DNA in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 7: 331–363.
- Pemberton, J.M., J. Slate, D.R. Bancroft y J.A. Barrett (1995): Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology* 4:249–252.
- Primavera, J.H. (1998): Tropical shrimp farming and its sustainability. In: Tropical Mariculture (S.S. De Silva, eds), Academic Press, London, UK, 487pp.
- Queller, D.C. y K.F. Goodnight (1989): Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258–275.
- Rice, W.R. (1989): Analysing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225.
- Sbordoni, V., M. de Matthaeis, M. Cobolli Sbordoni, G. La Rosa y M. Mattoccia (1986): Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Aquaculture* 57:239–251.
- Su, G.S., L.E. Liljedahl y G.A.E. Gall (1996): Effects of inbreeding on growth and reproductive traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 142: 139–148.
- Swofford, D.L. y R.B. Selander (1981): Biosys-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis for electrophoretic data in population genetics and systematics. *Journal of Heredity* 72:281–283.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger y R. Higuchi (1991): Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10:506–510.
- Wolfus, G.M., G.K. García y A. Alcivar-Warren (1997): Application of the microsatellites technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture* 152:35–47.
- Xu, Z., J.H. Primavera, L.D. de la Pena, P. Pettit, J. Belak y A. Alcivar-Warren (2001): Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* 199:13–40.

Aceptado: 23 de julio del 2006