



**ESTUDIO DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE CAMARÓN BLANCO
Litopenaeus vannamei DEL PACIFICO NARIÑENSE MEDIANTE LA TÉCNICA RAPD**

STUDY OF GENETIC DIVERSITY IN POPULATIONS OF WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei* NARIÑO PACIFIC BY RAPD TECHNIQUE

Jesús Adriano Romo-Ramos^a <https://orcid.org/0000-0002-8877-809X>
 Pablo A. Coral-Chachinoy^b <https://orcid.org/0000-0002-8794-2695>
 Álvaro Javier Burgos-Arcos^c <https://orcid.org/0000-0001-7329-8766>

^a Profesor Departamento de Química, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. jesusromor@udenar.edu.co

^b Químico, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. pablokoral@gmail.com

^c Profesor Departamento de Recursos Hidrobiológicos, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.
abjar1963@gmail.com

Recibido: 19-03-2019

Aceptado: 11-06-2019

RESUMEN

Se estimó la variabilidad genética de cuatro poblaciones de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de la costa Pacífica del departamento de Nariño (región de Tumaco), mediante el marcador genético RAPD a partir de cuatro iniciadores. Se seleccionó tres poblaciones naturales (Salahonda, Curay y La Ensenada de Tumaco), además de una población de cultivo (La Carbonera). Los resultados mostraron un número de alelos diferentes (N_a) entre 1,013 y 1,178 con porcentajes de polimorfismo entre 49,04% y 55,41%. Los valores de G_{st} y Φ_{PT} indican que existen diferencias genéticas entre las poblaciones estudiadas. El análisis de Φ_{PT} entre pares de poblaciones y las distancias genéticas de Nei mostraron que la población que presentó mayor diferenciación genética fue la población de cultivo de La Carbonera, mientras que las poblaciones más similares fueron las poblaciones naturales de La Ensenada y Salahonda. La población de Curay presentó la mayor diferenciación entre las poblaciones naturales. El análisis de varianza molecular AMOVA indicó que la variabilidad encontrada se debe en mayor porcentaje (58%) a las diferencias intrapoblacionales mientras que un menor porcentaje de variación (42%) se debe a las diferencias interpoblacionales.

Palabras clave: camarones peneidos, *Litopenaeus vannamei*, RAPD, Tumaco

ABSTRACT

The genetic variability of four populations of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) of Pacific Nariño Department coast (Tumaco region) by the genetic marker from four RAPD primers were estimated. Three natural populations (Salahonda, Curay, and La Ensenada de Tumaco) were selected, along with a hatchery population (La Carbonera). The results showed a number of different alleles (N_a) between 1.013 and 1.178, with polymorphism rates between 49.04% and 55.41%. G_{st} values and Φ_{PT} indicate that there are genetic differences between the populations studied. Φ_{PT} analysis between pairs of populations and Nei distances showed that the population on had higher genetic differentiation was hatchery

Artículo de Investigación

population of La Carbonera. In contrast, the most similar populations were the natural populations of La Ensenada and Salahonda. Curay population showed greater differentiation between natural populations. Analysis of molecular variance AMOVA indicated that the variability found is due to a greater percentage (58%) to differences within-population, while a smaller percentage change (42%) is due to inter-population differences.

Keywords: penaeid shrimps, *Litopenaeus vannamei*, RAPD, Tumaco

INTRODUCCIÓN

La bahía de Tumaco ubicada en la Costa Pacífica de Colombia presenta una gran diversidad de especies marinas, entre las que se destaca el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, la cual es aprovechada tanto para la pesca industrial como para su cultivo en grandes estanques.

La industria camaronera, en los últimos años, ha enfrentado graves problemas que han amenazado la producción. Enfermedades infecciosas, especialmente el síndrome de la mancha blanca (WSSV) han diezmando las poblaciones. Fenómenos medioambientales como la sobreexplotación, presencia de contaminantes y variaciones en la calidad del agua, han conducido a que se deban implementar estrategias que permitan contrarrestar estas amenazas, como la domesticación de animales por medio de la generación de cultivos en ciclo cerrado, la creación de programas para la selección de animales como base de cría y mejoramiento genético y la implementación de un nuevo modelo tecnológico para la producción intensiva.^[1]

Como una etapa previa para el desarrollo de programas de domesticación y de mejoramiento genético, es necesario conocer la estructura genética de las poblaciones que han sido identificadas para mejorar, al igual que los marcadores genéticos que permitan identificar ca-

racterísticas específicas de poblaciones y monitorear su heredabilidad. Además, permiten predecir la presencia de los caracteres deseados en el animal, aun cuando no puedan observarse fácilmente y conocer desde los primeros estadios de crecimiento, si la característica deseada ha sido heredada, ya que el análisis se hace en el genoma que, en términos reales, permanece inalterado durante toda la vida del organismo^[2].

El objetivo del presente estudio fue generar información sobre la variabilidad genética de algunas poblaciones (naturales y de cultivo) de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en la costa Pacífico Nariñense, especialmente del municipio de Tumaco, utilizando el marcador genético RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), con el fin de utilizar estos resultados preliminares en el aprovechamiento de poblaciones en programas de mejoramiento genético, que permitirán determinar características heredables relacionadas con mayor resistencia a enfermedades y mayor crecimiento.

La técnica RAPD se caracteriza especialmente por ser relativamente barata, confiable y rápida, puede ser utilizada para el análisis poblacional en un alto número de individuos, siempre y cuando se conserven las condiciones de amplificación.^[3, 4]

MATERIALES Y MÉTODOS

Los sitios de muestreo de las poblaciones naturales están ubicados en La Ensenada de Tumaco, Salahonda y Bocas de Curay, debido a que son las regiones de pesca más comunes. Con el fin hacer una comparación de las características genéticas de poblaciones naturales

con camarón de cultivo que se produce en esta región, se incluyó una población de la camaronera La Carbonera ubicada aproximadamente a 5 km de la ciudad de Tumaco, en el departamento de Nariño, república de Colombia (Figura 1).

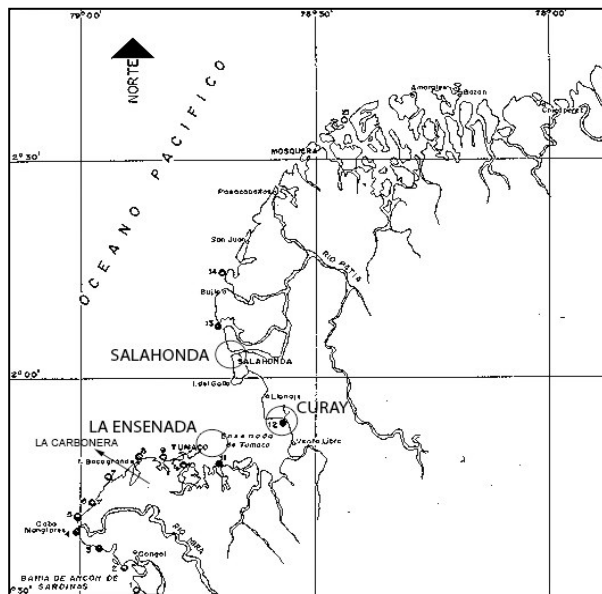


Figura 1. Localización geográfica de los sitios de muestreo. (Instituto Geográfico Agustín Codazzi)

Las muestras de ADN se extrajeron de los pleópodos, utilizando el protocolo reportado por Aljanabi y Martínez [5], con algunas modificaciones realizadas por los autores. La integridad y concentración del ADN se verificó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (Agarose ITM AMRESCO) al 1% en TBE 0,5X (Tris base (5,4%PV), ácido bórico (2,75% P/V) y EDTA 0,5 M (2% V/V) y cuantificación espectrofotométrica. Se utilizó el procedimiento de cuantificación reportado por el CIMMYT [6] con algunas modificaciones. Fueron seleccionados 10 oligonucleótidos iniciadores procedentes de diferentes estudios con camarones de distintas especies [7, 8, 9], por su capacidad para generar perfiles de RAPD buenos y reproducibles. Los iniciadores usados fueron: 1-F (5'-TCA CGA TGC-3'), 2-R (5'-TGC TCA CTG-3'), 3-F (5'-ACG GTA CAC T-3'), 4-R (5'-AGG CCG CTT A-3'), 5-F (5'-AAT GTC GCC A-3'), 6-R (5'-TGT CAG CGG T-3'), 7-F (5'-CCC AAG GTC C-3'), 8-R (5'-GGT GCG GGA A-3'), 9-F (5'-CCA GAT GCA C-3') y 10-R (5'-GTG ACA TGC C-3').

Los RAPDs se obtuvieron siguiendo la metodología propuesta por Valerio-García y Grijalva-Chon [10] con algunas modificaciones. Se

efectuaron pruebas piloto para determinar las mejores condiciones de amplificación y reproducibilidad, tomando tres muestras de cada población, las cuales se probaron por triplicado, utilizando una muestra adicional de ADN de *Colletotrichum spp* para verificar la correcta amplificación. Los valores del contenido de %GC y la temperatura de fusión (TM) de los iniciadores se calcularon utilizando el programa Khirshyat 1.0 [11]. Se prepararon 15 μ L de mezcla de reacción final, con la siguiente concentración de reactivos: dNTPs 0,4 mM, MgCl₂ 3 mM, Iniciador 1 μ M, Taq polimerasa 0,13 U/ μ L, ADN genómico 2 ng/ μ L y H₂O. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 60s, 40 ciclos de amplificación con desnaturalización a 92°C por 60s, hibridación a 38 °C por 75s y extensión a 72 °C por 60s. La extensión final se realizó a 72°C por 15 min.

Los productos de amplificación se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio con concentración final de 0,5% en TBE 0,5X (Tris base (5,4%PV), Ácido bórico (2,75% P/V) y EDTA 0,5 M (2% V/V). En cada pozo se agregaron 5 μ L de producto de PCR con 1 μ L de buffer de carga pH=7,6 (Tris-HCl 10 mM; EDTA 10 mM), Azul de bromofenol (0,005% P/V), xylene cyanol (0,005% P/V y Glicerol (10% V/V). La electroforesis se realizó a 5 V/cm por dos horas. Los geles se fotografiaron bajo luz UV.

Los geles de agarosa fueron analizados con ayuda del programa Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems). Se estimó el tamaño molecular aproximado de cada fragmento amplificado tomando como base el tamaño de las bandas del marcador molecular GeneRuler 100 bp (Fermentas). Se tomaron en cuenta las bandas claramente identificables [12, 13]. La matriz de datos binaria se realizó bajo la inferencia de 1 como presencia y 0 ausencia de banda.

Con base en las matrices binarias se estimó la variabilidad genética utilizando los programas GenAIEx 6.5 [14] y PopGene 1.32 [15]. Para cada población se calculó las frecuencias alélicas, grado de polimorfismo, los estadísticos G_{st}, Φ_{PT} y las distancias genéticas de Nei [16].

Se realizó un análisis de AMOVA y se calculó una matriz de distancia genética para cada una de las muestras con tres coeficientes de similitud (concordancia simple, Jaccard y Dice)

con ayuda del programa NTSYSpc 2.11 [17]. Se elaboró un dendograma a partir de las distancias genéticas de Nei, utilizando el método UPGMA del programa PAST 3.05 [18].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a que la técnica de RAPD se puede realizar utilizando iniciadores aleatorios [19], se escogieron varios iniciadores de distintas especies de camarones reportados en otros estudios. De los diez iniciadores ensayados, cuatro de ellos

produjeron bandas claras y bien definidas: 4-R, 6-R, 9-R y 10-R. Mediante la selección de 30 individuos de cada población, a partir de estos cuatro iniciadores se generó un total de 480 perfiles de RAPD (*fingerprint*) (Tabla 1).

Tabla 1. Número de bandas amplificadas, rango de tamaño para los fragmentos amplificadas y porcentaje de polimorfismo por población y por iniciador para los RAPDs producidos en *L. vannamei*.

Código iniciador	4-R	6-R	9-F	10-R	Totales	
Tamaño de fragmentos (pares de bases)	150 – 2500	175 – 2500	150 - 2500	187 - 2000		
No. bandas	39	36	44	38	157	
Carbonera n=30	Bandas polimórficas	23	20	25	19	87
	% polimorfismo	58,97	55,56	56,82	50,00	55,41
Curay n=30	Bandas polimórficas	19	17	23	18	77
	% polimorfismo	48,72	47,22	52,27	47,37	49,04
Ensenada n=30	Bandas polimórficas	22	19	24	22	87
	% Polimorfismo	56,41	52,78	54,55	57,89	55,41
Salahonda n=30	Bandas polimórficas	19	13	24	26	82
	% polimorfismo	48,72	36,11	54,55	68,42	52,23
Promedio Polimorfismo (%)	53,21±2,64	47,92±4,30	54,55±0,93	55,92±4,73	53,03±1,52	

Las cuatro poblaciones generaron 157 bandas, 87 de ellas polimórficas (con un criterio del 95%) utilizando los cuatro iniciadores mencionados. El tamaño de los fragmentos amplificadas varió desde 150 a 2500 bp, mientras que el número de bandas amplificadas fue de 36 hasta 44. Un ejemplo se muestra en la Figura 2.

Utilizando los iniciadores 4-R y 6-R, Klingbunga *et al* [8] reportan un promedio de bandas por iniciador entre 13,7 y 15,3 y un polimorfismo promedio entre 46,7% y 61,4% para poblaciones de *P. monodon* en Tailandia. Por otra parte, Lakra *et al* [10] reportan un polimorfismo promedio entre 25,0% y 65,5% para poblaciones de *M. affinis* en la India, utilizando (entre

otros) los iniciadores 9-F y 10-R. Resultados similares, en cuanto a porcentaje de polimorfismo, tamaño y número de bandas, han sido reportados para poblaciones naturales y de cultivo en *L. vannamei* por diversos autores reconocidos [20, 21, 22, 23]. De igual manera se reportan resultados similares con RAPD para otras especies de camarones peneidos [24, 25, 26, 27, 28, 29].

Las poblaciones de cultivo suelen presentar menor diversidad genética que las poblaciones naturales debido a su aislamiento y, es de esperar que la variabilidad genética en este tipo de poblaciones comience a disminuir con cada generación, debido a la pérdida de heterocigosidad ocasionada en gran parte por efectos de

cuellos de botella ocasionados por el número de parentales base del cultivo y endogamia producida por deriva [22, 30].

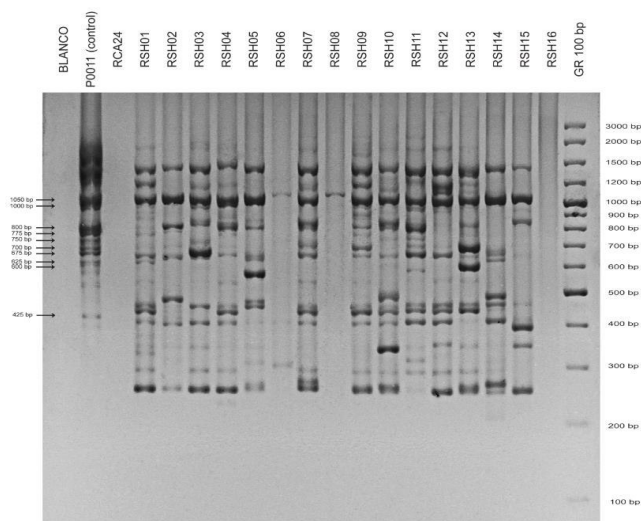


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Perfil de RAPDs de la población de Salahonda (iniciador 9-F) muestra de control de ADN de *Colletotrichum* spp (P0011).

Sin embargo, según los resultados presentados en la Tabla 2, la población de cultivo de La Carbonera presenta un número de alelos (Na)

mayor que las poblaciones naturales estudiadas, cuyo número efectivo de alelos es significativamente mayor que 1, características que se deben buscar la conservación, no sólo para los esquemas de cultivo de camarón, sino también de otras especies.

El número de alelos diferentes (Na) en las poblaciones varían desde 1,013 hasta 1,178 (Tabla 2), indicando que la población de cultivo presenta un mayor número de alelos. Los valores de Na obtenidos son similares a los reportados por Valerio-García y Grijalva-Chon [10] para poblaciones de *L. vannamei* en el Golfo de California. Los valores de G_{st} 0,348 y Φ_{PT} 0,421 encontrados, son muy similares e indican una diferenciación considerable entre las poblaciones. Los estadísticos G_{st} y Φ_{PT} constituyen medidas de diferenciación genética entre las poblaciones [31]. Debido a que RAPD es un marcador dominante, se reporta el valor de Φ_{PT}, el cual es utilizado comúnmente para marcadores dominantes o haploides [32]. Φ_{PT} es un estimativo similar a F_{st}, calculado a partir del análisis de varianza molecular (AMOVA) e indica la pérdida de heterocigosidad entre las poblaciones, ocasionada por procesos como la deriva genética o la migración [33].

Tabla 2. Parámetros genéticos por población de camarón blanco (*L. vannamei*).

	Población	Carbonera	Curay	Ensenada	Salahonda	Entre poblaciones
Parámetros genéticos	N	30	30	30	30	120
	Na	1,178±0,076	1,013±0,079	1,153±0,077	1,076±0,079	1,105±0,039
	G _{st}					0,348
	Φ _{PT}					0,421

N: número de muestras; Na: número de alelos diferentes; G_{st}: diferenciación genética de Nei (análogo a F_{st}); Φ_{PT}: diferenciación genética calculada a partir del AMOVA (F_{st} modificado).

Por tanto, lo que G_{st} y Φ_{PT} indican la existencia de una diferenciación considerable entre las poblaciones estudiadas ya que, los valores de F_{st}, G_{st} y Φ_{PT} varían teóricamente entre cero y uno, donde cero indica que no hay diferencia entre las poblaciones y uno indica una diferen-

cia completa entre las poblaciones [34]. En la mayoría de los casos G_{st} y Φ_{PT} presentan valores muy similares, tal como se observa con los valores reportados en este estudio y que permiten deducir que existen diferencias entre las poblaciones.

Artículo de Investigación

Los valores de Φ_{PT} por pares de poblaciones (Tabla 3) indican que las poblaciones más cercanas genéticamente son las de Salahonda y La Ensenada ($\Phi_{PT} = 0,186$), mientras que la población de Curay presenta la mayor diferenciación entre las poblaciones naturales (Φ_{PT} entre 0,238 y 0,504). La población de cultivo de La Carbonera presenta los mayores índices de diferenciación respecto a las demás (Φ_{PT} : 0,495 y 0,554). Las poblaciones de Salahonda y La Ensenada,

cercanas geográficamente, presentan menor diferenciación. Resultados diferentes reporta Fresneda [35] en poblaciones naturales de *L. vannamei* en la costa ecuatoriana obtenidos mediante ISSR, con valores de F_{st} en pares de poblaciones entre 0,013 y 0,051, indicando escasa diferencia entre poblaciones estudiadas. Pérez [36] también reporta un bajo índice de diferenciación (F_{st}) de 0,08 con RAPDs para el mismo tipo de poblaciones.

Tabla 3. Valores de Φ_{PT} pareados para 1000 permutaciones. Distancias genéticas (D.G.) de Nei (1978) e identidades genéticas (I.G.) de Nei (1978) entre pares de poblaciones.

	Carbonera			Curay			Ensenada		
	Φ_{PT}	D.G.	I.G.	Φ_{PT}	D.G.	I.G.	Φ_{PT}	D.G.	I.G.
Curay	0,554	0,1982	0,8202						
Ensenada	0,495	0,1663	0,8468	0,353	0,0841	0,9194			
Salahonda	0,504	0,1770	0,8378	0,238	0,0425	0,9584	0,186	0,0422	0,9586

Los resultados de distancia genética de Nei permiten apreciar una diferenciación entre las poblaciones estudiadas (Tabla 3). Las poblaciones menos diferenciadas corresponden a La Ensenada y Salahonda, mientras que la más diferenciada está en La Carbonera. La población de Curay presenta la mayor diferenciación entre las poblaciones naturales. Debido a que el incremento en la similaridad genética intrapoblacional durante sucesivas generaciones resulta en unas largas distancias genéticas interpopulacionales [37], lo cual se podría explicar la baja diversidad genética de la población de Curay y su respectiva diferenciación respecto a las poblaciones naturales de La Ensenada y Salahonda.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) indica que el 58% de la variación observada se encuentra dentro de las poblaciones estudiadas, mientras que el 42% se debe a la variación entre las poblaciones. Estos resultados son consecuentes con los mostrados por los estadísticos G_{st} y Φ_{PT} , indicando que las cuatro poblaciones estudiadas tienen una diferenciación genética evidente.

Los valores de Φ_{PT} entre pares de poblaciones son congruentes con el dendrograma de distancias genéticas de Nei (Figura 3). La distribución observada en las tres agrupaciones indica cierta diferenciación de la población de cultivo de La Carbonera y de la población natural de Curay. Además, se observa que la población de Curay es la que presenta la mayor diferenciación entre las poblaciones naturales.

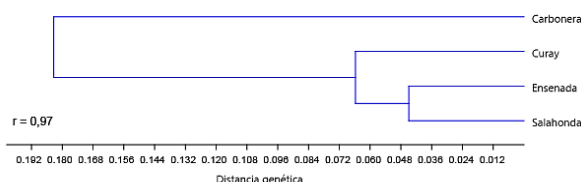


Figura 3. Dendrograma de las distancias genéticas de Nei (método UPGMA).

Si bien la población de cultivo La Carbonera presenta mayor número de alelos diferentes y mayor similaridad entre los individuos, los cuales se ubican por encima de un coeficiente de similaridad de 0,42, el dendrograma muestra que es diferente a las poblaciones naturales con una distancia aproximada de 0,19.

CONCLUSIONES

Las tres poblaciones naturales y la de cultivo muestran un polimorfismo moderado, muy similar entre ellas, que está entre 55,4 y 49.

Las poblaciones de La Carbonera (cultivo) y La Ensenada (natural) las que mostraron mayor polimorfismo promedio, con un valor de 55,41% para ambas poblaciones.

Los valores globales de G_{st} (0,348) y Φ_{PT} (0,421) encontrados indican que existe una diferenciación considerable entre las poblaciones estudiadas.

La población natural de Curay presentó una diferenciación considerable respecto a las poblaciones de Salahonda y la Ensenada con valores de Φ_{PT} entre pares de 0,238 y 0,353 respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) indican que la mayor parte de la variabilidad encontrada se halla dentro de los individuos de cada población (58%) mientras que el restante (42%) se debe a diferencias entre las poblaciones, lo cual permite inferir la presencia de una estructura poblacional entre cada uno de los sitios estudiados, es decir, que es posible diferenciar genéticamente una población de otra.

AGRADECIMIENTOS

Al Sistema de Investigaciones de la Universidad de Nariño por la financiación de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Newmark F, Valverde C H, Díaz J M, Parra G, Bonilla, S P, Salazar M. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de camarón de cultivo en Colombia. Bogotá, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), Biblioteca Agropecuaria de Colombia (BAC); 2009.
- [2] Montañó-Pérez K, Villalpando-Canchola E, Vargas-Albore F. Ventajas del uso de marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético en camarón. *Panorama Acuicola*. 2004; 18-22.
- [3] Rentería-Alcántara M. Capítulo 18. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Eguiarte L E, et al (Eds.). *Ecología Molecular*. México D. F.: Instituto Nacional de Ecología SEMARNAT; 2007. pp. 541-566.
- [4] Bardakci F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk J Biol*. 2001; 2 (2): 185-196.
- [5] Aljanabi S, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Ac. Res*. 1997; 57 (22): 4692, 4693.
- [6] CIMMYT. Applied molecular genetics laboratory: Laboratory protocols. 3a. ed. Mexico D.F.: CIMMYT; 2005.
- [7] Garcia D, Benzie J. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture*. 1995; 130: 137-144.
- [8] Klinbunga S, Siludjai D, Wudthijinda W, Tassanakajon A, Jarayabhand P, Menasveta P. Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and mitochondrial DNA RFLP analyses. *Mar. Biotechnol*. 2001; 3: 428-438. <https://doi.org/10.1007/s10126-001-0055-9>
- [9] Lakra W, Goswami B, Singh A. Genetic characterization of *Metapenaeus affinis* (H. M. Edwards, 1837) using RAPD markers. *Mol. Biol. Reports*. 2010; 37 (8): 3757-3761.
- [10] Valerio-Garcia R, Grijalva-Chon J. Random-amplified Polymorphic DNA analysis in hatchery populations and wild Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* from the Gulf of California. *Aquaculture Res*. 2008; 39 (6): 666-669.

Artículo de Investigación

- [11] Youssef M. Khirshyat 1.0 [programa de computador]. 2012. Disponible en: http://www.researchgate.net/publication/237090169_Khirshyat_1.0_a_Simple_Micro-Program_for_Some_Molecular_Biology_Protocols
- [12] Skroch P, Nienhuis P. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theor. Appl. Genet.* 1995; 91 (6): 1086-1091.
- [13] Pan Y, Burner D M, Ehrlich K C, Grisham M P. Analysis of primer-derived, nonspecific amplification products in RAPD-PCR. *Biotechniques.* 1997; 22 (6): 1071-1077.
- [14] Peakall R, Smouse P. GenAEx 6.5: Genetic analysis in Excel [computer program]. 2012. Disponible en: <http://biology-assets.anu.edu.au/GenAEx/Welcome.html>
- [15] University Of Alberta and Center For International Forestry Research. POPGENE 1.32: population genetic analysis [computer program]. Molecular Biology and Biotechnology Centre; 2000. Disponible en: http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html
- [16] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics.* 1978; 89: 583-590.
- [17] NTSYSpc: Numerical Taxonomy System [computer program]. Version 2.1. New York: Applied Biostatistics Inc.; 2000.
- [18] Hammer O, Harper D, Rya, P. Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica.* 2001; 4 (1): 9. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- [19] Walker J, Rapley R. *Molecular biomethods handbook.* 2 ed. Totowa: Humana Press; 2008. 1124 p.
- [20] Garcia D, *et al.* Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1994; 3 (5): 270-280.
- [21] Aubert H, Lightner D. Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. *Mar. Biol.* 2000; 137 (5-6): 875-885.
- [22] Freitas P, Calgaro, M, Galleti, P. Genetic diversity within and between broodstocks of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (*Decapoda, Penaeidae*) and its implication for the gene pool conservation. *Braz. J. Biol.* 2007; 67 (4): 939-943.
- [23] Magalhães M, Martinez R, Galotto F. Genetic diversity of *Litopenaeus vannamei* cultivated in Bahia State, Brazil. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 2007; 42 (8): 1131-1136.
- [24] Tassanakajon A, Pongsomboon S, Rimphanitchayakit V. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1997; 6 (2): 110-115.
- [25] Zhuang Z, Konng J, Liu J. Genetic diversity in *Penaeus chinensis* shrimp as revealed by RAPD technique. *Prog Nat Sc.* 2001; 11 (6): 432-438.
- [26] Liu B, *et al.* The comparison between allozyme and RAPD markers for the population genetic structure analysis of scallop *Chlamys farreri*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 2006; 24 (3): 295-299.
- [27] Espinosa G, *et al.* Variación genética y morfológica en poblaciones naturales y cautivas de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en Cuba. Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>). 2002. p.p 778-784. Disponible desde: <http://www.revistaaquatic.com/civa2002/coms/completo.asp?cod=85>
- [28] Mishra P, *et al.* Genetic diversity in *Metapenaeus dobsoni* using RAPD analysis. *BiochemGenet.* 2009; 47: 421-426.
- [29] Song L, *et al.* Study of population genetic structure in *Penaeus japonicus* with RAPD markers. *Oceanologia et Limnologia sínica.* 1999; 30: 261-266.

- [30] Vela-Avitúa S, *et al.* Decline of genetic variability in a captive population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using microsatellite and pedigree information. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2013; 16 (4). Disponible en: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v16n4-11/1724>
- [31] Meirmans P. Hedrick P. Assessing population structure: Fst and related measures. *Mol. Ecol. Resour.* 2010; 11 (1): 5-18.
- [32] Smith P. Stock identification methods: applications in fishery science. Amsterdam: Elsevier Inc.; 2005. Capítulo 18, Random amplified Polymorphic DNA (RAPD); 371-387.
- [33] Holsinger K. Weir B. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. En: *Nature Reviews Genetics*. Septiembre, 2009. vol. 10. p. 639-650.
- [34] Franco T, Hidalgo R. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Roma: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, 2003. 72-83.
- [35] Fresneda A. Determinación de la estructura poblacional de *Litopenaeus vannamei* mediante ISSRs a lo largo de la costa ecuatoriana. [Tesis de Maestría]. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar; 2003.
- [36] Pérez F. Generación y manipulación de la diversidad genómica en *Penaeus vannamei* para la acuicultura del Ecuador. Ecuador: Informe ejecutivo BID-FUNDACYT, 1999. Código P-BID-210.
- [37] Waldman J. The importance of comparative studies in stock analysis. *Fish. Res.* 1999; 43 (1): 237-246.