



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Y TECNOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ACUACULTURA



**ANÁLISIS DE ADN POLIMORFICO AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD) EN EL
CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO *Penaeus vannamei* (Boone, 1931)
CULTIVADO Y SILVESTRE DEL NOROESTE DE MÉXICO.**

T E S I S

**que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta:

ROBERTO CARLOS VALERIO GARCÍA

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INDICE DE FIGURAS	iii
INDICE DE TABLAS	iv
I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
I.1. Los beneficios de los marcadores moleculares	3
I.2. El ADN polimórfico amplificado al azar como una herramienta práctica y de alta resolución	5
II.- OBJETIVOS	8
II.1 Objetivo General	8
II.2 Objetivos Particulares	8
III.- MATERIAL Y METODOS	9
III.1. Obtención de muestras	9
III.2. Extracción del ADN	9
III.3. RAPD-PCR	9
III.4. Electroforesis	11
III.5. Análisis estadístico	12
III.6. Detección de marcadores	13
IV.- RESULTADOS	14
IV.1. Extracción de ADN	14

IV.2 Amplificación del ADN	14
IV.3. Polimorfismo	14
IV.4. Distancias genéticas	18
IV.5. Marcadores moleculares	19
IV. DISCUSIONES	25
V. CONCLUSIONES	30
VI. RECOMENDACIONES	31
VI. LITERATURA CITADA	32
VII. ANEXOS	42

RESUMEN

Se estimó la variabilidad y diferenciación genética de tres linajes de cultivo y una población silvestre de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) por medio de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). Se analizaron cuatro muestras: dos linajes de Sonora, uno de Baja California Sur y una muestra silvestre de la costa de Sinaloa. Se utilizaron cuatro oligos de diez bases para detectar 34 loci polimórficos. La diversidad genética mostró valores bajos con los índices de Shannon (0.12-0.22) y de Nei (0.08-0.15) debido a los procedimientos de selección de los laboratorios de producción de larvas. El índice de diferenciación genética G_{ST} fue de 0.55 y el árbol de distancia genética agrupó los dos linajes de Sonora como un grupo muy relacionado, mientras que la muestra silvestre se mantuvo separada de los tres linajes. Se detectó un marcador exclusivo para el linaje de Baja California Sur con el oligo OPA10, el cual mostró una banda de 210 pares de bases que puede ser útil como una huella genética en los programas de selección y mejoramiento genético.

ABSTRACT.

The genetic variability and differentiation in three strains and a wild population of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) were estimated by random amplified polymorphic DNA (RAPD). Four samples were analyzed; two strains from Sonora, one from Baja California Sur, and a wild sample from the Sinaloa coast. Four ten-base oligonucleotides were used to detect 34 polymorphic loci. The genetic diversity showed low values with both Shannon (0.12 - 0.22) and Nei (0.08 – 0.15) indexes, caused by the selection procedures in the hatcheries. The genetic differentiation index, G_{st} , was 0.55 and a tree of genetic distance grouped the two Sonoran strains as a closely related group, whereas the wild sample was kept separated from the three strains. An exclusive genetic marker for the Baja California Sur strain was detected with primer OPA10, which depicted a 210 base pair band that may be useful as a genetic fingerprint in selection and improvement programs.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Ubicación geográfica de las localidades de donde provienen las cuatro muestras de <i>P. vannamei</i>	10
2	Electroforesis del extracto de ADN total	15
3	ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) con el oligo OPB20, para los linajes cultivados y la población silvestre. El primer carril representa el marcador de peso molecular (escalera de 100 pb)	16
4	Dendrograma de distancias genéticas de Nei (1976), obtenidas a partir de RAPD's aplicando el método UPGMA	23
5	Patrones de RAPD usando el primer OPA10. Donde se muestra con una flecha el marcador genético de 200 pb detectado únicamente en el linaje C	24

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PAGINA
I	Secuencia de los oligos con número total de loci, número de loci monomórficos y polimórficos amplificados a partir del análisis de RAPD en las cuatro muestras de <i>Penaeus vannamei</i>	17
II	Diversidad genética dentro y entre los linajes de camarón blanco del Pacífico <i>P. vannamei</i> obtenida a partir de RAPD's	20
III	Matriz del coeficiente de diferenciación genética, G_{st} (arriba de la diagonal) y flujo genético, N_m (debajo de la diagonal) de los datos generados por RAPD's.	21
IV	Matriz de identidad genética (arriba de la diagonal) y distancia genética (de bajo de la diagonal) de Nei (1978) de los datos generados por los RAPD's	22

I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La comercialización del camarón blanco (*Penaeus vannamei*), ha ido creciendo de manera importante a nivel mundial. Es una de las especies económicamente más importantes en la acuicultura y la pesquería a lo largo de la costa oeste del Pacífico, desde Sonora en el Golfo de California hasta las costas del norte del Perú (Dore y Fridmodt, 1987; Wyban y Sweeny, 1991; Martínez-Cordoba y Campaña-Torres, 1999; Rosenberry, 2002). En la actualidad, *P. vannamei* ha sido introducido con gran éxito como especie de cultivo en países asiáticos y sudamericanos como: Taiwán-China, Filipinas, Tailandia, Indonesia, Vietnam y Brasil (Fegan, 2002; Taw *et al.*, 2002; Wyban, 2002), lo que la ha convertido en una de las especies mas importantes y preferidas para el consumo dentro del mercado del camarón en el mundo. Sin embargo, el crecimiento comercial de esta especie también ha desencadenado una serie de problemas en diferentes áreas, tanto comercial como en su cultivo.

La acuicultura ha permitido un mayor abastecimiento de esta especie a precios más accesibles, sobre todo en los países asiáticos, los cuales inclusive han llegado a incurrir en practicas ilegales de dumping. Es decir, venden camarón de cultivo al extranjero a precios menores que su costo de producción o a la que tiene en sus propios mercados, dejando a los productores nacionales en desventaja, siendo el mercado estadounidense el que mas ha resentido este efecto dumping (Briggs *et al.*, 2005). Otra de las causas por las que además se vende a bajo precio, es porque que algunos de estos países proporcionan un producto de mala calidad debido al abuso desmedido de antibióticos que limitan el crecimiento del camarón, lo que lo abarata.

Una medida de control que se ha tomado sobre esta situación es el establecimiento de aranceles sobre quienes incurren en esta práctica con la finalidad de compensar los precios tan bajos a los que se intenta vender este camarón procedente de Asia en el continente Americano (Briggs *et al.*, 2005). Es de esperarse que con estas medidas de antidumping, se incurra en la introducción ilegal de camarón asiático a E. U. y México. El uso de la tecnología molecular puede ser útil para detectar marcadores moleculares que permitan verificar la procedencia tanto del camarón nacional como del importado y evite que sean introducidos de manera ilegal a México y se intenten vender como organismos cultivados o capturados en el país (Montaño-Pérez *et al.*, 2004).

Otro de los problemas que también ha sufrido esta especie, particularmente dentro de la acuicultura, es la propagación de enfermedades, principalmente de origen bacteriano y viral (Lightner *et al.*, 1997), esto debido a que los sistemas de cultivo crean un medio ambiente artificial que favorece la selección y proliferación de agentes infecciosos que pueden afectar considerablemente la supervivencia y crecimiento de los organismos bajo cultivo (Jiravanichpaisal *et al.*, 2001, 2004). Debido a esto, se han tratado de establecer programas de selección de organismos resistentes a enfermedades y con un mejor desempeño en condiciones de cultivo.

La mayoría de los laboratorios de larvas han logrado cerrar el ciclo reproductivo, lo que ha permitido seleccionar sus reproductores tomando en cuenta algunas características fenotípicas como incremento en talla, rápido crecimiento y resistencia a enfermedades, llegando incluso a desarrollar sus propios linajes (Moore *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2000). Sin embargo, no es suficiente utilizar el fenotipo como único criterio de selección puesto que las características deseadas no siempre se manifiestan o no son heredadas a la progenie. Al cabo de unas cuantas generaciones, las características deseables se pueden perder, incluso existe el peligro de manifestarse rasgos no deseados que en un tiempo permanecieron en forma recesiva dentro de la población. Un ejemplo de esto último es lo reportado por Argue *et al.* (2002), en donde se seleccionaron distintos reproductores de *P. vannamei* resistentes al virus de Taura para su cruzamiento, sin embargo, se observó que los animales tenían un menor crecimiento.

Una forma de evitar este tipo de problemas es implementando verdaderos programas de mejoramiento genético con el uso de marcadores moleculares que estén asociados a características genotípicas específicas y verificar su heredabilidad, así como establecer su distribución y mantener la variabilidad dentro de la población. Este tipo de manejo o manipulación genética permitiría que las empresas puedan competir por un mayor mercado a nivel internacional, al obtener un producto de buena calidad y mejorado (Montaño-Pérez *et al.*, 2004).

I.1. Los beneficios de los marcadores moleculares

En los últimos años, las herramientas genéticas han avanzado en el desarrollo de marcadores moleculares efectivos para caracterizar a las poblaciones de una misma especie en un sinnúmero de organismos (Beuzen *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2001; Rafalski, 2002; Vignal *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2006; Basavaraju *et al.*, 2007). Los marcadores moleculares son biomoléculas que pueden o no relacionarse con un rasgo genético. Las biomoléculas reconocidas como marcadores moleculares son las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencias). Cuando varios marcadores moleculares se asocian inequívocamente con un rasgo genético, se dice que forman un loci de rasgos cuantitativos o cuantificables (QTL por sus siglas en inglés) (Liu y Cordes, 2004). Se entiende como marcador molecular monomórfico cuando es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitio de restricción, se dice que es polimórfico. A veces es tal el grado de variación que se denomina hipervariable.

Los marcadores genéticos, que por definición, son independientes de factores ambientales y son más fáciles de encontrar cuando se buscan diferencias entre especies del mismo género o entre géneros de una misma familia. Sin embargo el desarrollo de marcadores moleculares más específicos y con mayor resolución es continuo, de tal forma que actualmente es posible diferenciar variaciones genómicas entre poblaciones, stocks, linajes e incluso entre individuos de una misma especie (Karp *et al.*, 1998; Liu y Cordes, 2004).

La importancia del estudio de la variabilidad genética radica en que constituye el material de partida sobre el que actúan los agentes que producen los cambios de la estructura genética de las poblaciones. Dichos agentes son básicamente la mutación, la migración, la deriva genética y la selección natural (Álvarez, 1987; Allendorf, 1983). Además, el conocimiento de la cantidad y de la distribución de la variabilidad genética dentro de las especies es de gran importancia para llevar a cabo un aprovechamiento racional de los recursos biológicos (Álvarez, 1987).

A partir del monitoreo de la variabilidad genética podemos obtener gran información, como por ejemplo: a) la estabilidad genética de las líneas obtenidas mediante cruces particulares, b) de poblaciones silvestres con o sin la influencia de organismos cultivados, c)

información de los alelos raros (frecuencias menores a 0.05), d) alelos perdidos, e) “cuellos de botella” genéticos, f) heterocigosis decreciente y g) incremento de endogamia en las poblaciones domesticadas (Allendorf *et al.*, 1987; Einum y Fleming, 1997; Sbordoni *et al.*, 1986, 1987; Harris *et al.*, 1990; Sunden y Davis, 1991; Hedcgecock y Sly, 1990; Saavedra y Guerra, 1996; English *et al.*, 2000).

Los primeros estudios de variabilidad genética en camarones peneidos se llevaron a cabo mediante análisis electroforéticos de alozimas (Muller y Latter, 1980; Harris *et al.*, 1990; Tam y Chu, 1993). Con esta herramienta se han realizado estudios recientes de variabilidad en camarones de la región del Golfo de California, como se describe a continuación.

En un análisis de la estructura genética y variación alozimica de dos especies comerciales de camarones peneidos (*P. californiensis* y *P. stylirostris*) del Golfo de California, Rosa-Vélez *et al.* (2000) observan que las subpoblaciones de *P. stylirostris* parecen estar más estructuradas que las de *P. californiensis*, pudiendo ser un reflejo de la distribución y hábitat geográficos de estas especies. En un estudio de variabilidad genética en dos poblaciones silvestres de *P. stylirostris* (de las costas de Guaymas y Puerto Peñasco, Sonora), y en dos linajes cultivados (“A” y “B”) empleando la técnicas de alozimas Ramos-Paredes y Grijalva-Chon (2003) encontraron que existe poca diversidad genética entre los linajes (producto principal de la pérdida de alelos). Estos autores, al igual que Rosa-Vélez *et al.* (2000), encontraron que existe una diferenciación genética significativa entre las poblaciones silvestres. Soto-Hernández y Grijalva-Chon (2004), al estimar la variabilidad genética a partir del análisis de diez sistemas enzimáticos de tres linajes de camarón blanco, *P. vannamei*, cultivados en Sonora y comparando los resultados con los de una muestra silvestre de la costa norte de Sinaloa, observaron altos niveles de endogamia y escasez de heterocigotos en los tres linajes y las muestras silvestres. Sin embargo la distribución de las frecuencias alélicas demostró una diferenciación genética moderada entre los tres linajes.

A pesar de las evidencias que arrojan los trabajos existentes sobre variabilidad genética, las técnicas moleculares que emplean ADN nuclear y mitocondrial (ADNmt) ofrecen mayores ganancias de resolución y efectividad. Varios estudios corroboran el uso potencial de estas técnicas para la obtención de marcadores específicos en las poblaciones. Palumbi y Benzie (1991) realizaron un estudio de secuenciación de fragmentos de restricción de ADNmt para

examinar las diferencias genéticas entre especies de camarones peneidos morfológicamente similares. Los datos mostraron sorprendentemente alta diferenciación genética y demuestran que los camarones peneidos morfológicamente similares pueden enmascarar u ocultar grandes diferencias genéticas.

Klinbunga *et al.* (1998) en un estudio preliminar de polimorfismo del ADNmt en poblaciones de *P. monodon* de Filipinas, Indonesia y Tailandia, observaron un claro polimorfismo inter e intraindividual en esta especie. Mas adelante, Klinbunga *et al.* (1999) al estudiar el grado de variación genética en dos poblaciones silvestres de *P. monodon* del mar de Andaman y el Golfo de Tailandia, a partir del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del ADNmt observaron una diferenciación entre las dos poblaciones y altos niveles de diversidad genética. Sugaya *et al.* (2002) estimaron la estructura y variabilidad genética entre individuos silvestres de camarón Kuruma (*Penaeus japonicus*) a través del uso de microsatélites y PCR-RFLP. Estos autores observaron altos niveles de parentesco entre las dos poblaciones y mencionan que esto puede ser debido a los efectos geográficos o históricos entre las localidades, dándose una mezcla entre las poblaciones.

Sin duda, estas herramientas moleculares nos permiten obtener un gran número de datos sobre la estructura genética de las poblaciones, distinguir tanto grandes como ligeras variaciones genómicas en ellas, así como medir su grado de polimorfismo y heterocigosis inter e intraespecífico, inclusive a nivel inter e intrapoblacional.

I.2. El ADN polimórfico amplificado al azar como una herramienta práctica y de alta resolución

Los marcadores moleculares obtenidos empleando la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD's por sus siglas en ingles: Random Amplified Polymorphic DNA), proveen un método sencillo y con la cual se obtienen un gran número de polimorfismos (Karp y Edwards, 1997). La técnica de RAPD's se basa en la utilización de varios oligos de 10 bases de secuencias arbitrarias para amplificar segmentos al azar del ADN utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bajo condiciones de baja astringencia. La amplificación de un segmento de ADN se hará cuando dos oligos se sitúen en las regiones complementarias del ADN genómico a una distancia no mayor de 2000 pares de bases (Liu y Cordes, 2004). El

ADN de diferentes individuos mostrará distintos productos de PCR permitiendo la identificación de polimorfismos que puedan caracterizar a familias de una especie, poblaciones o linajes. Uno de los usos importantes que también tienen los RAPD's es la detección de marcadores genéticos para poblaciones o familias, incluyendo linajes (Baird *et al.*, 1992; Woodward *et al.*, 1992; Neto *et al.*, 1993; Procunier *et al.*, 1993).

Los RAPD's presentan una serie de ventajas sobre otros métodos ya que es una técnica versátil, cómoda, rápida, relativamente barata y requiere de poca cantidad de DNA, no presupone conocimientos previos sobre la secuencia y se pueden distinguir rápida y simultáneamente muchos organismos (Penner *et al.*, 1993; Karp y Edwards, 1997; Liu y Cordes, 2004). Sin embargo, también existen algunos inconvenientes, entre ellos, que la temperatura de alineación se lleva a cabo en condiciones de baja astringencia, lo que se traduce en una hibridación poco específica lo que puede provocar la aparición de fragmentos ambiguos no reproducibles y difíciles de valorar. También los pequeños cambios en las condiciones de reacción pueden afectar la reproducibilidad y eficacia. Los RAPD's son sensibles a cambios de termociclador y rampas de calentamiento/enfriamiento, tipo de polimerasa utilizada, concentración de $MgCl_2$, purificación de ADN, y elección y concentración de los oligos. Sin embargo, estas limitaciones pueden ser solventadas con una cuidadosa estandarización de los reactivos y condiciones de la reacción (Karp *et al.*, 1998).

Esta técnica ha sido empleada con gran éxito en estudios de diversidad genética en camarones. Por ejemplo, Alcivar-Warren *et al.* (1994) emplearon diferentes técnicas moleculares tales como el análisis de polimorfismo de ADNmt, RAPD's y variabilidad alozímica para evaluar la diversidad genética de especies libres de patógenos (SFP) y poblaciones candidatas a SFP de *P. vannamei* del Oceanic Institute of Hawaii. Observaron que los estudios de polimorfismo de ADNmt y ADN nuclear proporcionaron marcadores con los que se pueden distinguir a las poblaciones, a diferencia de las alozimas, que mostraron bajos niveles de variabilidad, concluyendo que las técnicas de RFLP's y RAPD son más útiles para determinar variaciones genéticas. García *et al.* (1994) en un estudio muy similar pero utilizando RFLP's, RAPD's y variación alozímica, evaluaron la diversidad genética de dos poblaciones libres de patógenos específicos (SPF) y una población candidata a SPF de *P. vannamei* del Ocen Institute of Hawaii y encontraron nuevamente que las técnicas que

emplean ADNmt y ADN nuclear tienen mayor poder de resolución para detectar variaciones genéticas.

García y Benzie (1995) establecieron marcadores RAPD's para un pequeño número de crías de *P. monodon* obtenidas de padres silvestres. Los resultados que obtuvieron sugieren que estos marcadores pueden ser útiles en programas de crianza de camarones y para establecer el grado de variación y el modo de herencia de algunos polimorfismos detectados.

Tassanakajon *et al.* (1997 y 1998), en un análisis de RAPD's empleado para amplificar el genoma de distintas muestras geográficamente diferentes de camarón tigre *P. monodon* de Tailandia y para la detección de marcadores genéticos, observaron una alta variabilidad genética en varias de las poblaciones, sugiriendo el potencial uso de estos marcadores como altamente específicos para las poblaciones en esta especie.

Por estas razones se considera que los RAPD's pueden ser utilizados en los laboratorios de producción de postlarvas no solo para estudiar la variabilidad genética de los linajes sino que también para medir su estabilidad genética y para la detección de marcadores que permitan diferenciar y detectar a los distintos linajes producidos. Los RAPD's pueden ser utilizados para certificar el linaje de procedencia de una muestra de camarones cultivados, lo que proporcionará a los productores herramientas para dar seguimiento y protección a sus linajes de cultivo.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Estudiar los niveles de variabilidad y diferenciación genética en tres linajes cultivados y una muestra silvestre de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) del noroeste del país.

II.2. Objetivos particulares

- Estimar el número de polimorfismos generados a partir de 4 oligos de secuencias arbitrarias.
- Establecer el grado de variabilidad genética dentro y entre las cuatro muestras.
- Determinar el nivel de diferenciación genética de los linajes de camarón blanco y de la población silvestre.
- Detectar posibles marcadores genéticos para los tres linajes de camarón y de la población silvestre que puedan ser utilizadas como huellas genéticas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. Obtención de muestras

En julio del 2005 se obtuvieron dos muestras de camarón blanco de una granja comercial cercana al Estero Tastiota y una muestra de un estanque de cultivo de la Unidad Experimental Kino (UEK) del DICTUS. Los camarones de la granja comercial provenían de un laboratorio productor de larvas localizado en el área del Estero Tastiota (linaje A) y de un laboratorio de La Paz, B.C.S. (linaje C). Los camarones cultivados en la UEK provenían de un laboratorio localizado al norte de Bahía Kino (linaje B). Adicionalmente se obtuvo una muestra de camarón blanco silvestre de un estero cercano a La Cruz, Sinaloa (Fig. 1). Todas las muestras consistieron de 40 organismos los cuales fueron congelados a -70°C hasta su análisis en el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora.

III.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN geonómico se realizó usando un paquete comercial de reactivos denominado QIAamp[®] DNA Mini Kit de la marca QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la extracción se utilizó aproximadamente 100 mg de tejido muscular de los pleópodos y de la parte abdominal del camarón evitando la región cercana al intestino. La cuantificación y calidad del ADN se determinó con un espectrofotómetro Ultraspec 3300 Pro.

III.3. RAPD-PCR

Para la aplicación de la técnica del ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD), se usaron cuatro oligos de secuencias arbitrarias de la serie A y B de Operon Technologies (Alameda, CA, U.S.A.), los cuales han demostrado polimorfismos y marcadores genéticos en *P. vannamei* (García *et al.*, 1994):

- OPA09 (5'-GGGTAACGCC-3')
- OPA10 (5'-GTGATCGCAG-3')
- OPA20 (5'-GTTGCGATCC-3')
- OPB20 (5'-GGACCCTTAC-3')



Figura 1. Ubicación geográfica de las localidades de donde provienen las cuatro muestras de *P. vannamei*. (UEK = Unidad Experimental Kino).

Con el fin de evitar problemas de reproducibilidad y eficacia en el experimento se utilizaron las perlas Ready-to-Go (Amersham Biosciences Limited) en tubos de 0.2 ml. Estas perlas contienen Taq ADN polimerasa ~2.5 U, Tris HCl (pH 9.0) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM y dNTP's (dATP 200 μM, dCTP 200 μM, dGTP 200 μM, dTTP 200 μM). A estas perlas se agregaron 100 ng de ADN y agua libre de nucleasas suficiente para aforar a 25 μl de volumen final. La mezcla de reacción fue agitada y centrifugada para permitir la homogenización de todos los componentes.

La amplificación de ADN se realizó en un Termociclador PTC-200 (MJ Research). El protocolo de amplificación se realizó de acuerdo a lo descrito por García *et al.* (1994) para RAPD's empleando oligos cortos (10-mer) de secuencias arbitrarias. Las condiciones de amplificación fueron: precalentamiento y desnaturalización inicial a 94°C por 1 minuto; desnaturalización a 92°C por 1 minuto, alineamiento a 35°C por 1 minuto 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Los tres últimos pasos se repitieron 39 veces. Por último se realizó una extensión final a 72°C por 15 minutos.

III.4. Electroforesis

Los polimorfismos fueron detectados por electroforesis en geles de agarosa preparados al 2% conteniendo 2.5 μl de bromuro de etidio y utilizando como amortiguador TAE-X1 (Tris-HCl 10mM, ácido acético glacial, EDTA 1mM, pH 8.0). A cada carril del gel se le agregó 10 μl del producto de PCR. Para determinar el peso de las bandas, se usaron 5μl de uno de los siguientes marcadores de peso molecular: Trackit 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), Ready-Load 1 kb DNA Ladder (Invitrogen), PCR Marker (Sigma) y DNA Molecular Weight Marker (Farming IntelliGene Tech. Corp.). Los geles fueron corridos a 100 volts por un periodo de 40 a 60 minutos, posteriormente se lavaron en agua deionizada durante 1 minuto aproximadamente para eliminar el exceso de bromuro de etidio. Los productos de amplificación se visualizaron exponiendo los geles en el transiluminador de luz ultravioleta, para luego ser fotografiados con película instantánea Fuji FB-3000.

III.5. Análisis estadístico

Las fotografías se digitalizaron por computadora y se analizaron con el fotodocumentador Kodak 1D Image Análisis Software 3.6. Los pesos moleculares de las bandas obtenidas fueron deducidos por comparación con los marcadores de peso molecular. Si en las comparaciones intra-linajes una banda es consistentemente presente en todos los organismos, se considera un loci monomórfico. Los loci encontrados dentro de los cuatro linajes y de la muestra silvestre fueron codificados en una matriz binaria de datos como carácter 1 a la presencia de un fragmento amplificado y 0 su ausencia. Esta matriz fue utilizada para realizar los análisis posteriores. Solo las bandas mas consistentes fueron empleadas en la matriz de presencia-ausencia.

Los parámetros genéticos que se evaluaron fueron: el porcentaje de loci polimórficos (P), número de alelos observados (n_a), número efectivo de alelos por locus (n_e) (Kimura y Crow, 1964), índice de Shannon (S) (Lewontin, 1972) y el coeficiente de diversidad genética (h) de Nei (Nei y Li, 1973; Nei 1978). Por otra parte, para medir la magnitud relativa de la diferenciación genética entre los linajes y la población silvestre, se determinó el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}). Se determinó también la matriz de distancias e identidad genéticas para los linajes y la población silvestre, con base a lo descrito por Nei (1978).

A fin de sintetizar la información de la matriz de distancias genéticas y así permitir el reconocimiento de las relaciones genéticas entre los linajes, se aplicó un análisis de agrupamiento el cual esta fundado bajo un arreglo en forma de árbol llamado dendrograma, mismo que fue construido empleando el método de ligamiento promedio de la media no ponderada (siglas en ingles UPGMA, Sneath y Sokal, 1973) modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP Version 3.5. Todos análisis fueron estimados utilizando el programa PopGene 32, versión 1.31 para marcadores dominantes (Yeh *et al.*, 1999).

III.6. Detección de marcadores

Se realizó la búsqueda de marcadores genéticos exclusivos para cada linaje y para ello se detectaron los fragmentos o loci polimórficos y monomórficos de manera visual con la ayuda del fotodocumentador. De esta forma, si en las comparaciones inter-linajes una banda está consistentemente presente en un linaje (en al menos el 95% de sus integrantes) y ausente en los demás, se le considera como un marcador genético exclusivo para ese linaje.

IV. RESULTADOS

IV.1. Extracción de ADN

La técnica de extracción y cuantificación de ADN realizada en todos los organismos permitió obtener muestras de ADN de buena calidad (Figura 2), con concentraciones de 60 µg/ml en la mayoría de las muestras, logrando obtener concentraciones hasta de 300 µg/ml. En muy pocos de los casos, las concentraciones de ADN que se obtuvieron fueron tan bajas como 10 µg/ml y esto no representó un problema para las reacciones de PCR ya que esta técnica se caracteriza entre otras cosas por no requerir de gran cantidad de ADN (Liu y Cordes, 2004).

IV.2 Amplificación del ADN

La metodología de extracción del ADN total permitió obtener productos de amplificación de buena calidad en la gran mayoría de las muestras. Sin embargo, se realizaron algunas repeticiones de extracción en aquellos casos en los que se presentaron amplificaciones imprecisas y resolviéndose favorablemente. Esto permitió corroborar que los oligos empleados fueron reproducibles, consistentes entre los linajes y con un patrón de bandeo claramente definido.

IV.3. Polimorfismo

En la figura 3 se muestra el resultado de la amplificación de los tres linajes y la muestra silvestre con el oligo OPB20, donde observamos los patrones de bandeo en algunos organismos. En la Tabla I se muestra el número total de loci obtenidos a partir de los 4 oligos utilizados y el número de loci polimórficos y monomórficos. En 160 organismos analizados, a partir de los cuatro oligos, se obtuvieron un total de 34 bandas consistentes de diferente peso molecular dentro de un rango de 200 a 1600 pb. Cada primer generó de 5 a 10 bandas en los organismos, detectando un total de 23 bandas polimórficas y 11 monomórficas.

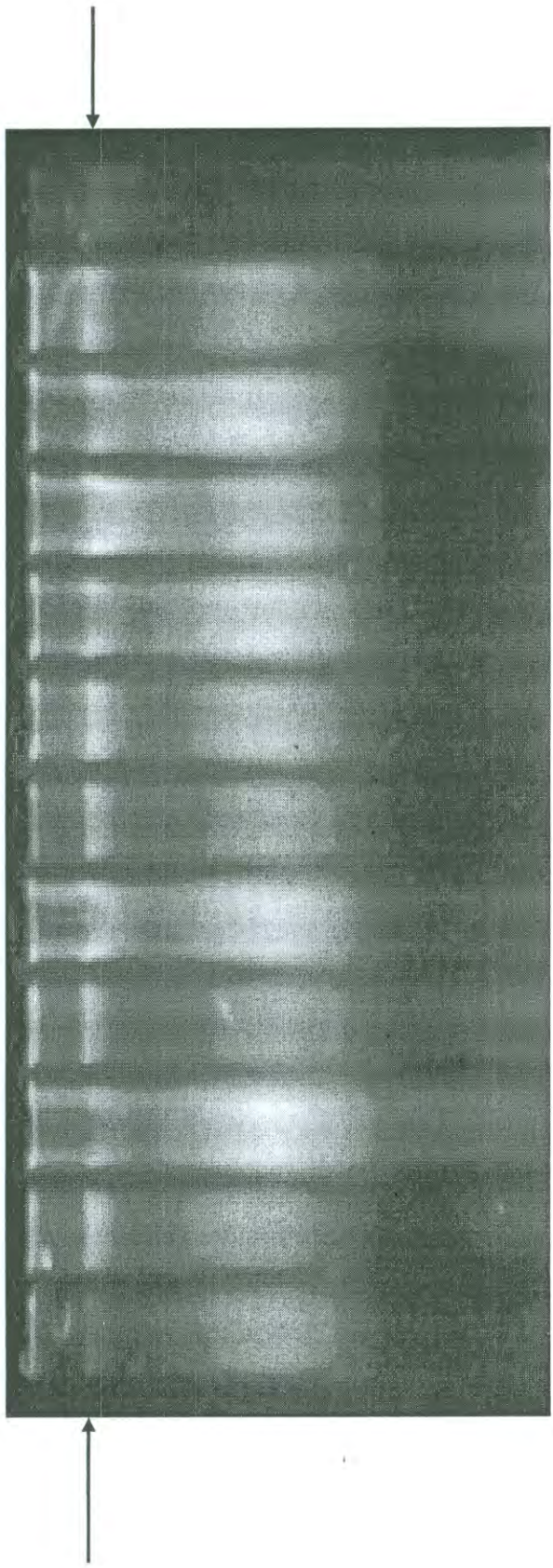


Figura 2. Electroforesis del extracto de ADN total.

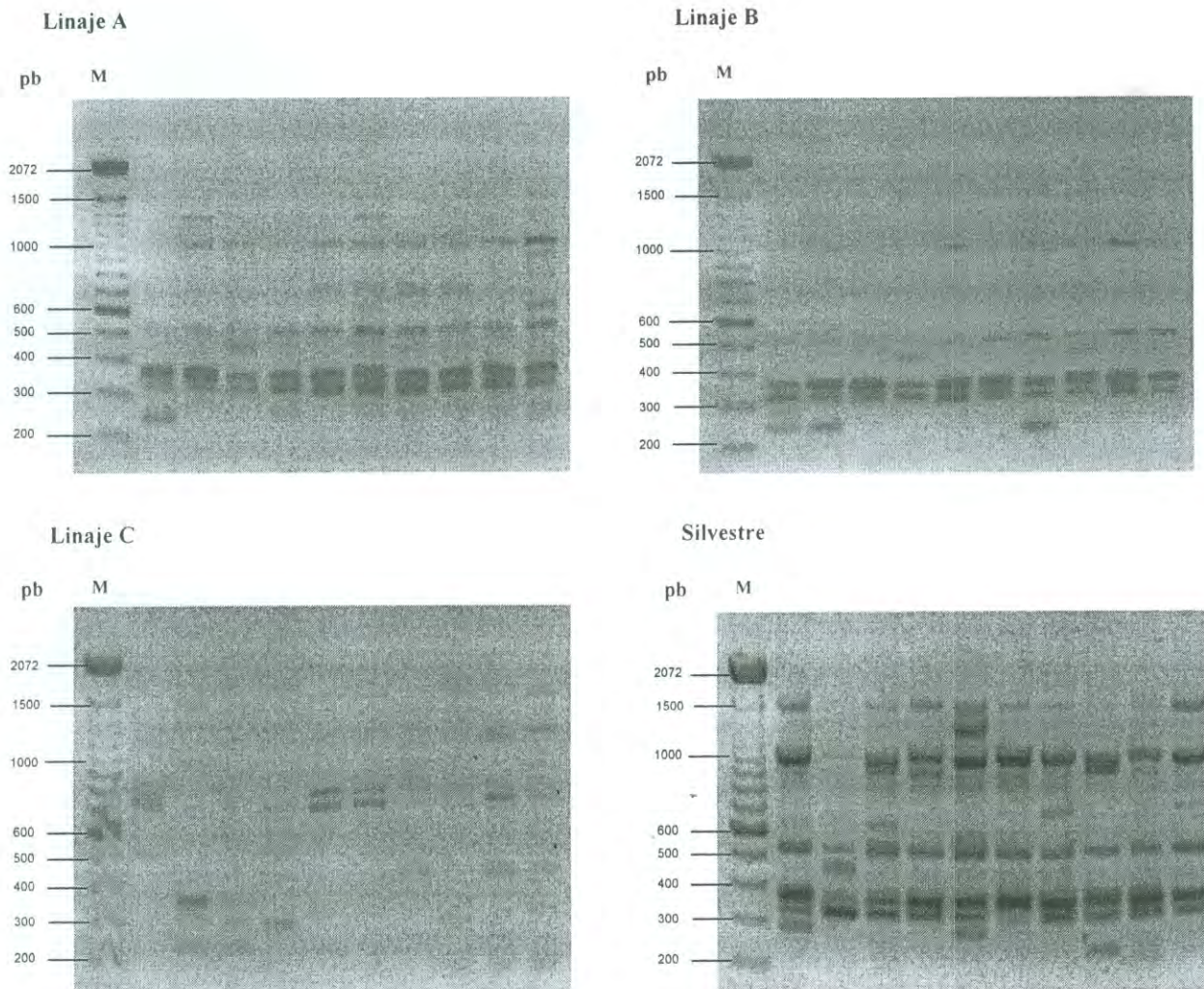


Figura 3. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) con el oligo OPB20, para los linajes cultivados y la población silvestre. El primer carril representa el marcador de peso molecular (Trackit 100 bp DNA Ladder, Invitrogen).

Tabla I. Secuencia de los oligos con número total de loci, número de loci monomórficos y polimórficos amplificadas a partir del análisis de RAPD en las cuatro muestras de *Penaeus vannamei*.

Primer	Secuencia	Número de loci	No. de loci monomórficos	No. de loci polimórficos
OPA09	5'-GGGTAACGCC-3'	5	2	3
OPA10	5'-GTGATCGCAG-3'	10	2	8
OPA20	5'-GTTGCGATCC-3'	9	3	6
OPB20	5'-GGACCCTTAC-3'	10	4	6
TOTAL		34	11	23

El análisis de variación genética se resume en la Tabla II. Se observa que el porcentaje total de loci polimórficos fue de 67.64%. De manera individual, el linaje “A”, presentó un polimorfismo del 35.29 %, el linaje “B” del 20.59 %, el linaje “C” del 32.25 % y los silvestres del 38.24 %, lo que representa bajos niveles de polimorfismo. El coeficiente de diversidad genética (h) de Nei (1973) para todos los loci estudiados en las cuatro muestras de camarón, fue de 0.29 ± 0.1 , en donde de manera individual el linaje A presentó el mayor valor de diversidad, (0.15 ± 0.2), siguiendo en el orden el linaje C y los silvestres con valor similares de 0.14 ± 0.2 , mientras que el linaje B presentó la menor diversidad genética con un valor de 0.08 ± 0.18 . También se calculó la diversidad genética con el índice de Shannon (S), el cual muestra el mismo comportamiento sobre el linaje B presentando el menor valor de diversidad genética (0.12 ± 0.25) en comparación con el resto. El número de alelos observados (n_a) y el número efectivo de alelos (n_e), fueron muy semejantes entre los linajes, fluctuando entre 1.2 a 1.7 y 1.1 a 1.4 respectivamente.

En la Tabla II también se observa que el coeficiente de diferenciación genética entre las 4 muestras fue relativamente alto ($G_{st} = 55.48 \%$) con un flujo genético (N_m) de 0.4 organismos por generación. Se estimaron también los valores de G_{st} y N_m en forma pareada, los cuales se muestran en la Tabla III, en donde se observa que entre el linaje A y B se presentó el menor coeficiente de diferenciación genética y el más alto nivel de flujo genético. En los demás casos el coeficiente de diferenciación genética varió entre el 30 % y 50 % y los valores de flujo genético entre 0.4 y 0.8, resultados que reflejan lo obtenido en el análisis de las cuatro muestras en conjunto.

IV.4. Distancia genética

La matriz de distancia genética (Tabla IV) generada a partir de la matriz binaria original, produjo un dendrograma que detecta de manera evidente la separación de los tres linajes con respecto a la muestra silvestre (Figura 3). De acuerdo con la Tabla IV, entre los tres linajes A B y C se observaron valores mayores de identidad genética (entre 0.95 y 0.79) que con respecto a la muestra silvestre (entre 0.59 y 0.67). Así mismo se observa la formación de un grupo muy cerrado entre el linaje A y B con valores de identidad genética de 0.95 y de

distancia genética de 0.04, en donde el dendrograma los separa perfectamente de las demás muestras.

IV.5. Marcadores moleculares

De acuerdo con lo observado en los geles con ayuda del fotodocumentador se detectó una banda particular al linaje C con el oligo OPA10. Esta banda midió 210 pb y estuvo presente en el 95% de los individuos de dicho linaje y completamente ausente en el resto de las muestras.

Tabla II. Diversidad genética dentro y entre los linajes de camarón blanco del Pacífico *P. vannamei* obtenida a partir de RAPD's.

	P(%)	na	ne	S	h	G _{ST}	N _m
Linaje A	35.29	1.3529 (0.48)	1.2735 (0.39)	0.2171 (0.30)	0.1506 (0.21)		
Linaje B	20.59	1.2059 (0.41)	1.1617 (0.33)	0.1275 (0.25)	0.0886 (0.18)		
Linaje C	32.25	1.3235 (0.47)	1.2593 (0.39)	0.2037 (0.30)	0.1420 (0.21)		
Silvestre	38.24	1.3824 (0.49)	1.2581 (0.36)	0.2203 (0.29)	0.1495 (0.20)		
Entre linajes	67.64	1.6764 (0.44)	1.4429 (0.22)	0.4609 (0.12)	0.2919 (0.10)	0.5548	0.4013

P = porcentaje de loci polimórficos; na = número de alelos observados; ne = número efectivo de alelos por locus; S = Coeficiente de diversidad de Shannon; h = coeficiente de diversidad genética de Nei (1973); G_{ST} = coeficiente de diferenciación genética entre linajes; N_m = flujo genético.

Tabla III. Matriz del coeficiente de diferenciación genética, G_{st} (arriba de la diagonal) y flujo genético, N_m (debajo de la diagonal) de los datos generados por RAPD's.

	Linaje A	Linaje B	Linaje C	Silvestre
Linaje A	*****	0.146	0.378	0.482
Linaje B	2.912	*****	0.469	0.527
Linaje C	0.822	-0.566	*****	0.548
Silvestre	0.536	0.447	0.411	*****

Tabla IV. Matriz de identidad genética (arriba de la diagonal) y distancia genética (debajo de la diagonal) de Nei (1978) de los datos generados por los RAPD's.

	Linaje A	LinajeB	Linaje C	Silvestre
Linaje A	*****	0.9556	0.7935	0.6723
Linaje B	0.0454	*****	0.7714	0.6997
Linaje C	0.2313	0.2595	*****	0.5868
Silvestre	0.3970	0.3571	0.5330	*****

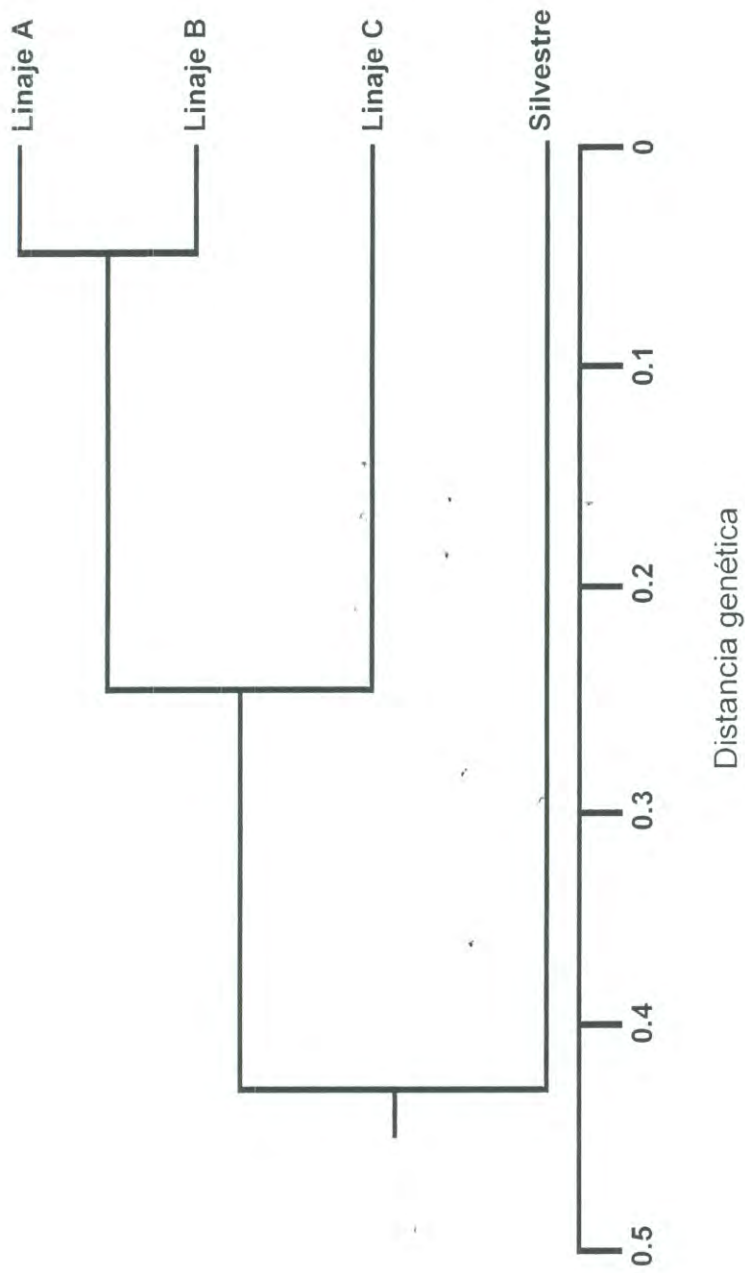
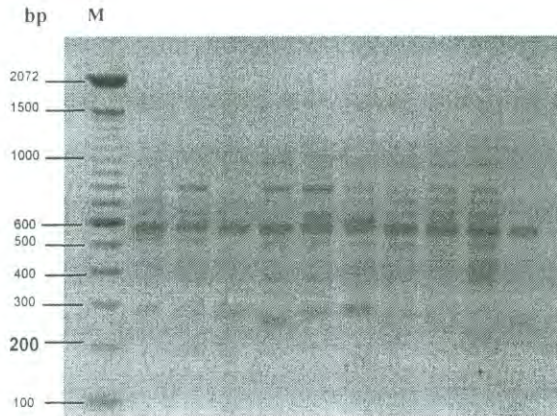
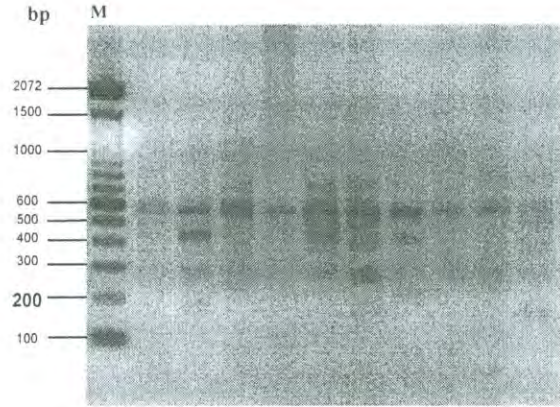


Figura 4. Dendrograma de distancias genéticas de Nei (1978), obtenidas a partir de RAPD's aplicando el método UPGMA.

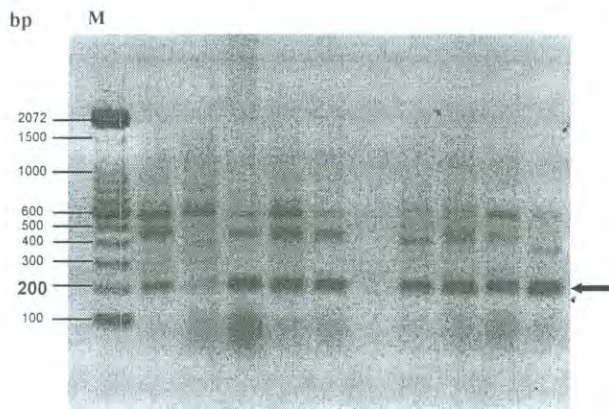
Linaje A



Linaje B



Linaje C



Silvestre

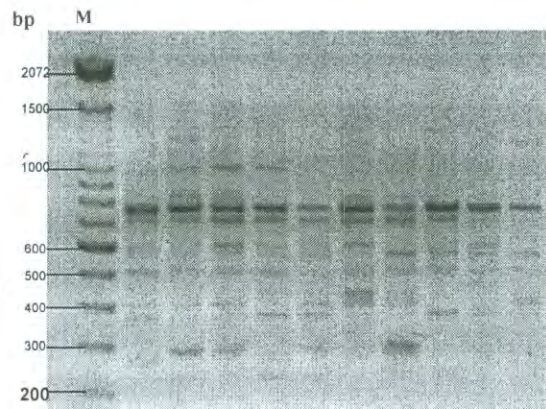


Figura 5. Patrones de RAPD; usando el oligo OPA10, donde se muestra con una flecha el marcador genético de 210 pb detectado exclusivamente en el linaje C. El primer carril representa el marcador de peso molecular (Trackit 100 bp DNA Ladder, Invitrogen).

V.- DISCUSIONES.

La técnica de RAPD's desde su desarrolló en el año 1990 (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990), ha sido utilizada en diversos estudios de variación y divergencia genética dentro y entre poblaciones con gran éxito, esto gracias a su elevado potencial de detección de un gran numero de polimorfismos, en comparación con otros marcadores genéticos (Liu y Cordes, 2004).

En este estudio se evaluaron cuatro diferentes decanucleotidos para la técnica de RAPD's en tres linajes cultivados de camarón *P. vannamei* y una muestra silvestre, con los cuales se obtuvo un alto número de polimorfismos ya que de los 34 loci observados, el 67.6% fueron polimórficos. Los cuatro oligos presentaron de manera individual un polimorfismo entre el 60% y 80%, siendo el OPA10 el más polimórfico.

La técnica permitió evaluar los niveles variación genética en los linajes. El porcentaje de polimorfismo se encontró en un rango de 20.59 % y 38.22%, lo que representa valores relativamente bajos de variabilidad genética dentro de los linajes y para la muestra silvestre. Los resultados contrastan con lo observado por García *et al.* (1994) para poblaciones SPF y candidatas a SPF de *P. vannamei*, donde observan valores mas altos de polimorfismo para esta especie (39% al 77%). Los valores bajos de polimorfismo entre los linajes, se puede explicar si consideramos que los linajes generalmente son derivados a partir de pocos individuos que presentan la o las características seleccionadas, generándose un efecto sobre la población, disminuyendo los valores de variabilidad. Este efecto es conocido como efecto fundador, el cual genera de manera inmediata la reducción cualitativa y cuantitativa de la diversidad genética en la población seleccionada (Frankham, 1996). Es importante además tener en cuenta que estos valores de polimorfismo pueden disminuir aún más con el tiempo, afectando de manera importante a los linajes, ya que en la práctica, una vez seleccionada la población fundadora de la línea comercial o linaje, se favorecen los apareamientos endogámicos, generando una reducción sustancial en el tamaño efectivo de la población, lo que favorece la aparición de procesos estocásticos asociados a la reducción de la diversidad genética, principalmente por deriva génica (Hartl, 1998; Hartl y Clark, 1989).

Por otra parte, observamos que la muestra silvestre, a pesar de haber presentado el valor más alto de polimorfismo (38.24 %) este no fue tan alto en comparación con los linajes.

Una posible razón de este resultado es que muchas de las granjas de camarón que se encuentran a orillas de las costas no están exentas del escape de organismos que logren mezclarse con poblaciones silvestres. La muestra silvestre fue colectada en La Cruz, Sinaloa, donde existen algunas granjas de camarón, lo cual impide asegurar que las poblaciones silvestres de camarón en esa región estén libres de cualquier contacto con camarones de cultivo y pudieron haber formado parte de la muestra colectada. Con relación a valores reportados de polimorfismo para camarones peneidos, Tassanakajon *et al.* (1997 y 1998) encontraron valores de polimorfismo para poblaciones silvestres de *P. monodon* de 24 a 58%, predominando valores arriba del 50%. Estos autores sugieren que la población con el valor más bajo de polimorfismo pudiera estar relacionada con camarones que escaparon a los cultivos.

De acuerdo con el coeficiente de diversidad de Nei (1973) y el índice de Shannon, los tres linajes y la población silvestre presentaron valores de diversidad genética bajos y similares entre sí, con excepción del linaje B el cual presentó valores aún más bajos. Este resultado confirma la reducida variabilidad genética que existe en los linajes estudiados por los apareamientos endogámicos, producto de la cruce entre organismos emparentados, lo que evita el flujo genético. La evidencia de la diversidad genética obtenida es relevante para las actividades productivas, ya que a través de ella es posible determinar que tan saludables se encuentran las líneas, y si es necesario reforzarlas con la introducción de nuevos reproductores, y evitar problemas posteriores sobre la población.

El coeficiente de diferenciación genética ($G_{st} = 0.55$ o 55%) mostró que algunas de las poblaciones presentan un cierto grado de diferenciación. Estos valores son superiores a los obtenidos por Fresneda-Rodríguez (2003) con ISSR's (Inter-Simple Sequence Repeat DNA) donde observa un valor de G_{st} de 0.36 y reporta que existe poca variabilidad genética en poblaciones silvestres de *P. vannamei*. El nivel promedio del flujo genético ($N_m = 0.4$) indica que existe menos de un individuo migrante por generación. Esto no significa que entre las muestras exista un flujo de aproximadamente un individuo cada dos generaciones, sino que nos da una idea de la divergencia entre las muestras. Por otra parte, al evaluar en grupos de dos a las muestras, se logró establecer de manera más clara el grado de divergencia entre ellas, en donde se detectó que el linaje A y B están poco diferenciadas, de acuerdo con los valores

del coeficiente de diferenciación genética ($G_{st} = 0.14$), presentando además un nivel de flujo genético mas alto ($N_m = 2.9$) en comparación con los otros grupos evaluados, en los que se observaron valores de G_{st} entre 0.37 – 0.54 y de N_m de 0.41-0.82, lo que nos indica que debe existir una relación genética muy estrecha entre ambos linajes al compartir un gran numero de loci.

En otros estudios se ha probado la utilidad de los RAPD's para determinar las relaciones genéticas entre poblaciones de camarones peneidos. Tassanakajon *et al.* (1997) en un primer estudio, trabajando sólo tres poblaciones de *P. monodon*, observa que las distancias genéticas entre estas nos son tan grandes (entre 0.03 y 0.07). En un segundo estudio con la misma especie, Tassanakajon *et al.* (1998) analizó nuevas y más poblaciones, incluyendo algunas del trabajo anterior, logra establecer una estructura de las poblaciones mas detallada. Sin embargo, algunos autores han obtenido discrepancias con los resultados de las relaciones genéticas y las distancias geográficas realizando estudios de polimorfismos. Aubert y Lightner (2000), al analizar poblaciones de *P. styliirostris* del Golfo de California, obtienen valores de distancia genética entre 0.09 y 0.18 con la formación de grupos que no guardan relación con las distancias geográficas.

Por otra parte, en el trabajo de García *et al.* (1994) con poblaciones cultivadas de *P. vannamei* observan que sus valores de distancias genéticas no son tan altos (entre 0.12 y 0.25) por lo tanto la separación de grupos no es tan clara como las que observamos en este estudio, en donde vemos a través del dendrograma la perfecta separación entre la muestra silvestre y los tres linajes. Si analizamos este resultado con respecto a los orígenes geográficos, la muestra silvestre de Sinaloa podría no estar genéticamente relacionada con los linajes que se producen en Sonora y La Paz. También podemos ver la estrecha relación que existe entre el linaje A y B, en los que se presentó un alto valor de identidad genética (0.95) y un valor de distancia muy bajo (0.04), estos resultados tienen una alta concordancia con los valores obtenidos del coeficiente de diferenciación genética y flujo genético. Ambos linajes son provenientes de laboratorios de producción de larvas que se encuentran ubicados en el estado de Sonora. El dendrograma y los valores de identidad genética, presentan una correlación interesante con la ubicación de los laboratorios de los que proviene cada linaje. Los datos de identidad y de distancia genética nos hablan de una posible conexión entre los linajes A y B,

que podría estar dada por 1) el desarrollo de un linaje a partir de otro, o 2) por el uso de fundadores de la misma población silvestre.

Se observó también en el dendrograma una clara separación entre el linaje C con el grupo que forman los linajes A y B. El linaje C presentó una distancia genética de 0.25 con el linaje A y de 0.23 con el linaje B. Estos resultados marcan una probable distinción de origen de los linajes, ya que la forma en que se separa el linaje C en el dendrograma indica que podría tratarse de organismos que provienen de una línea genéticamente distinta a la de los linajes de Sonora. Una particularidad más del linaje C es la banda monomórfica de 210 pb que presenta de manera exclusiva con el oligo OPA10. La serie de oligos utilizados en este estudio fueron seleccionados del estudio de Garcia *et al.* (1994) con linajes cultivados de *P. vannamei*, los cuales también detectaron la presencia de marcadores moleculares con la diferencia de que estos fueron detectados con los oligos OPA20 y OPB20.

Mucho se ha discutido sobre las limitantes de los RAPD's como las condiciones de baja astringencia, lo que se traduce en baja selectividad, con resultados poco específicos, y con dificultad para ser reproducibles; y que al ser marcadores dominantes no es posible identificar genotipos homocigotos de heterocigotos (Liu y Cordes, 2004). Sin embargo, queda claro que si se estandarizan algunas condiciones de la técnica, los productos de amplificación arrojan una gama de información reproducible muy importante, con la cual es posible establecer la estructura genética de las poblaciones, que puede ser utilizadas con diferentes fines entre ellos: para los programas de conservación, estudios filogenéticos, genética de poblaciones, diversidad genética, programas de selección de crías, estudios de mejoramiento genético, genealógicos y evolutivos. (Jayasankar y Dharmalingam, 1997; Smith *et al.*, 1997; Karp *et al.*, 1998; Mamuris *et al.*, 1998; Ali *et al.*, 2004; Kjølnner *et al.*, 2004; Liu y Cordes, 2004; Jin *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2006; Basavaraju *et al.*, 2007).

Se logró obtener información sobre las relaciones genéticas entre los linajes, particularmente las que se presentan con los linajes A y B. Aunque los laboratorios son muy celosos de cuidar sus líneas, es común que se realice la acción de adquirir linajes de otras granjas a partir de postlarvas de camarón previo a ser sembradas en las granjas de cultivo

(Portillo-Clark, com. pers.¹). Con estos resultados podemos ver que los polimorfismos detectados con los marcadores RAPD son una herramienta útil para determinar el grado de selección y separación de un linaje con otro y posibles relaciones genéticas.

Se confirma también el potencial de los RAPD's para detectar marcadores moleculares para poblaciones cultivadas de camarones pendedos así como ha sucedido para poblaciones silvestres (Tasanakajon *et al*, 1997, 1998; Aubert y Ligtner, 2000; García y Benzie, 1995). La técnica de RAPD's, tuvo la sensibilidad de detectar un marcador molecular a partir del primer OPA10, para el linaje C de un laboratorio ubicado en la Paz B.C.S. Este linaje, como ya hemos visto, también se logró separar de los linajes de Sonora a través del análisis realizado de variabilidad y diversidad genética. Al parecer, el proceso de selección de ciertas características deseadas en la población ha permitido diferenciar e identificar de manera muy clara al linaje de la Paz. Este marcador genético detectado, es una herramienta muy útil para diferenciar a los organismos de este linaje y si logra ser único y exclusivo de entre los demás linajes de camarón que se producen en México, puede ser utilizada como huella genética. Este marcador podría estar correlacionado con algún rasgo de importancia comercial, lo cual requiere de una investigación más a fondo.

¹ Guillermo Portillo-Clark. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

VI. CONCLUSIONES

Los polimorfismos detectados con los RAPD's mostraron valores bajos de variabilidad y diversidad genética, pero un buen nivel de diferenciación genética entre los linajes y la muestra silvestre. Estos bajos valores están ligados a los tamaños del pie de cría que manejan los laboratorios, los cuales son generalmente pequeños.

Se observó la formación de un grupo genéticamente muy relacionado, formado por los dos linajes de Sonora (A y B) los cuales presentaron altos valores de identidad genética. El linaje de La Paz (C) es una línea genética bien diferenciada de los demás grupos ya que se detectó un marcador genético con el oligo OPA10. Esto representa un potencial para ser usado como huella genética en programas de manejo de líneas genéticamente mejoradas.

Los linajes que son producto de programas de selección empleando solo rasgos fenotípicos, están expuestos a sufrir una disminución en la variabilidad genética por procesos de endogamia, y a la aparición de características poco deseadas en la población. De esta forma, los marcadores RAPD's son una manera de detectar indirectamente los efectos de endogamia a partir de la determinación del porcentaje de polimorfismo, y así medir la pérdida de variabilidad genética en la población.

VII. RECOMENDACIONES

Con el fin de obtener una estimación más precisa de los niveles de variabilidad y de encontrar un mayor número de marcadores moleculares, se recomienda tomar en cuenta los siguientes puntos:

- Trabajar con un mayor número de individuos por muestra.
- Tomar en cuenta un mayor número de poblaciones silvestres.
- Trabajar con un mayor número de linajes de cultivo.
- Trabajar con un mayor número de oligos de secuencias arbitrarias.
- Probar una mayor temperatura de alineación con la cual se eliminen los bandeos inespecíficos.

VIII. LITERATURA CITADA

- Alcivar-Warren, A., D.K. García, M.A. Farggart y C. Rich. 1994. Evaluation of genetic diversity of *Penaeus vannamei* shrimp using molecular genetic techniques. USMSFP 10th Anniversary Review, GCRL. Special Publication, 1: 27-34.
- Ali, A.B., T.H. Huang, D.N. Qin y X.M. Wang. 2004. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. *Fish Biology and Fisheries*, 14: 443-445.
- Álvarez, J.A. 1987. Genética y acuicultura. pp: 1-31. En: Espinosa de los Monteros, J., U. Monteros, J. y U. Labarta (Eds.), *Genética en Acuicultura*. Industrias Graficas España, S. L., Madrid.
- Allendorf, F.W. 1983. Isolation, gene flow, and genetič differentiation among population. pp: 51-56. En: Stonewald-Cox, C.M., S.M. Chambers, B. MacBryde y W.L. Thomas (Eds.), *Genetic and Conservation*. The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc. London.
- Allendorf, F.W., N. Ryman y F.M. Utter. 1987. Genetics and fishery management. Past, present and future. pp: 1-19. En: Ryman, N, F. Utter (Eds.), *Population Genetics and Fishery Management*. Washington Sea Grant program, University of Washington Press Seattle and London.
- Argue, B.J., S.M. Arce, J.M., Lotz, J.M. y Moss, S.M. 2002. Selective breeding of Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Síndrome Virus. *Aquaculture*, 204: 447-460.
- Aubert, H. y D.V. Lightner. 2000. Identification of genetic populations of the pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. *Marine Biology*, 137: 875-885.

- Baird, E., S. Cooper-Bland, R. Waugh, M. DeMaine y W. Powell. 1992. Molecular characterization of inter- and intra-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular General Genetics*, 233: 469-475.
- Basavaraju, Y., D.T. Prasad, K. Rani, S.P. Kumar, U.D. Nika, P.P. Srivastava, D.J. Penman y G.C. Mair. 2007. Genetic diversity in common carp stocks assayed by random-amplified polymorphic DNA markers. *Aquaculture Research*, 38: 147-155.
- Beuzen, N.D., M.J. Stear y K.C. Chang. 2000. Molecular markers and their use in animal breeding. *Veterinary Journal*, 160: 42-52.
- Briggs, M., S. Funge-Smith, R.P. Subasinghe y M. Phillips. 2005. Introducciones y movimientos de dos especies de camarones peneidos en Asia y el Pacífico. *FAO Documento Técnico de Pesca*. No. 476, Roma, FAO. 2005. 86 pp.
- Dore, I. y C. Fridmodt. 1987. *An Illustrated Guide to Shrimp of the World*. Osprey Books, Huntington. New York. 229 pp.
- Einum, E. y I.A. Fleming. 1997. Genetic divergence and interactions in the wild among native, farmed and hybrid Atlantic Salmon. *Journal of Fish Biology*, 50: 63-651.
- English, L.J., G.B. Maguire y R.D. Ward. 2000. Genetic variation of wild and hatchery population of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia. *Aquaculture*, 187: 283-298.
- Fegan, D. 2002. Is vannamei fever sustainable in Asia? *Global Aquaculture Advocate*, December, 2002, pp. 22-23.

- Fresneda-Rodríguez, A. 2003. Determinación de la estructura poblacional de *Litopenaeus vannamei* mediante ISSRs a lo largo de la costa ecuatoriana. Tesis de Maestría. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador. 59 pp.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*, 10: 1500-1508.
- García, D.K., M.A. Fargart, L. Rhoades, J.A. Wyban, W.H. Carr, K.M. Ebert, J.N. Sweeney y A. Alcivar-Warren. 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 270-280.
- García, D.K. y J.A.H. Benzie, 1995. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture*, 130: 137-144.
- Harris, S.E.G., R.T. Dillion, Jr., P.A. Sandifer y L.J. Lester. 1990. Electrophoresis of isozymes in cultured *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 85: 330.
- Hartl, D.L. 1988. *A Primer of Population Genetics*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts. 305 pp.
- Hartl, D.L. y A.G. Clark. 1989. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts. 682 pp.
- Hedcgecock, D. y F. Sly. 1990. Genetic drift and effective population size of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 88: 21-38.

- Jin, L.G., J., C. Ji-Young, S. Ki- Baek., P. Jung- Youn, K. In-Soo y H. Young-Ki. 2006. 18s Rrna gene sequences and random amplified polymorphic DNA used in discriminating Manchurian trout from other freshwater salmonids. *Fisheries Science*, 72: 903-905.
- Jayasankar, P. y K. Dharmalingam. 1997. Potencial application of RAPD and RAHM markers in genome analysis of scombroid fishes. *Current Science*, 72: 383-389.
- Jiravannichpaisal, P., E. Banyeekhun, K. Soderhall. y I. Soderhall. 2001. Experimental infección of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 47: 151-157.
- Jiravannichpaisal, P., K. Soderhall. y I. Soderhall. 2004. Effect of water temperature on the inmunes respose and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. *Fish & Sellfish Immunology*, 17: 265-275.
- Karp, A. y K. Edwards. 1997. DNA markers: a global overview. pp. 1-13. En: Cactano-Anollés G. y P.M. Gresshoff (Eds.), *DNA Markers: Protocols Applications, and Overviews*. J. Wiley & Sons. New York.
- Karp, A., P. G. Isaac y D.S. Ingram. 1998. *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*. Kluwer Academics Publisher. Netherlands. 528 pp.
- Kjolner, S., S. M. Sastad, P. Taberlet, C. Brochmann. 2004. Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*. *Molecular Ecology*, 13: 81-86.
- Kimura, M. y J.F. Crow. 1964. The number of aleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*. 49: 38-725.

- Klinbunga, S., D.J. Penman y B.J. MacAndrew. 1998. A preliminary study of ribosomal AND polymorphism in the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of Marine Biotechnology*, 6: 186-188.
- Klinbunga, S., D.J. Penman, B.J. MacAndrew y A. Tassanakajon. 1999. Mitochondrial DNA Diversity in Three Populations of the Giant Tiger Shrimp *Penaeus Monodon*. *Marine Biotechnology*, 1: 113-121.
- Lewontin, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, 6: 381-398.
- Lightner, D.V., R.M. Redman., B.T. Poulos., L.M. Nunan., J.L. Marri y K.W. Hansson. 1997. Risk of penaeid shrimp viruses in the Americas by international movement of live shrimp for aquaculture and froze shrimp for commodity markets. *Review Scientific and Technical, Office International Epizooties*, 16: 146-160.
- Liu, Z.J. y J.F. Cordes. 2004. DNA marker, technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.
- Mamuris, Z., A.P. Apostolidis y A.J. Theodoru. 1998. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to evaluate intraespecific genetic variation in re mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Biology*, 132: 171-178.
- Martínez-Córdova, L.R y A. Campaña-Torres. 1999. Especies de peneidos actuales y potenciales para el cultivo. pp. 23-38. En: Martínez L.R. (Ed.), *Cultivo de Camarones Peneidos: Principios y Prácticas*. AGT, S.A. México.
- Martínez, I., M. Aschan, T. Skjerdal, y S.M. Alijanabi. 2006. The genetics structure of *Pandalus borealis* in the Northeast Atlantic determined by RAPD analysis. *ICES Journal of Marine Science*, 63: 325-330.

- Montaño-Pérez, K., E. Villalpando-Canchola, A. Flores-Tom, F. Vargas-Albores. 2004. Ventajas del uso de marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético en camarón. *Panorama Acuícola*, 10(1): 18-22.
- Moore, S.S., V. Whan, G.P. Davis, K. Byrne, D.J.S. Hetzel y N. Preston. 1999. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 173: 19-32.
- Muller, J.C. y B.D.H. Latter, 1980. Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid prawn. *Evolution*, 34: 904-916.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- Nei, M. y W.H. Li. 1973. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76: 5269-5273.
- Neto, E. D., C.P. de Souza, D. Rollinson, N. Katz, S.D. Pena, y A.J.G, Simpson. 1993. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 57: 83-88.
- Palumbi, S.R. y J. Benzie. 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1: 27-34.

- Penner, G.A., A. Bush, R. Wise, W. Kim, L. Domier, K. Kasha, A. Laroche, G. Scoles, S.J. Molnar, y Fedak, G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratoties. pp: 341-345. En: PCR Methods and Applications. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Procnunier, J.D., M.A. Fernando y J.R. Barta. 1993. Species and strain differentiation of *Eimeria spp.* of the domestic fowl using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers. Parasitology Research, 79: 98-102.
- Rafalski, J.A. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. En: Cactano-Anollés G. y P.M. Gresshoff (Eds.), DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. J. Wiley & Sons. New York.
- Rafalski, A. 2002. Applications of singles nucleotide polymorphisms in crop genetics. Current Opinion in Plant Biology, 5: 94-100.
- Ramos-Paredes, J. y J.M. Grijalva-Chon. 2003. Allozyme genetic análisis in hatchery strains and wild blue shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris* (Stimpson), from the Gulf of California. Aquaculture Research, 34: 221-234.
- Rosa-Vélez, J., R. Escobar-Fernández, F. Correa, M. Maqueda-Cornejo, J. Torre-Cueto. 2000. Genetic structure of two commercial penaeids (*Penaeus californiensis* and *P. stylirostris*) from the Gulf of California, as revealed by allozyme variation. Fishery Bulletin, 98: 674-683.
- Rosenberry, B. 2002. World shrimp farming 2002. *Shrrimp News International*. 276 pp.
- Rubin, C.S., R.E. Warner, J.L. Bouzat, Ken N. Paige. 2001. Population genetic structure of Blanding's turtles (*Emydoidea blandingii*) in an urban landscape. Biological Conservation, 99: 323-330.

- Saavedra, C. y A. Guerra. 1996. Allozyme heterozygosity, founder effect and fitness traits in a cultivated population of the European oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 139: 203-224.
- Sbordoni, V., E. De Matthaeis, M. Cobolli-Sbordoni, G. La Rosa y M. Mattocia. 1986. Bottleneck effects and the depression of genetic variability un hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Aquaculture*, 57: 239-251.
- Sbordoni, V. G. la Rosa, M. Mattocchia, M Cobolli-Sbordoni y E. De Matthaeis. 1987. Genetic changes in seven of hatchery stocks of the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). Proc. Word Symp. On Selection, Hibridization, and Genetic Engineering in Aquaculture, Bodeaux 27-30 Mayo, 1986.
- Smith, P.J., P.G. Benson y S.M. MacVeagh. 1997. A comparison of three genetics methods used for stock discrimination of orange roughy, *Haplostethus atlanticus*: allozymes, mitochondrial DNA, and random amplified polymorphic DNA. *Fishery Bulletin*. 95: 800-811.
- Sneath, P.H.A. y R.R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman and Co., San Francisco, CA. 235 pp.
- Soto-Hernández, J. y J.M. Grijalva-Chon. 2004. Genetic differentiation in hatchery strains and wild white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone, 1931) from northwest Mexico. *Aquaculture Internacional*, 12: 593-601.
- Sugaya, T., M. Ikeda y N. Taniguchi. 2002. Relatedness structure estimated by microsatellites DNA and mitochondrial DNA polymerase Chain reaction-restriction fragment length polymorphisms analyses in the wild population of Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Fisheries Science*, 68: 793-8002.

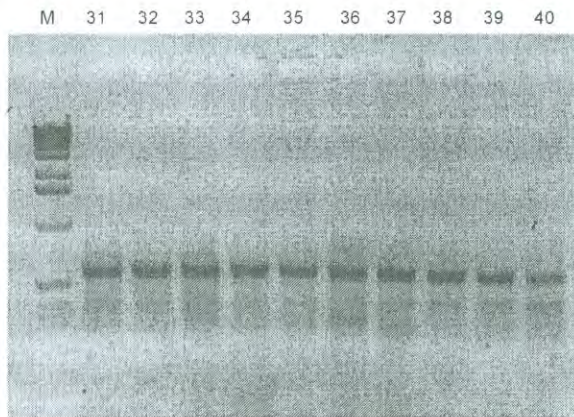
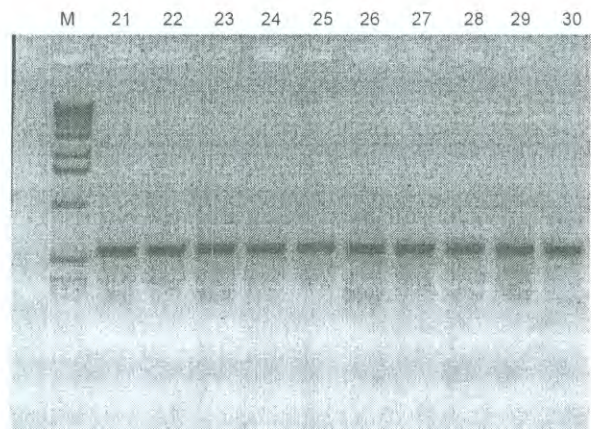
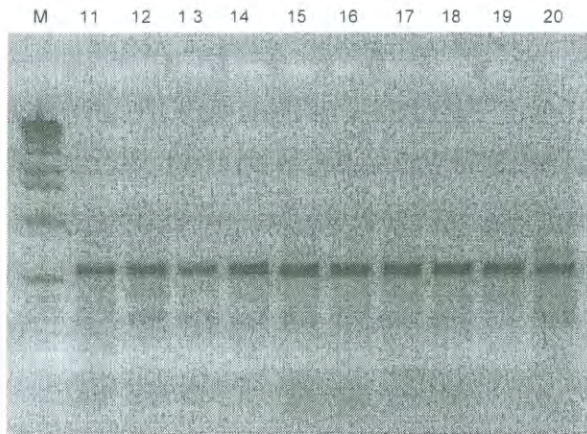
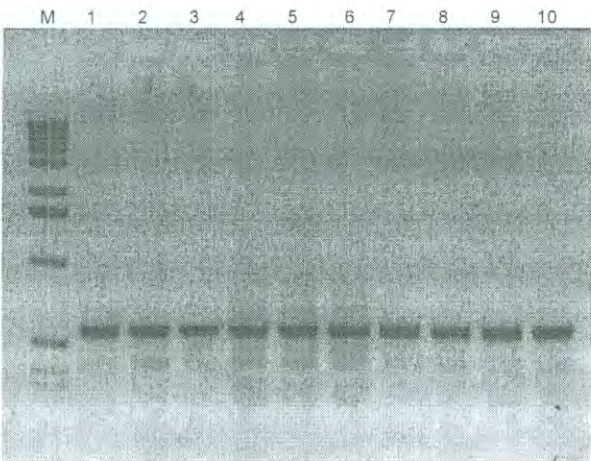
- Sunden, S.P.F. y S.K. Davis. 1991. Evaluation of Genetic variation in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. *Aquaculture*, 97: 131-142.
- Tam, K.T. y K.H. Chu. 1993. Electrophoretic study on the phylogenetic relationships of some species of *Penaeus* and *Metapenaeus* (Decapoda: Penaeidae) from the south China sea. *Journal of Crustacean Biology*, 13: 697-705.
- Tang, K.F.J., S.V. Durand, B.P. Whitw, R.M. Redman, C.R. Pantoja y D.V. Lightner. 2000. Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, 190: 203-210.
- Tassanakajon, A., P. Jarayabhand y V. Boonsaeng. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Molecular Marine Biology Biotechnology*, 6: 110-115.
- Tassanakajon, A., S. Pongsomboon, P. Jarayabhand, S. Klinbuga y V. Boonsaeng. 1998. Genetic structure in wild populations of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Marine Biotechnology*, 6: 249-254.
- Taw, N., S. Srisombat y S. Chandaeng. 2002. *Litopenaeus vannamei* trials in Indonesia. *Global Aquaculture Advocate*, December 2002, pp. 20-22.
- Vignal, A., D. Milan, M. San Cristobal y A. Eggen. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, 34: 275-305.

- Williams, J. G.K., A.R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski y A.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified arbitrary primer are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- Welsh J., M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.
- Woodward, S.R., J. Sunweeks y C. Teusher 1992. Random sequence oligonucleotide primers detect polymorphic DNA products which segregate in inbred strains of mice. *Mammalian Genome*, 3: 73-78.
- Wyban, J.A., y J.N. Sweeney. 1991. Intensive shrimp production technology. High Health Aquaculture Inc., Hawaii. 158 pp.
- Wyban, J. 2002. White shrimp boom continues. *Global Aquaculture Advocate*, December 2002, pp. 18-19.
- Yeh, F.C., y R.-C. Yang, T. Boyle, Z.-H. Ye y J.-X. Mao. 1999. PopGene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre. University of Alberta. Canada.

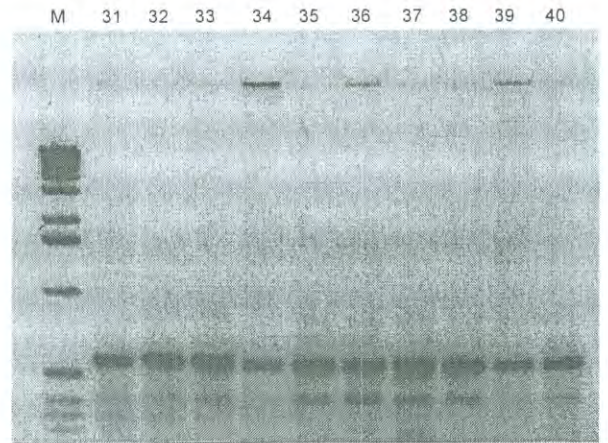
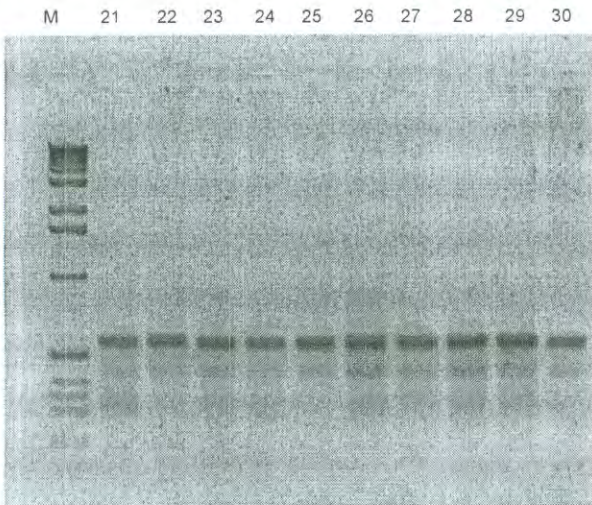
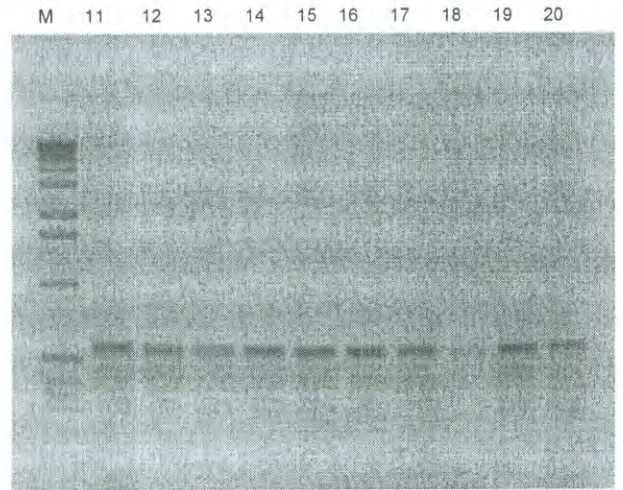
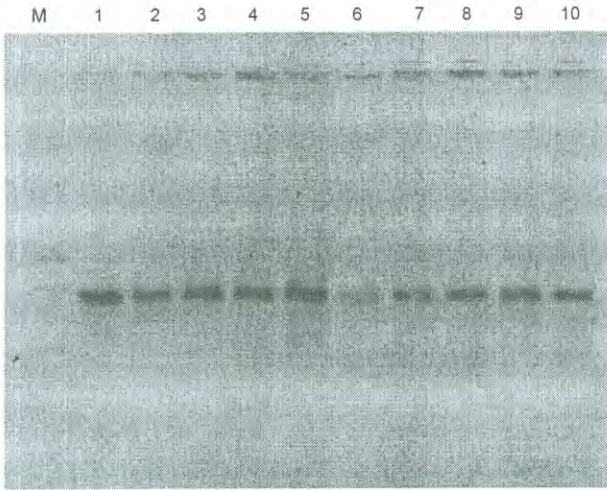
IV.- ANEXOS.

Anexo 1. Producto de amplificación de los tres linajes y de la muestra silvestre de *Penaeus vannamei* usando el primer OPA09.

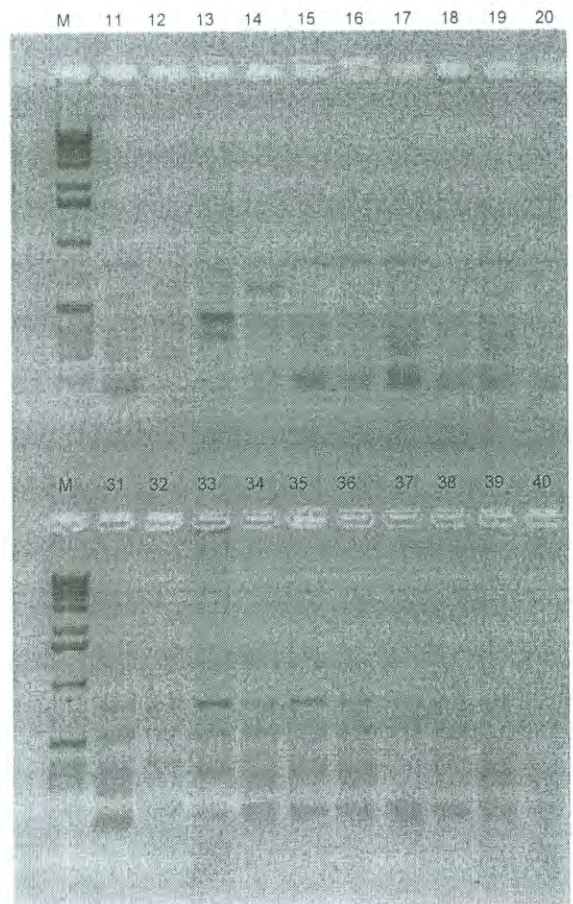
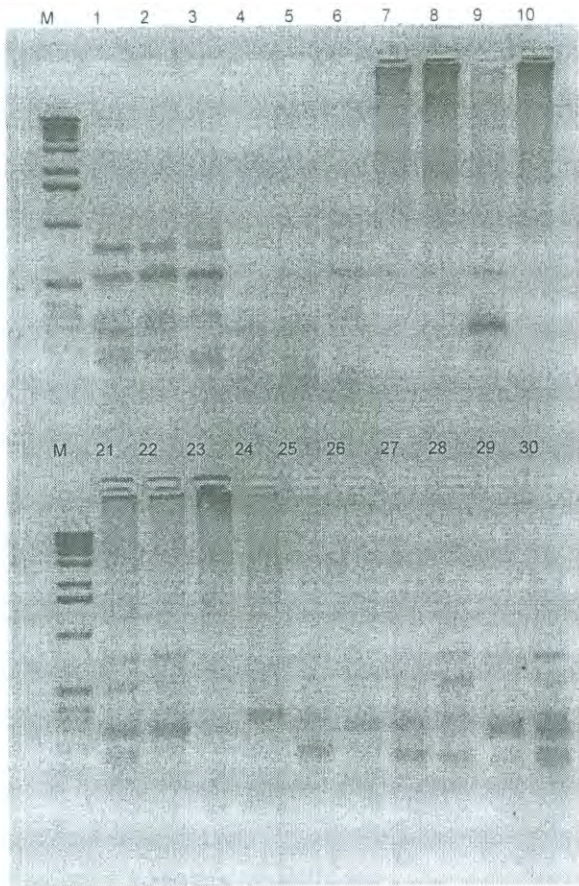
Linaje A.



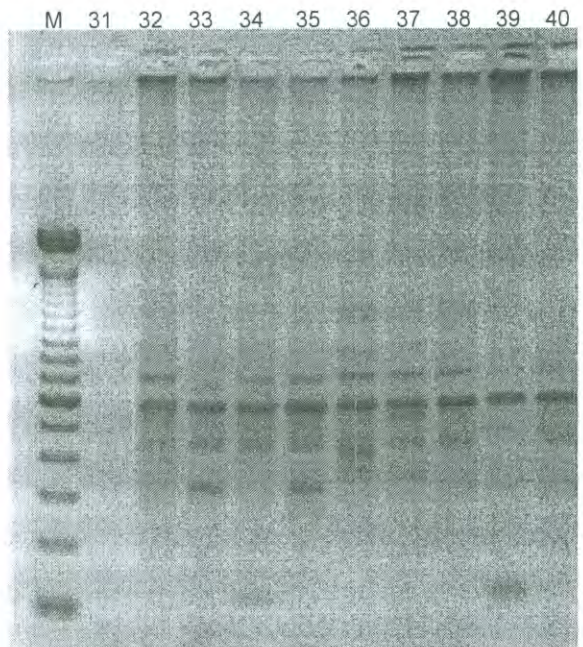
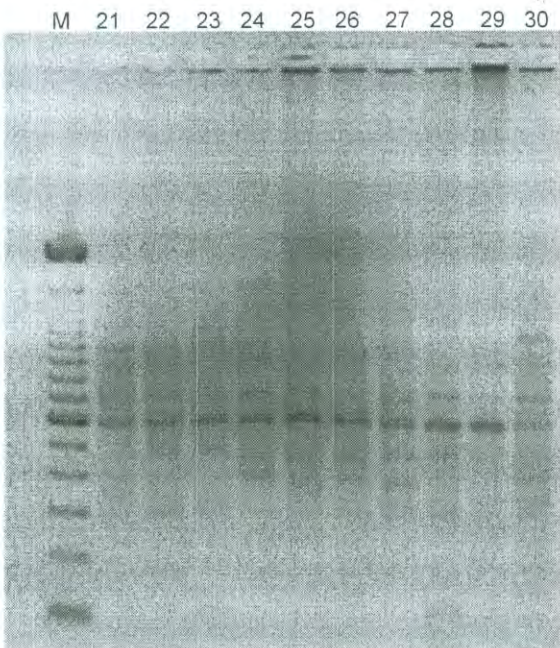
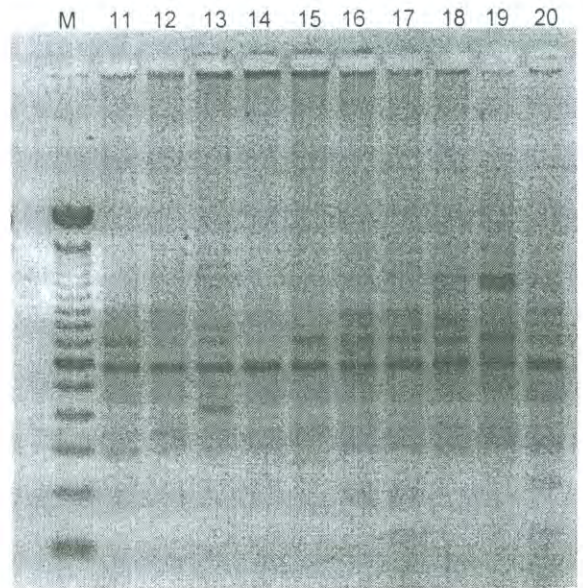
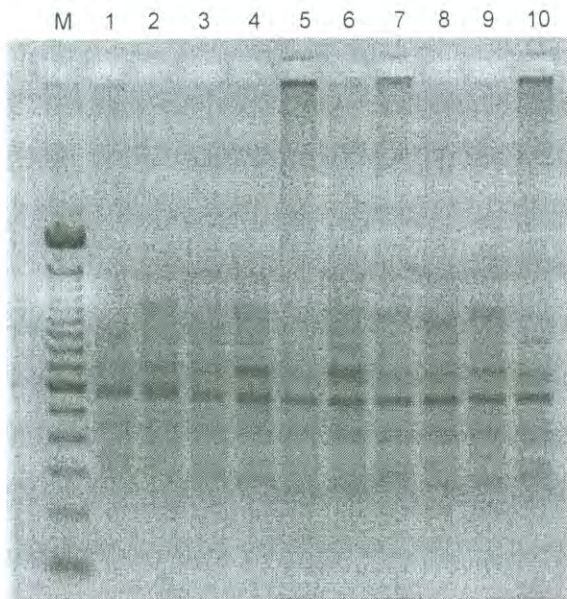
Linaje B.



Linaje C.

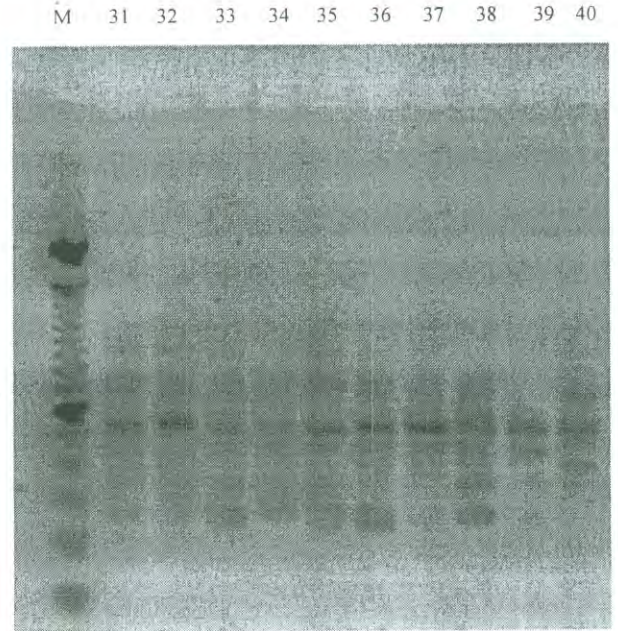
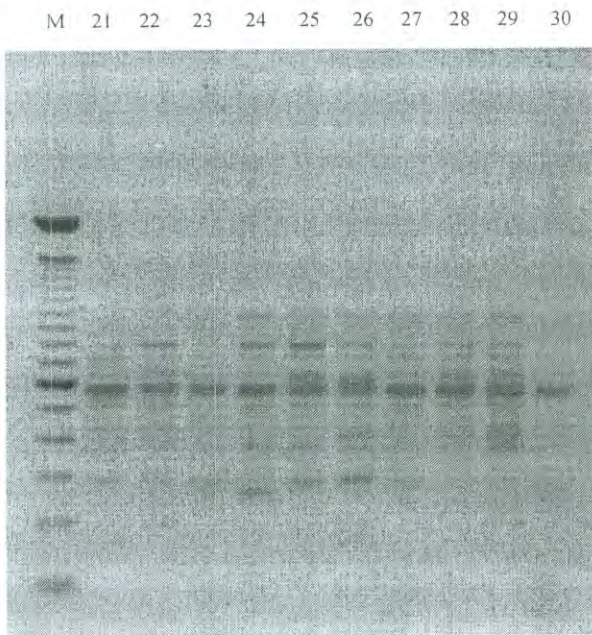
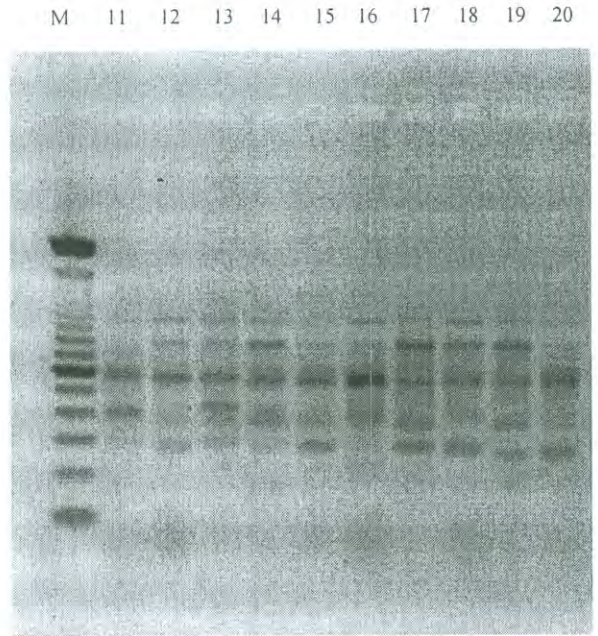
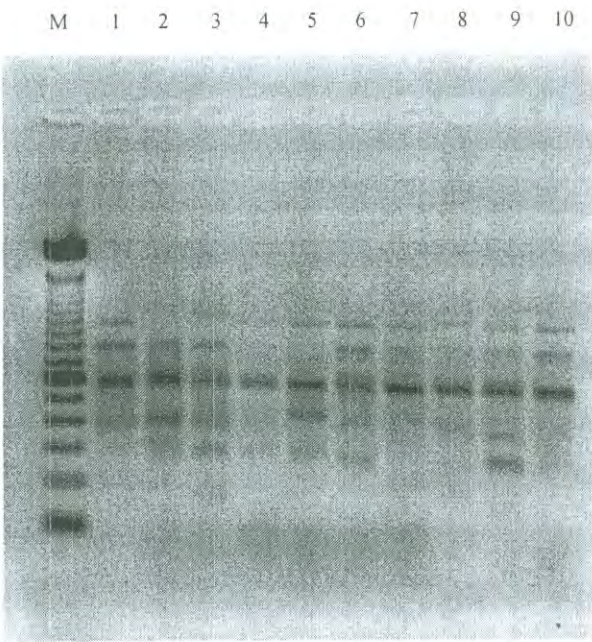


Silvestre.



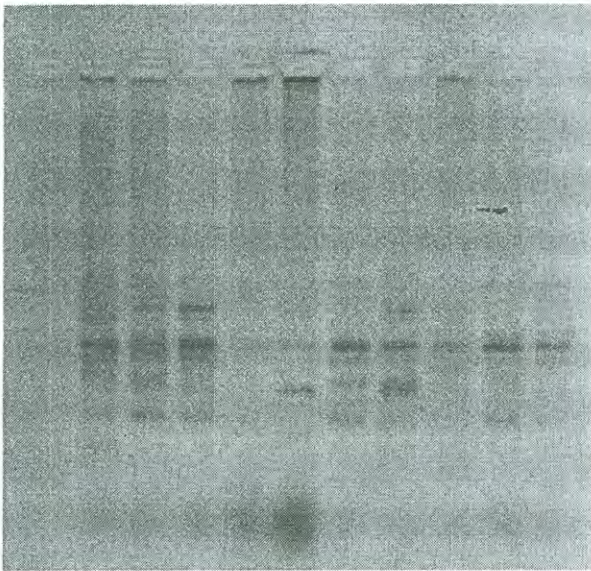
Anexo 2. Producto de amplificación de los tres linajes y de la muestra silvestre de *Penaeus vannamei* usando el primer OPA10.

Linaje A

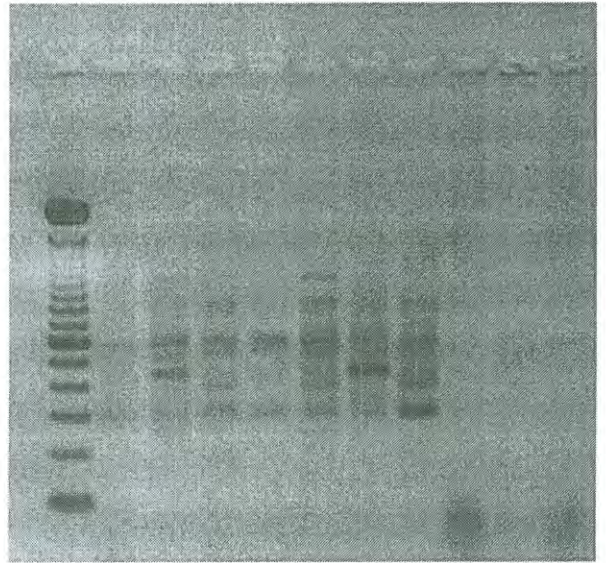


Linaje B.

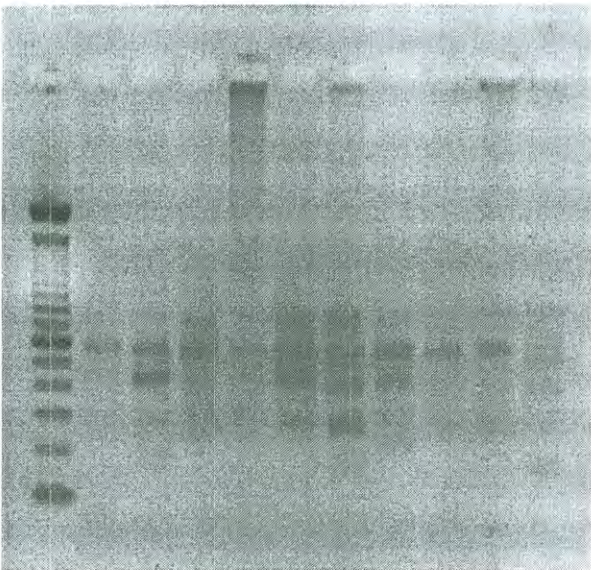
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



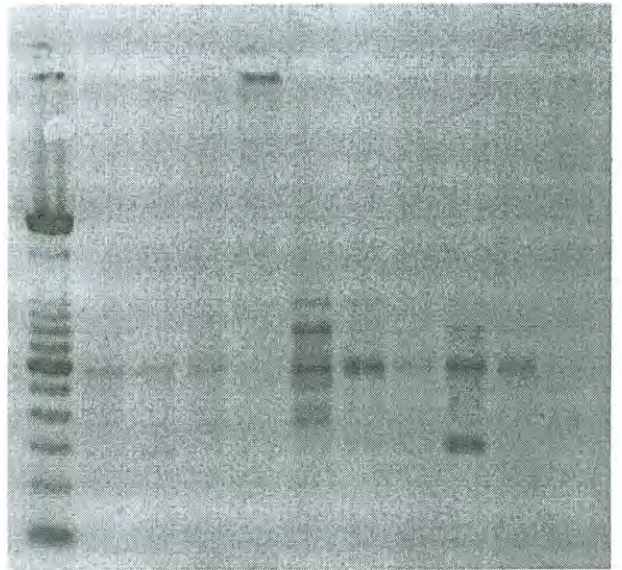
M 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

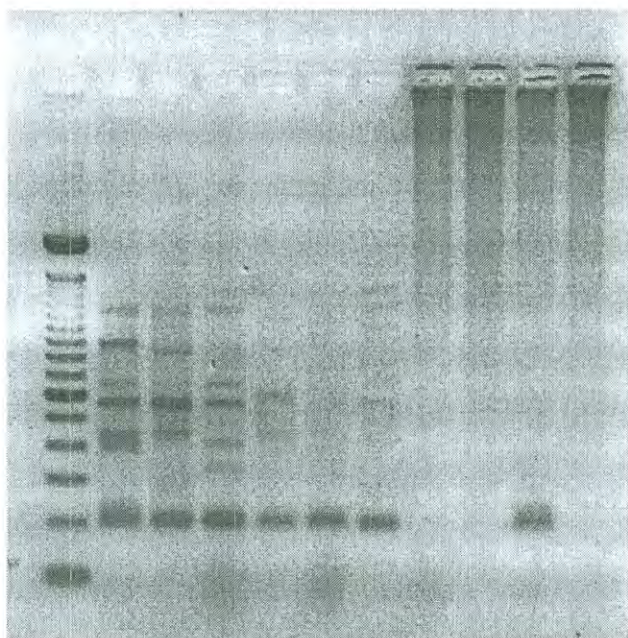


M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

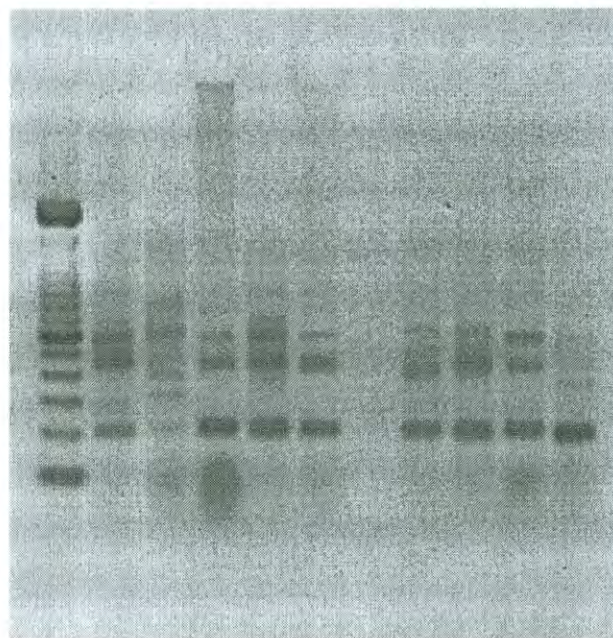


Linaje C.

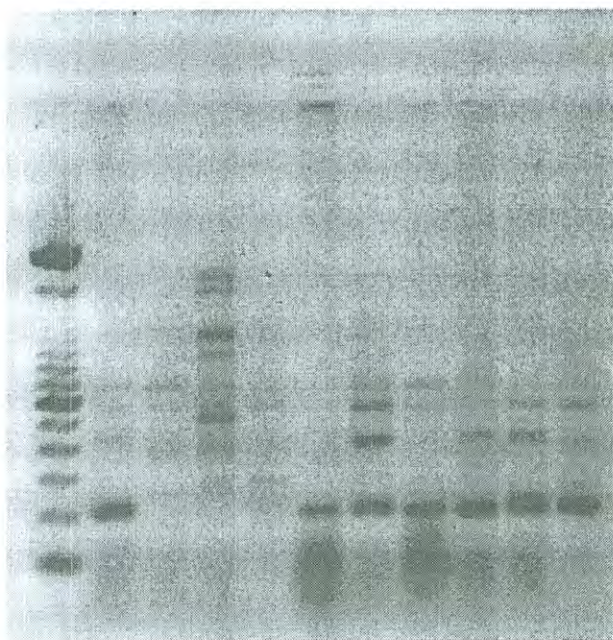
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



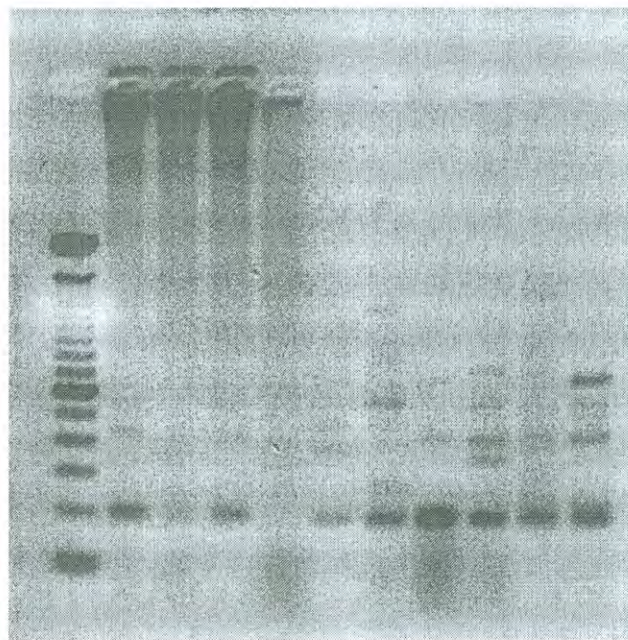
M 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



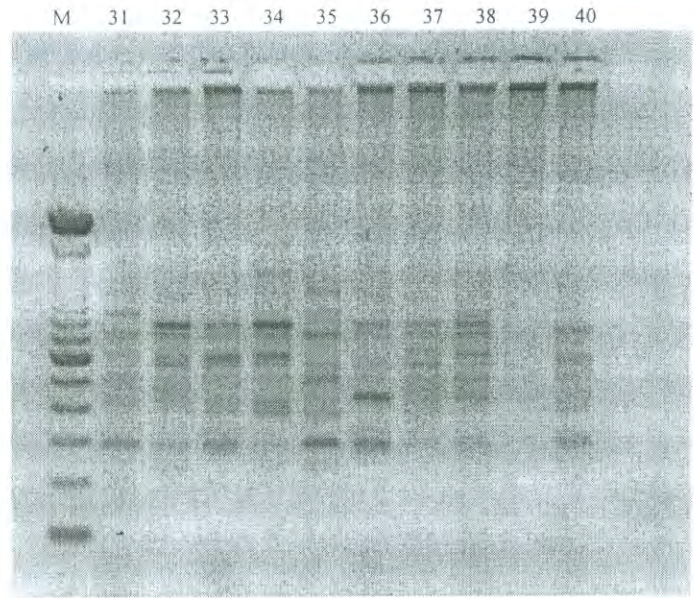
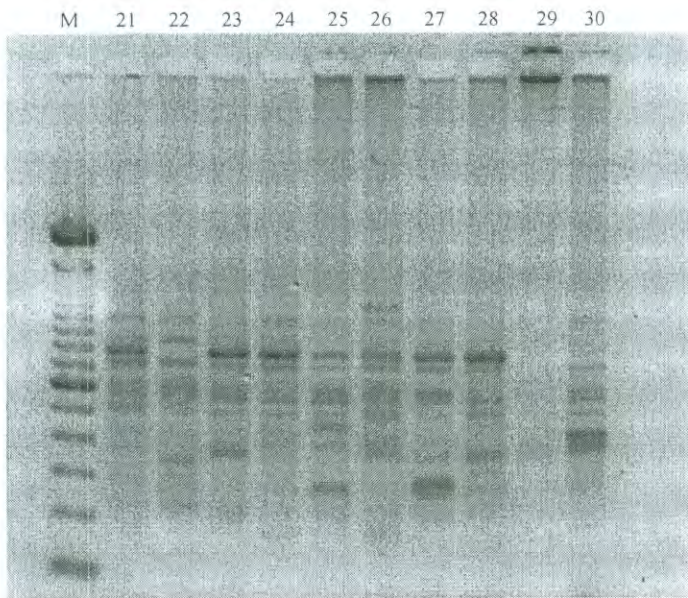
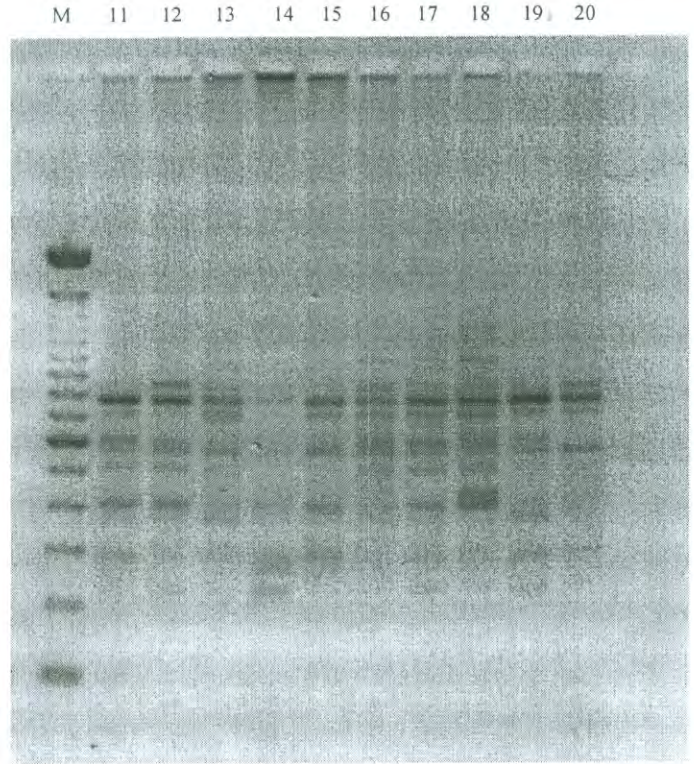
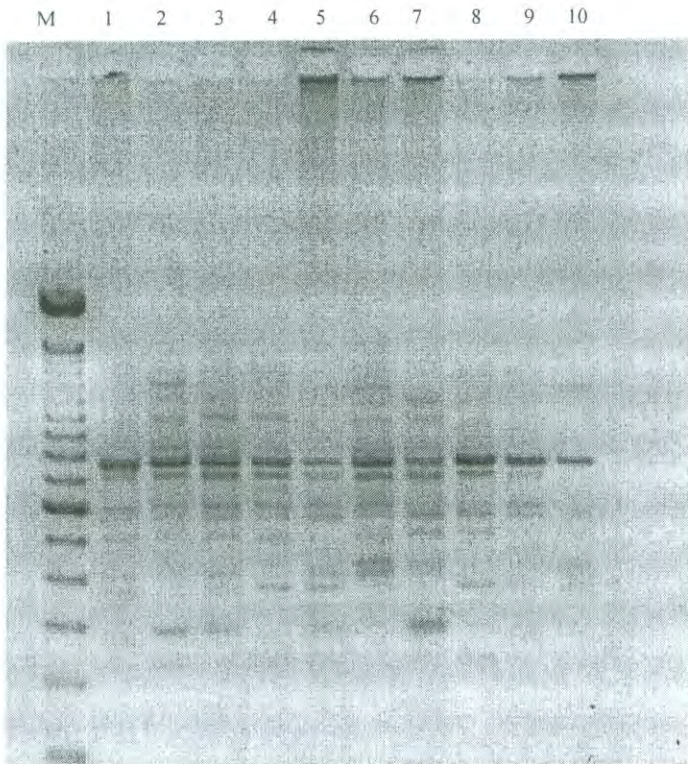
M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40



Silvestres.

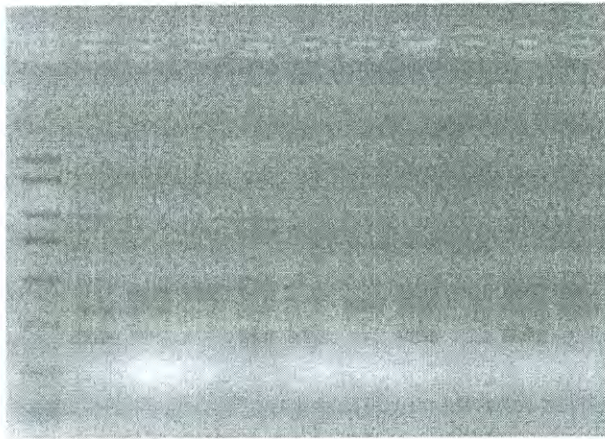
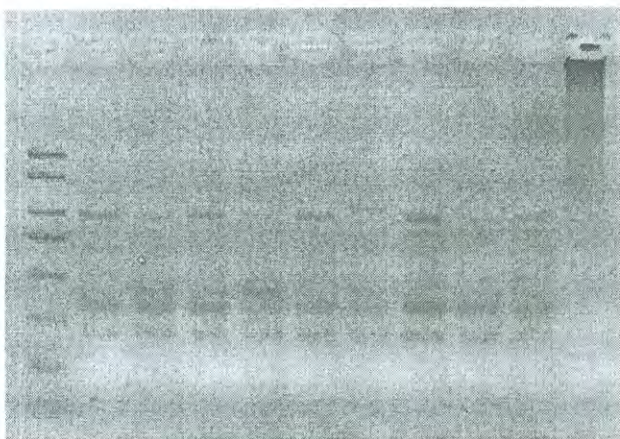


Anexo 3. Producto de amplificación de los tres linajes y de la muestra silvestre de *Penaeus vannamei* usando el primer OPA20.

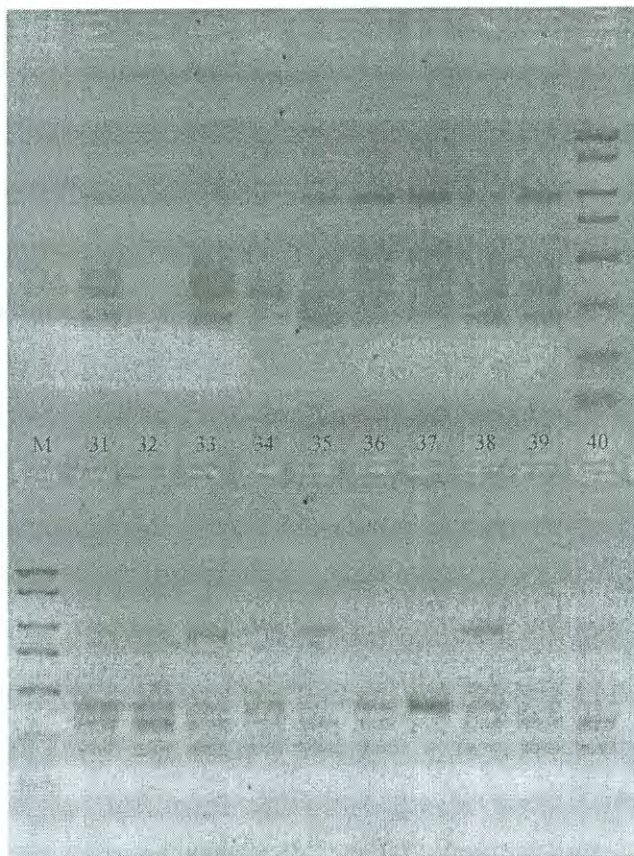
Linaje A

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

M 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

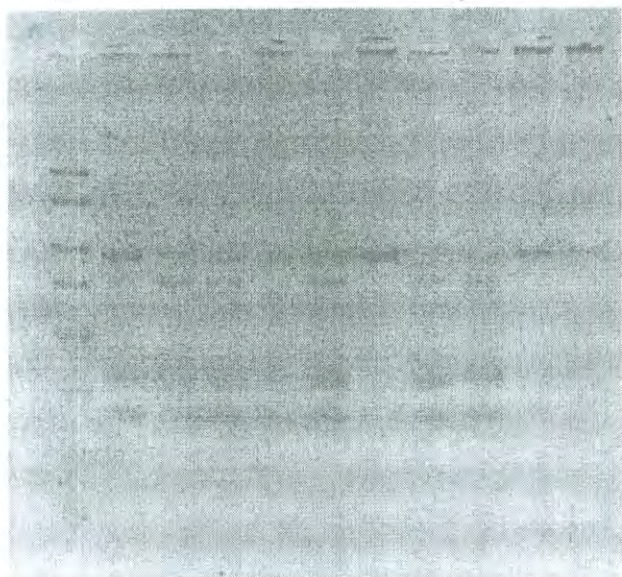


21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M

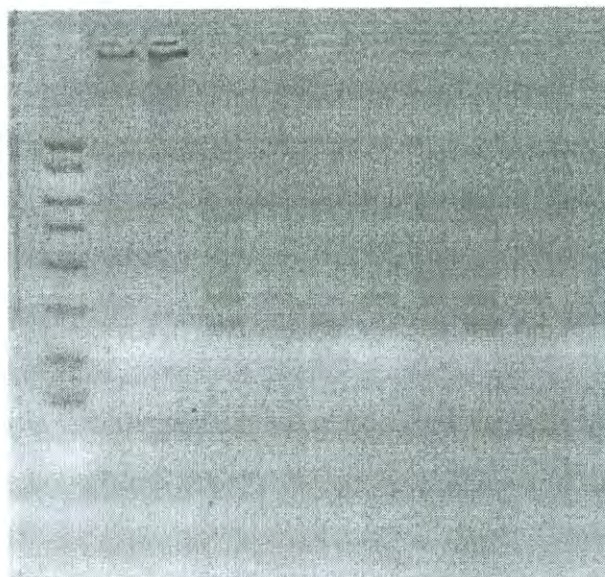


Linaje B

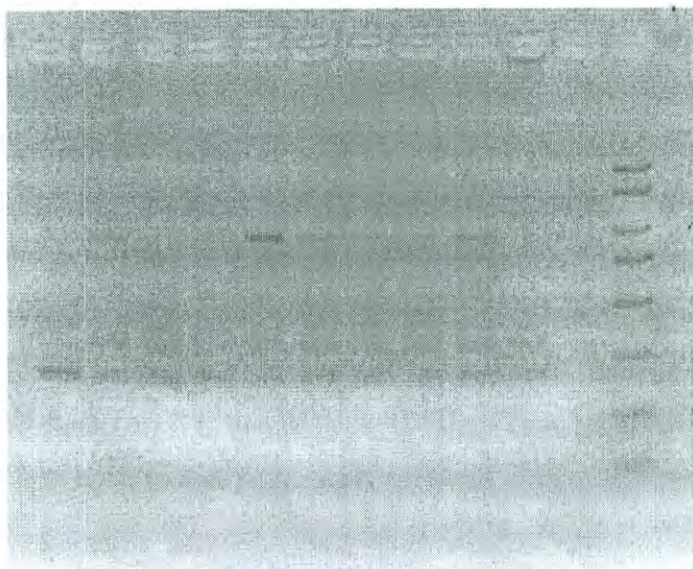
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



M 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



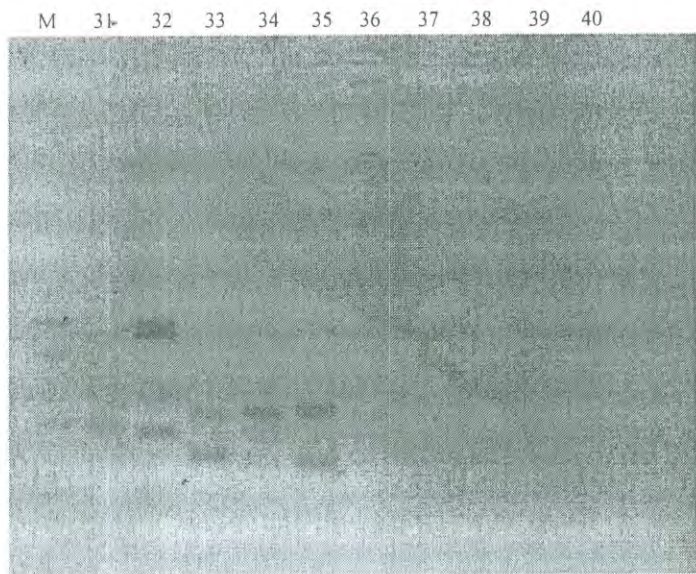
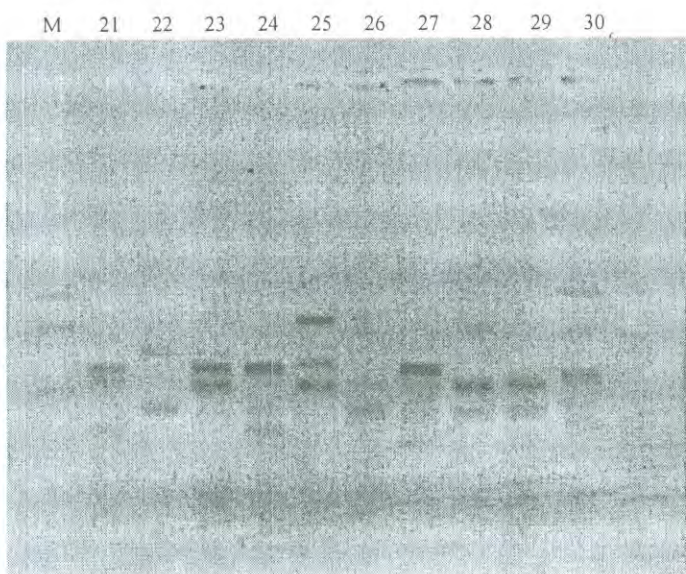
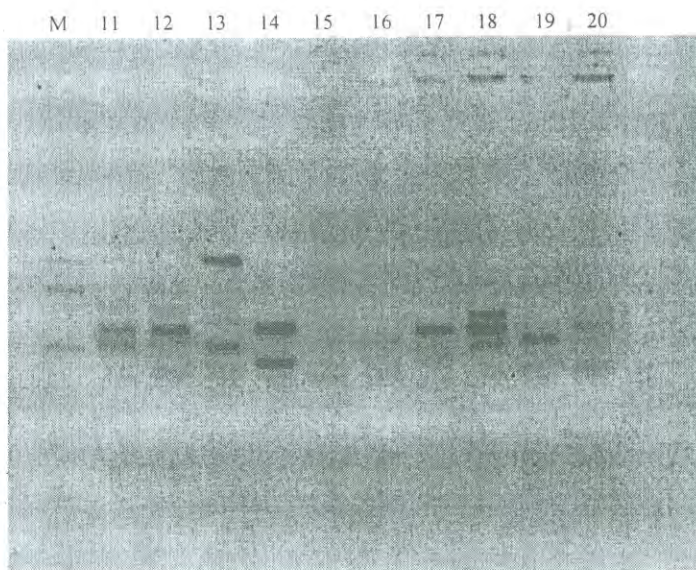
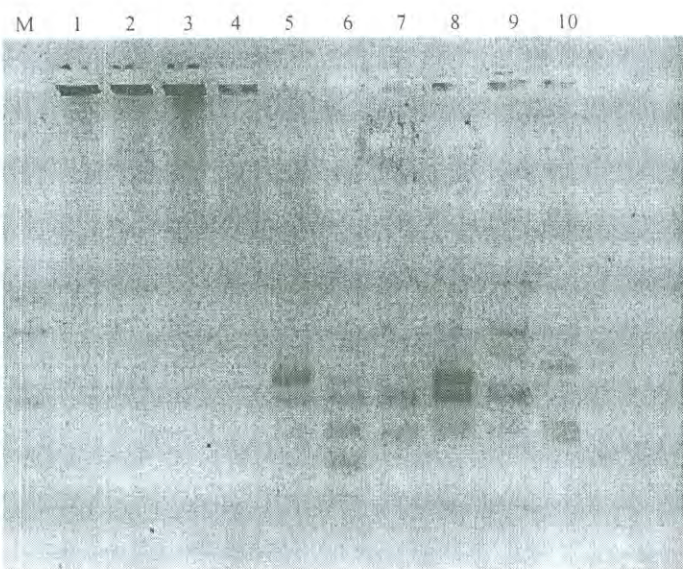
21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M



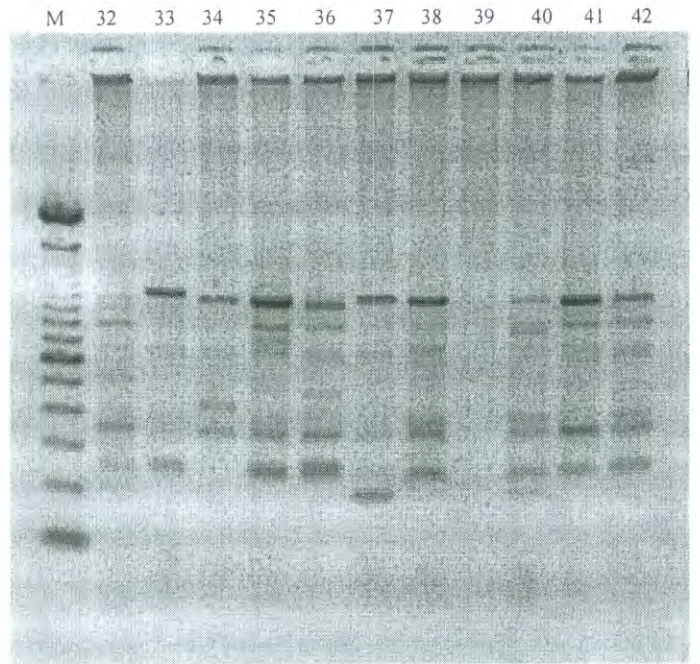
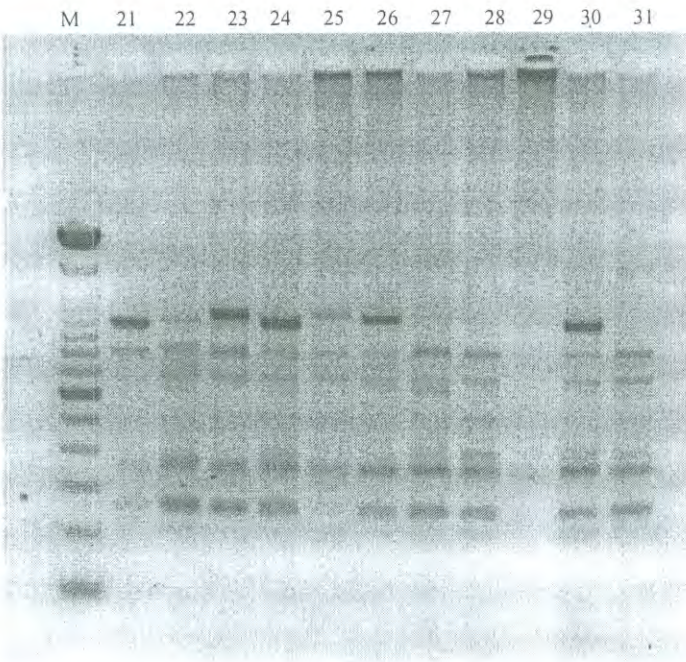
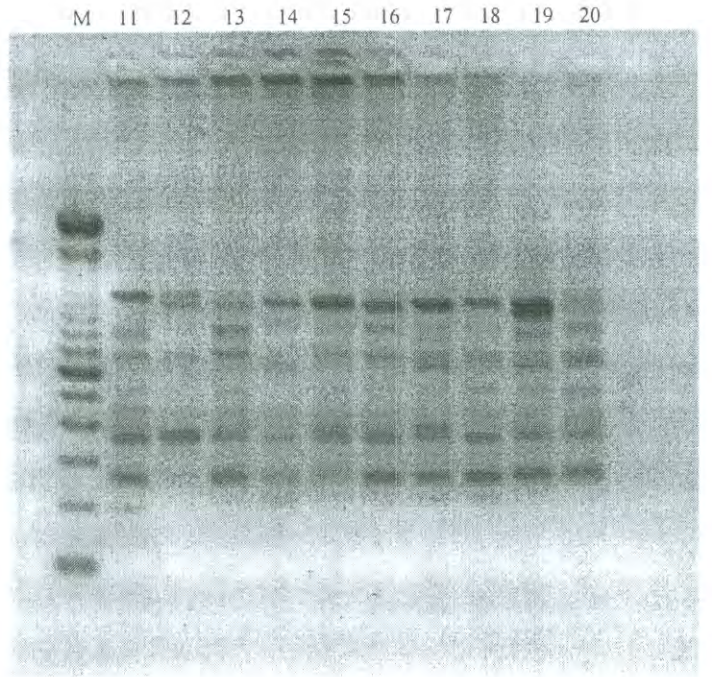
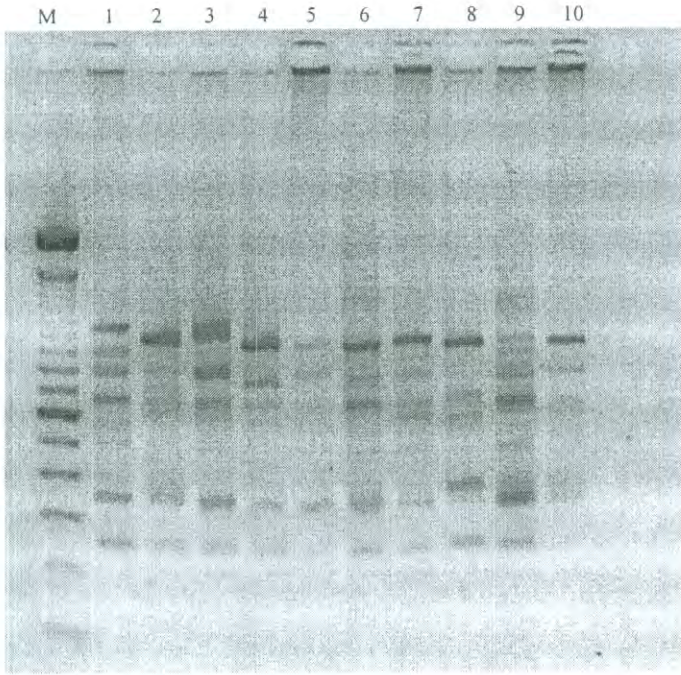
M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40



Linaje C.

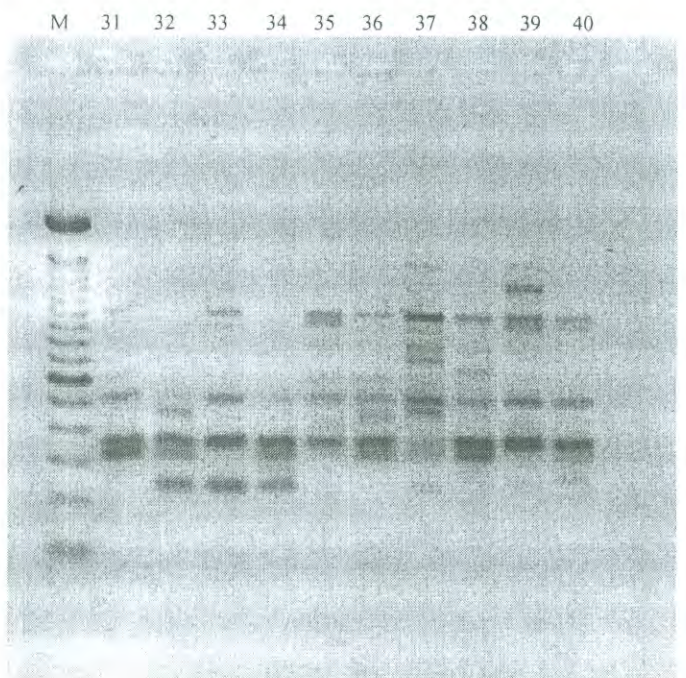
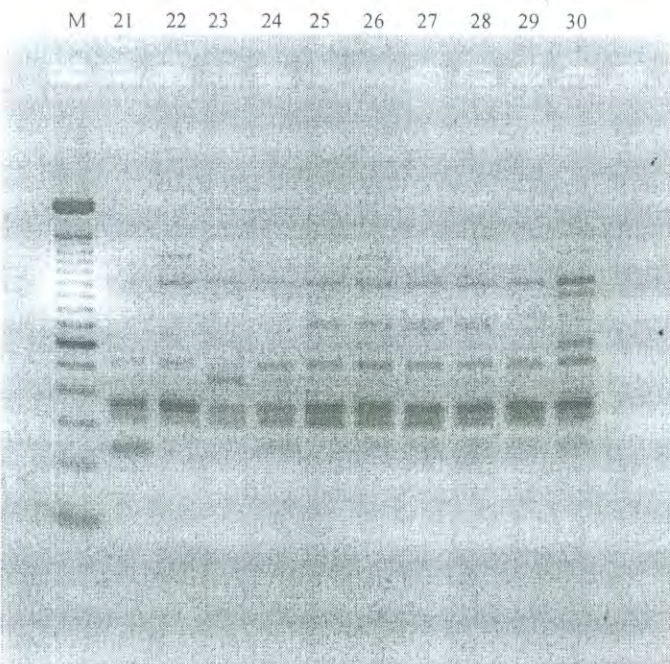
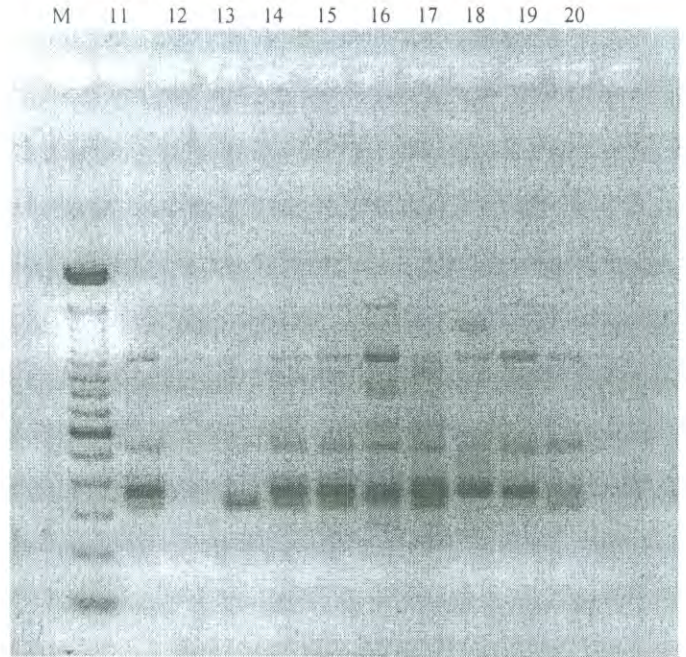
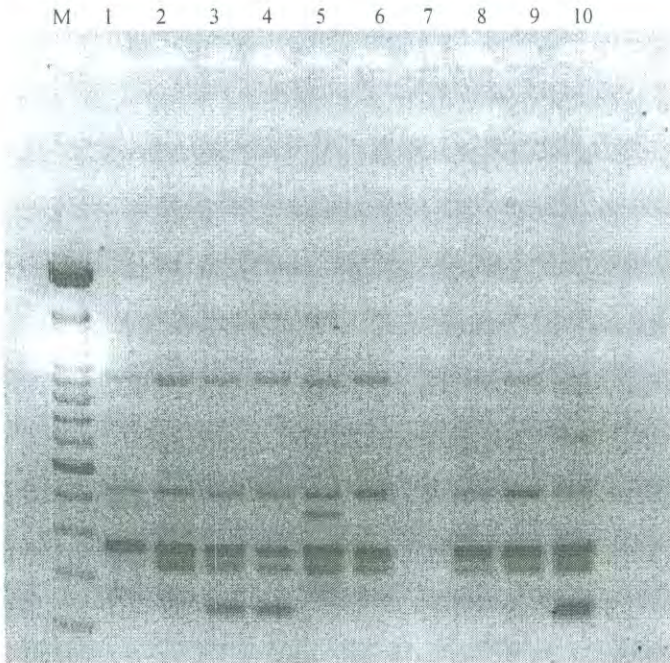


Silvestre.



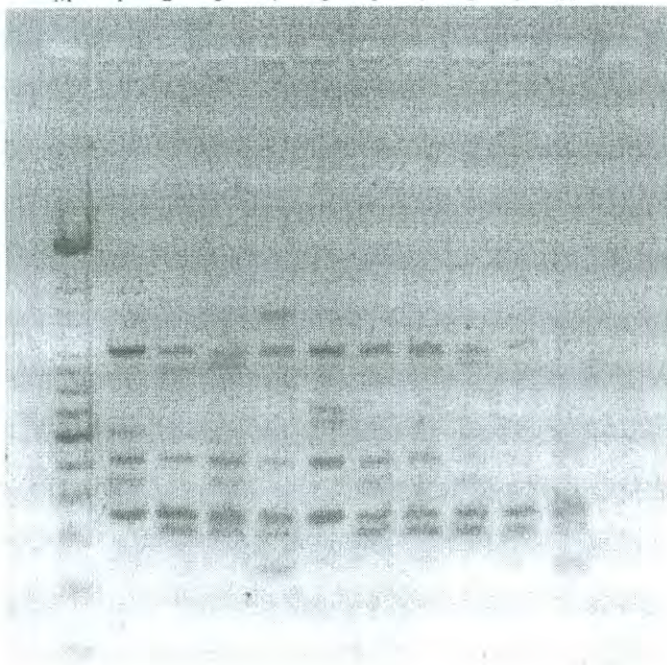
Anexo 4. Producto de amplificación de los tres linajes y de la muestra silvestre de *Penaeus vannamei* usando el primer OPB20.

Linaje A.

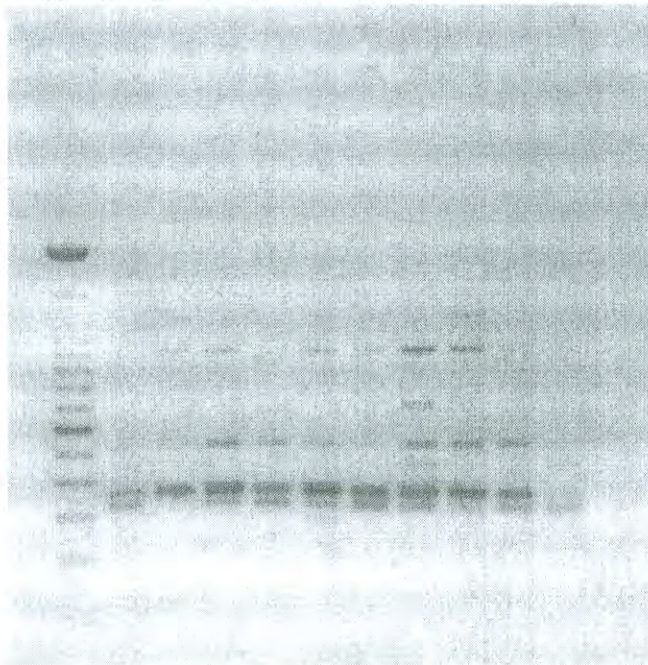


Linaje B.

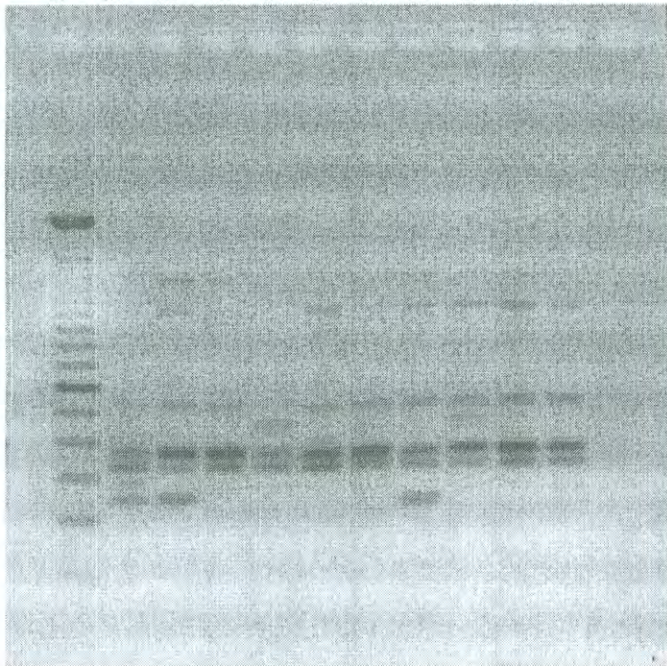
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



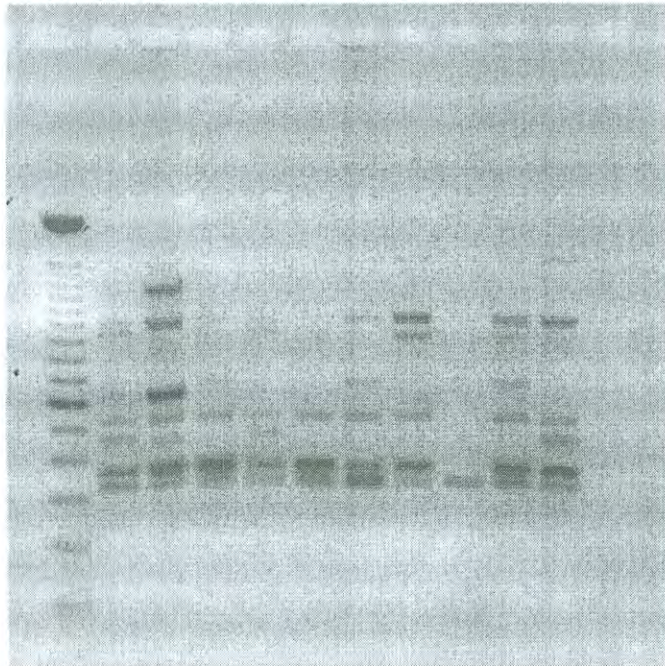
M 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



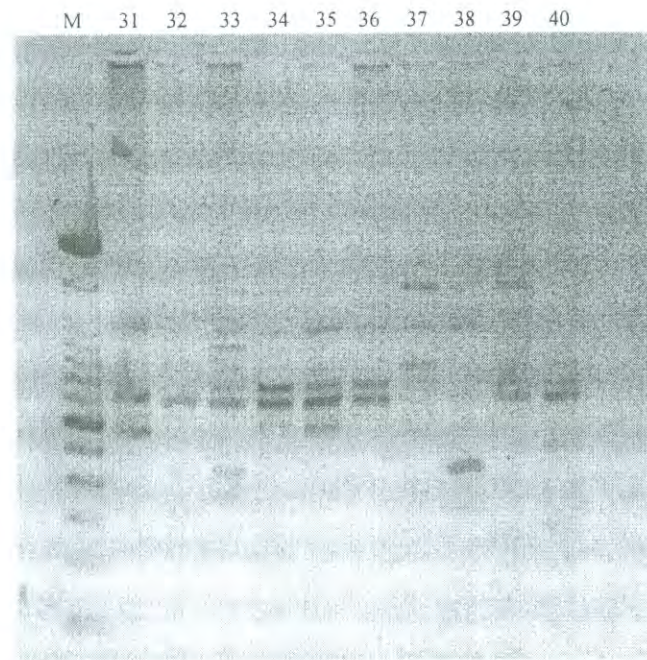
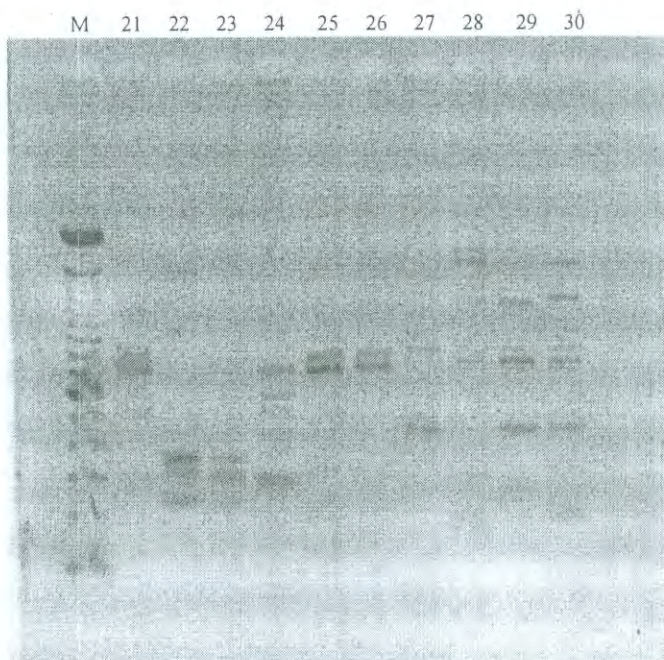
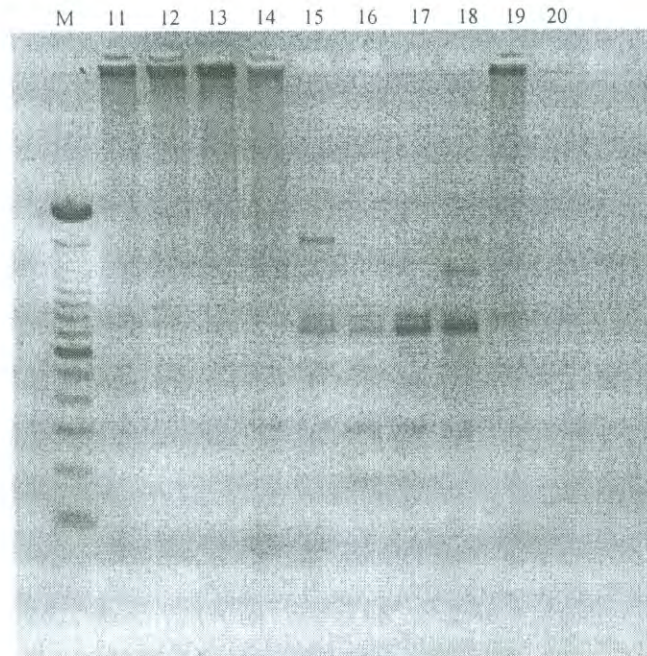
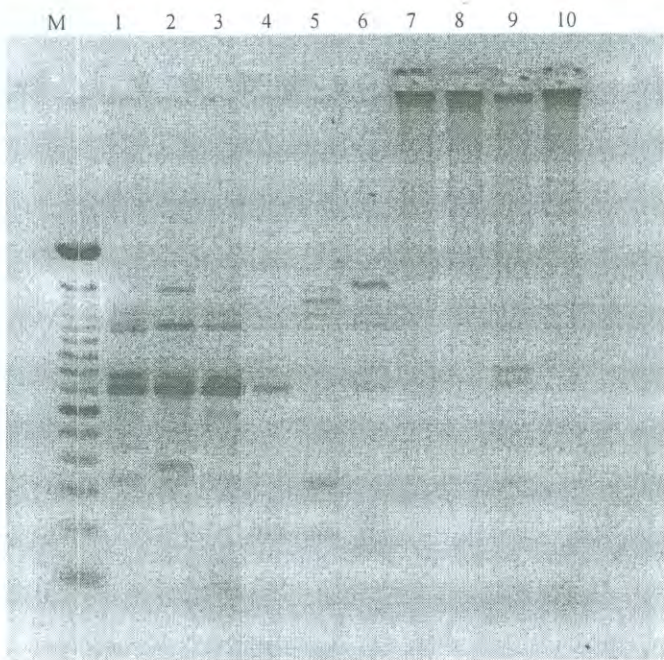
M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



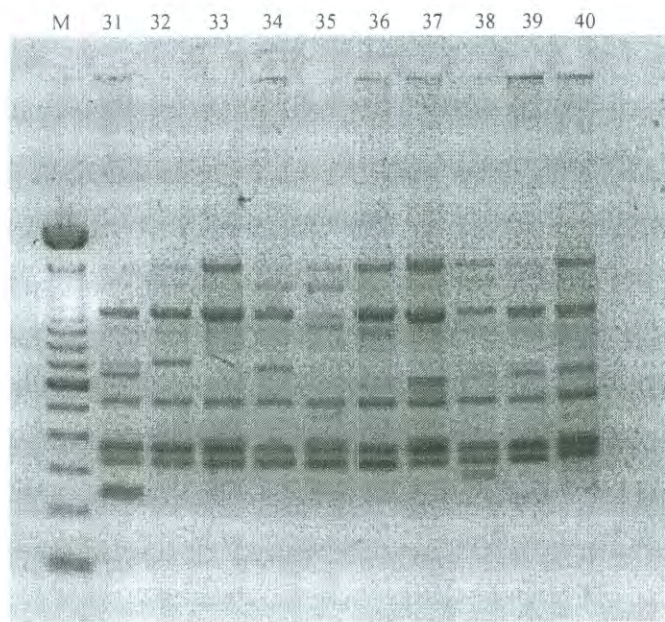
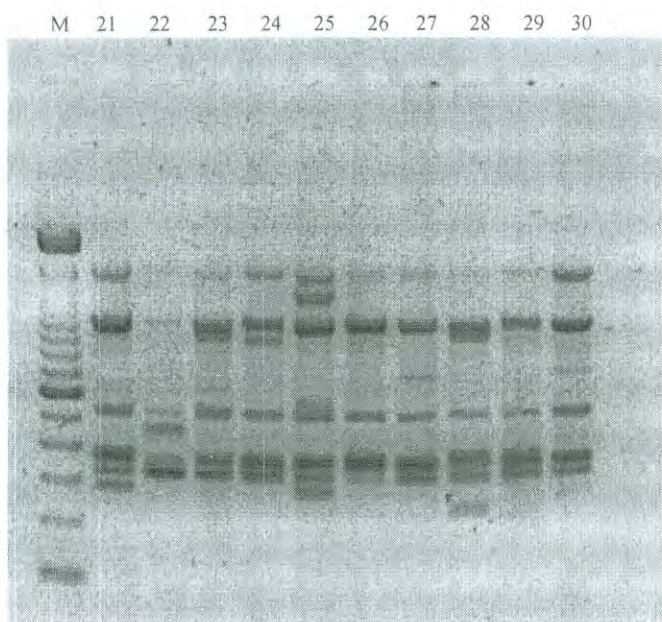
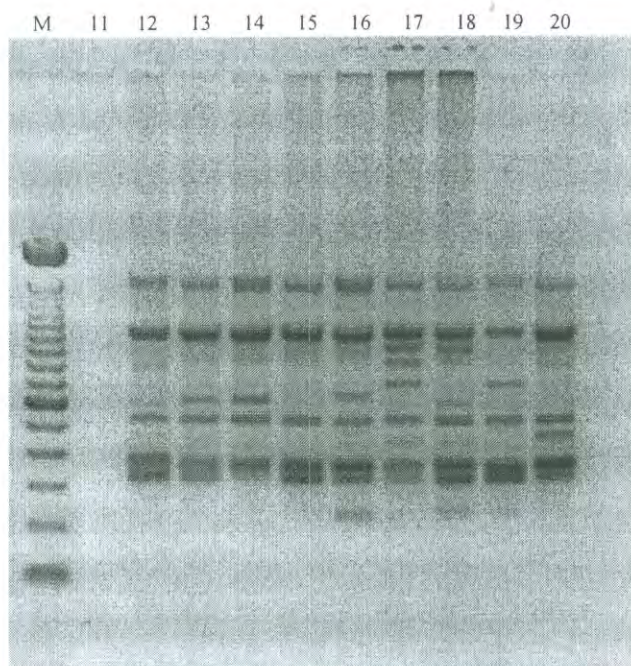
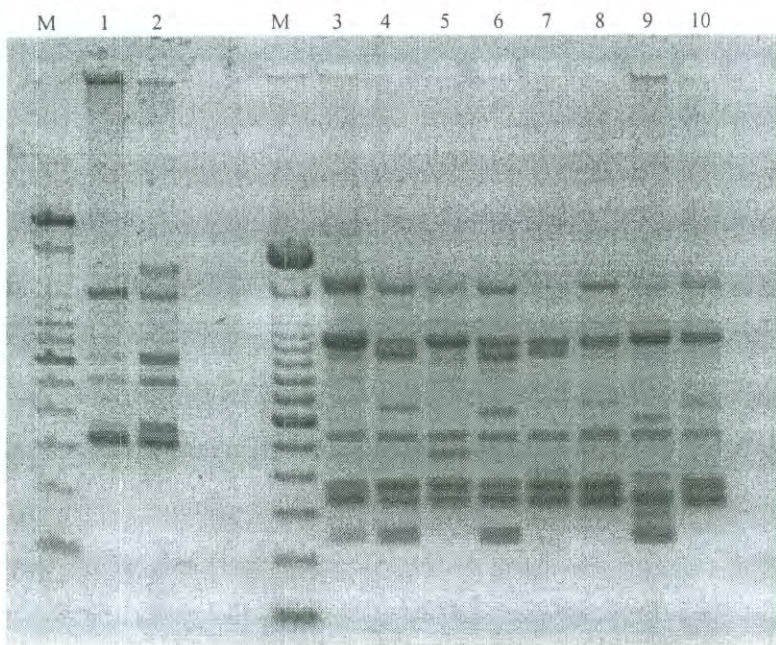
M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40



Linaje C.



Silvestre.



Anexo 5. Matriz binaria de datos del linaje A. Cada columna representa los loci presentes (1) o ausentes (0) para cada primer.

OPA09					OPA10					OPA20					OPB20															
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0			
0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1		
0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1		
0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	

