ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENETICA DE DOS ESPECIES DE PARGO *Lutjanus guttatus y Lutjanus argentiventris*, DEL PACIFICO COLOMBIANO, MEDIANTE TECNICAS MOLECULARES

VIVY JOHANNA LOPEZ GARCIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRIA EN CIENCIAS AGRARIAS
PRODUCCIÓN ANIMAL TROPICAL
PALMIRA
2012

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENETICA DE DOS ESPECIES DE PARGO *Lutjanus guttatus y Lutjanus argentiventris*, DEL PACIFICO COLOMBIANO, MEDIANTE TECNICAS MOLECULARES

Trabajo de grado presentado para optar el título de Magister en Ciencias Agrarias Línea de Investigación

PRODUCCIÓN ANIMAL TROPICAL

VIVY JOHANNA LOPEZ GARCIA

Directores:

JOSE ADER GOMEZ PEÑARANDA, Ph.D.

JAIME EDUARDO MUÑOZ FLOREZ, Ph.D.

Grupo de Investigación en Recursos Zoogenéticos

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

COORDINACION GENERAL DE POSGRADOS

PALMIRA

2012

DEDICATORIA

A Dios por que puso en mi camino personas tan valiosas en mi vida.

Agradezco con todo mi cariño a mi familia, mis padres Carmen y Jesús, mi hermana Lina Fernanda, quienes me apoyaron incondicionalmente en este proceso de aprendizaje dándome el impulso que necesitaba para continuar.

A mis Hijos, Tayra e Iktan; mis grandes amores, quienes fueron mi fortaleza para seguir este proceso.

A Vladimir, mi gran amor, quien me ha acompañado a lo largo de todos estos años brindándome su amor, comprensión, apoyo y por la paciencia que me ha tenido.

AGRADECIMIENTOS

A mi Director, José Ader Gómez Peñaranda, por la oportunidad de llevar a cabo este estudio y aprender un poco más.

Al profesor Jaime Eduardo Muñoz Flórez, por su apoyo para la finalización del proyecto.

A Lucena Vásquez Gamboa, por su amistad, apoyo y motivación.

A Paula Rúgeles Silva por su valiosa colaboración en toda la parte de laboratorio, interpretación y análisis de los resultados.

A Alejandra Gutiérrez, por su colaboración para llevar a cabo esta investigación y por su amistad.

Al grupo de investigación de recursos zoogenéticos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

A todos los compañeros del Laboratorio de Biología Molecular.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
PRODUCCIÓN ANIMAL TROPICAL

En Palmira a los 24 días del mes de Mayo de 2013, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por las doctoras: **Luz Ángela Álvarez Franco y Lucena Vásquez Gamboa**

Para calificar la Tesis de Grado de:

VIVY JOHANNA LÓPEZ GARCÍA

Titulada:

"ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE DOS ESPECIES DE PARGO *Lutjanus guttatus* y *lutjanus argentiventris*, DEL PACÍFICO COLOMBIANO, MEDIANTE TECNICAS MOLECULARES (RAM)" bajo la dirección de José Ader Gómez Peñaranda Ph.D y Jaime Eduardo Muñoz Ph.D.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los doctoras: **Luz Ángela Álvarez Franco y Lucena Vásquez Gamboa**, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADO X

REPROBADO ___

LUZ ÁNGELA ÁLVAREZ FRANCO

LUCENA VÁSQUEZ GAMBOA

La facultad y los jurados de tesis
no se harán responsables de las ideas emitidas por el autor.

Articulo 24, resolución 04 de 1974

CONTENIDO

1. INTRODUCCION 15

1.1. Situación actual de la Pesca y la Acuicultura en el mundo 15

1.2. Situación actual de la Pesca y la Acuicultura en Colombia 16

1.3. Descripción general de los recursos pesqueros y situación del sector 17

1.4. Situación Actual del Pargo en Colombia como especie comercial 19

2. JUSTIFICACION 22

3. HIPOTESIS 23

4. OBJETIVOS 24

4.1. Objetivo general 24

4.2. Objetivos específicos 24

5. MARCO TEORICO 25

5.1. Distribución y Hábitats 25

5.2. Taxonomía de Lutjanus gutattus y Lutjanus argentiventris 27

5.3. Alimentación 29

5.4. Reproducción 31

5.5. Crecimiento 36

5.6. Área de estudio, Zona Pacifica Colombiana 39

5.6.1. Bahía Tumaco 40

5.6.2. Bahía Málaga 41

5.6.3. Bahía Solano 42

5.7. Variabilidad genética 43

5.7.1. Conservación de la diversidad genética 44

5.7.2. Marcadores Moleculares en acuacultura 47

5.7.3. Microsatélites Amplificados al Azar, RAMs 49

5.7.4. Resultados de estudios de variabilidad genética en acuicultura 51

5.7.5. Estudios de variabilidad genética realizados especies del género Lutjanus 54

6. MATERIALES Y METODOS 58

6.1. Ubicación geográfica / Zonas de Muestreo 58

6.2. Material experimental 58

6.3. Métodos 59

6.3.1. Extracción de ADN 59

6.3.2. Evaluación de cantidad y calidad de ADN 59
6.3.3. Metodología para marcadores moleculares tipo RAMs 60
6.4. Análisis de datos 62

7. RESULTADOS Y DISCUSION 64

7.1. Amplificación de ADN 64
7.2. Características de los cebadores 64
7.3. Coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) 70
7.4. Heterocigosidad esperada (He) y porcentaje de loci polimórficos por zona de muestreo y cebadores utilizados 67
7.5. Análisis descriptivo 71
7.6. Distancia genética 73
7.7. Análisis de varianza molecular 76

8. CONCLUSIONES 79

11. BIBLIOGRAFIA 81

12. ANEXOS 95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción Pesquera en Colombia 1985-2010. 18

Figura 2. Evolución Histórica de la Acuicultura en Colombia 1985-2010. 19

Figura 3. Distribución porcentual de los desembarcos de pargo lunarejo en el Pacifico colombiano durante el año 2010. a.) Pesca artesanal, b.) Pesca industrial. 20

Figura 4. Capturas anuales (kg) desembarcadas en la pesca industrial y artesanal de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* en el Pacífico colombiano para el periodo 2007 - 2009. 21

Figura 5. Ejemplar adulto de pargo lunarejo, *Lutjanus guttatus*. 28

Figura 6. Ejemplar adulto de pargo amarillo, *Lutjanus argentiventris*. Fuente: http//www.discoverlife.org 29

Figura 7. Esquema del ciclo reproductivo de los pargos. 32

Figura 8. Mapa de las regiones de muestreo para el estudio de diversidad genética de *Lutjanus guttatus y Lutjanus argentiventris* en el Pacífico Colombiano. 58

Figura 9. ADN total de pargo teñido con bromuro de etidio. 60

Figura 10. Gel de Poliacrilamida de individuos de *Lutjanus guttatus*, cebador ACA. 64

Figura 11. Gel de Poliacrilamida de individuos de *Lutjanus argentiventris*, cebador AG64

Figura 12. Heterocigocidad esperada y % loci polimórficos *Lutjanus guttatus* (g) y *Lutjanus argentiventris* (a). 67

Figura 13. Heterocigocidad esperada *Lutjanus guttatus (g) y Lutjanus argentiventris (a)* en las zonas de estudio. 69

Figura 14. Dendrograma de *Lutjanus guttatus* obtenido con el coeficiente de similitud de Dice. 73

Figura 15. Dendrograma de *Lutjanus argentiventris* obtenido con el coeficiente de similitud de Dice. 73

Figura 16. Dendograma distancia genética de *L. guttatus* en las zonas de muestreo.75

Figura 17. Dendrograma Distancia genética de *L. argentiventris* en las zonas de muestreo. 75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Producción y Utilización de la pesca y acuicultura en el mundo. 16

Tabla 2. Biodiversidad de la pesca y la Acuicultura en Colombia. 17

Tabla 3. Periodos de reproducción para *L. guttatus*, y *L. argentiventris* reportado por varios autores. 35

Tabla 4. Talla a la cual se alcanza la madurez sexual en varias localidades del Océano pacifico. 36

Tabla 5. Parámetros de crecimiento de *Lutjanus guttatus* en el pacifico mexicano. Soto-Rojas *et al*. (2009) y Sarabia- Méndez *et al.* (2010) 37

Tabla 6. Comparación de los parámetros de crecimiento en estudios realizados sobre *L. argentiventris* (Rojas *et al.,* 2004). 39

Tabla 7. Número total de muestras por especie y sitio de muestreo. 59

Tabla 8. Cebadores RAMs. (Muñoz *et al.,* 2008) 61

Tabla 9. Condiciones de amplificación para RAMs. 61

Tabla 10. Perfil de amplificación modificado, utilizado en la técnica Microsatélites RAM. Recomendado por (Muñoz *et al*., 2008). 62

Tabla 11. Temperatura de hibridación para cebadores RAMs. 62

Tabla 12. Cebadores, Heterocigocidad esperada y porcentaje de loci polimórficos para *L. guttatus.* 65

Tabla 13. Cebadores, Heterocigocidad esperada y porcentaje de loci polimórficos para *L. argentiventris.* 65

Tabla 14. Analisis de Heterocigocidad esperada (He) y % Loci polimorficos por zona geografica y cebador utilizado para *L. guttatus.* 68

Tabla 15. Análisis de Heterocigocidad y % Loci polimórficos por zona geográfica y cebador utilizado para *L. argentiventris.* 68

Tabla 16. Clasificación de la diferenciación genética de acuerdo al F_{ST} propuesta por Wright (1978). 70

Tabla 17. Similitud genética de *L. guttatus* y *L. argentiventris* en las zonas de muestreo. 74

Tabla 18. Información de los loci que soportan la construcción del dendrograma de distancias de las zonas de los sitios de muestreo de las especies *L. guttatus y L.argentiventris* 76

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Protocolo de para extracción de ADN (modificado) 93

Anexo B. Matriz de datos obtenida mediante el análisis de patrones de bandas para *L. argentiventris* con cuatro marcadores moleculares RAMs 96

Anexo C. Matriz de datos obtenida mediante el análisis de patrones de bandas para *L. guttatus con* cuatro marcadores moleculares RAMs 99

Anexo D. Geles de Poliacrilamida cebadores ACA, CCA; AG y CT especies de *L. guttatus y L. argentiventris* 102

RESUMEN

Las especies de Pargo *Lutjanus gutttatus y Lutjanus argentiventris* se distribuyen mundialmente por aguas tropicales y son considerados recursos importantes para el desarrollo pesquero del Pacífico Colombiano. Los objetivos del presente estudio fueron estimar la variabilidad genética de estas especies utilizando marcadores moleculares RAMs y evaluar la variabilidad entre las especies en tres zonas del Pacifico Colombiano. Evaluando 79 individuos colectados en tres regiones de la Zona Pacifica Colombiana con cuatro cebadores RAMs (AG, CCA, CT y ACA). Obteniendo una Heterocigosidad esperada (He) para *Lutjanus guttatus* de 0.29 y % de loci polimórficos del 92%. En cuanto a *Lutjanus argentiventris* los valores de Heterocigocidad esperada y % de loci polimórficos fueron 0.27 y 81% respectivamente. Con el valor de F_{ST}, se determinó la existencia de una alta diferenciación genética entre las tres zonas para cada una de las especies estudiadas, que puede ser atribuida a la capacidad adaptativa que tienen los individuos ya que estas zonas presentan condiciones ecológicas diferentes. Con el coeficiente de Dice Nei-Li por el método UPGMA, se formaron los grupos de acuerdo a la especie estudiada y la zona de muestreo. El AMOVA detectó una variación dentro de los individuos de cada zona para las dos especies lo que podría indicar la existencia de subpoblaciones dentro de cada zona atribuible a la capacidad adaptativa de los peces de acuerdo a las condiciones oceanográficas predominantes en dichas regiones; jugando un papel importante en la determinación de la estructura genética y la existencia de stocks genéticos distintos que deben ser manejados de acuerdo a su estructura poblacional.

Palabras clave: *diversidad genética, Pargo, RAMS, Zona Pacifica Colombiana*, AMOVA.

ABSTRACT

The species of snapper *Lutjanus gutttatus* and *Lutjanus argentiventris* are distributed globally through tropical waters and are considered important resources for the Colombian Pacific fisheries development. The objectives of this study were to estimate the genetic variability of these species using molecular markers RAMs and assess the variability between species in three areas of the Colombian Pacific. Evaluating 79 individuals collected in three regions of the Colombian Pacific area with four RAMs primers (AG, CCA, ACA, CT). Getting an expected heterozygosity (He) for *Lutjanus guttatus* 0.29% and polymorphic loci 92%. *Lutjanus argentiventris* regarding expected heterozygosity values and % polymorphic loci were 0.27 and 81% respectively. With the value of F_{ST}, we determined the existence of a high genetic differentiation among the three zones for each of the species studied, which can be attributed to the adaptive capacity that individuals as these areas are ecologically different. With the Dice coefficient Nei-Li by the UPGMA method, groups were formed according to the species studied and the sampling area. The AMOVA detected individual variation within each area for the two species which could indicate the existence of subpopulations within each zone attributable to the adaptive capacity of fish according to oceanographic conditions play an important role in determining the genetic structure and the existence of two different genetic stocks that should be managed according to their population structure.

Keywords: *Genetic diversity, Pargo, RAMS, Colombian Pacific Zone, AMOVA.*

1. INTRODUCCION

1.1. Situación actual de la Pesca y la Acuicultura en el mundo

Durante los últimos años la acuicultura ha adquirido relevancia dentro de las opciones productivas en Colombia, considerando que puede llegar a ser uno de los elementos de importancia en la generación de ingresos a nivel nacional.
La producción acuícola mundial ha seguido creciendo, y ha pasado de ser casi insignificante a equipararse totalmente a la producción de la pesca de captura en cuanto a la alimentación de la población en el mundo. Además se ha evolucionado en cuento a innovación tecnológica y adaptación para satisfacer las necesidades cambiantes. En el año 2010 la producción acuícola mundial alcanzo su nivel máximo de 60 millones de toneladas (FAO, 2012).

En los últimos 50 años, el suministro mundial de productos pesqueros destinados al consumo humano ha superado el crecimiento de la población mundial; actualmente, el pescado constituye una fuente esencial de alimentos nutritivos y proteínas animales para gran parte de la población; encontrándose entre los productos alimenticios más comercializados, alcanzando sus máximos volúmenes en el 2011, y se espera que siga una tendencia a la alza en países en desarrollo que representan la mayor parte de las exportaciones mundiales. Si bien la producción de la pesca de captura se mantiene estable, la producción acuícola sigue creciendo. Además, el sector proporciona medios de vida e ingresos, tanto directa como indirectamente, a una parte considerable de la población mundial (FAO, 2012).

En el año 2011 la pesca de captura y la acuicultura suministraron al mundo unos 154 millones de toneladas de pescado, de éstos, aproximadamente 130 millones de toneladas se fueron para el consumo. Con el crecimiento mantenido de la producción de pescado y la mejora de los canales de distribución, el suministro mundial de alimentos pesqueros ha aumento generando así un consumo per cápita de 18.8 kg (FAO, 2012) (Tabla 1).

Tabla 1. Producción y Utilización de la pesca y acuicultura en el mundo.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
PRODUCCION						
Pesca de captura						
Continental	9,8	10,0	10,2	10,4	11,2	11,5
Maritima	80,2	80,4	79,5	79,2	77,4	78,9
Pesca de captura total	90,0	90,3	89,7	89,6	88,6	90,4
Acuicultura						
Continental	31,3	33,4	36,4	36,1	41,7	44,3
Maritima	16,0	16,6	16,9	17,6	18,1	19,3
Acuicultura total	47,3	49,9	52,9	55,7	59,9	63,6
Producción pesquera mundial total	137,3	140,2	142,6	145,3	148,5	154,0
UTILIZACION						
Consumo humano	114,3	117,3	119,7	123,6	128,3	130,8
Usos no alimentarios	23,0	23,0	22,9	21,8	20,2	23,2
Población (miles de millones)	6,6	6,7	6,7	6,8	6,9	7,0
Suministro de peces comestibles per cápita (Kg)	17,4	17,6	17,8	18,1	18,6	18,8

Nota: No se contabilizan las plantas acuáticas. Las cantidades totales pueden no coincidir debido al redondeo. Las cifras para 2011 son cálculos provisionales.

Fuente, FAO, 2012

En 2009, el pescado representó el 16,6% del aporte de proteínas animales de la población mundial y el 6,5% de todas las proteínas consumidas, siendo considerado como una fuente valiosa de proteínas y nutrientes esenciales para tener una nutrición equilibrada y buena salud (FAO, 2012).

1.2. Situación actual de la Pesca y la Acuicultura en Colombia

Teniendo en cuenta las características geográficas de Colombia y su incidencia sobre el desarrollo de la acuicultura se puede afirmar que el país cuenta con condiciones muy favorables para este tipo de actividades, Colombia está clasificado como un país mega-diverso, junto con otros 16 países del Mundo. Dentro del PIB agropecuario, la participación de las actividades pesqueras y acuícolas es relativamente baja ya que a pesar de la gran diversidad de especies, las actividades pesqueras y acuícolas aprovechan los recursos de manera muy limitada. Es así como en la pesca sólo se

explotan 126 familias de peces de agua dulce (entre pescado para consumo y peces ornamentales), mientras que en piscicultura sólo se explotan 2 especies *Piaractus brachypomus y Prochilodus spp*), aunque se ha experimentado con unas otras como *Brycon spp* y algunos bagres en Huila y en Meta, así como con *Arawana spp*, como pez ornamental (MADR – INCODER, 2011) (Tabla 2).

Aunque la pesca y la acuicultura siguen siendo actividades de bajo impacto en el sector agropecuario, la actividad pesquera tiene gran trascendencia en las zonas donde se desarrolla y es tal vez la actividad que más aporta a la seguridad alimentaria del país (Rojas *et al.,* 2012).

Tabla 2. Biodiversidad de la pesca y la Acuicultura en Colombia.

Biodiversidad de la pesca y acuicultura en Colombia					
Pesca y acuicultura comerciales y artesanales[1]					
Cuenca o Litoral	Pescado consumo Agua dulce	Pescado consumo Agua salada	Peces ornamentales (solo agua dulce)	Crustáceos	Moluscos y otros
Amazonas	10		24		
Atrato	9				
Magdalena	20				
Orinoco	19		53		
Mar caribe(*)		21		5	6
Pacifico		24		8	4
Sinú	8				
Total especies (**)	66	45	60	9	8

[1] No. de especies.

(*) Incluye la Ciénaga Grande de Santa Marta

(**) El total de especies realmente explotadas es menor que la suma vertical, pues hay especies que se repiten en las cuencas y litorales.

Fuente: MADR, INCODER, 2011

1.3. Descripción general de los recursos pesqueros y situación del sector

Colombia cuenta con tres espacios pesqueros muy amplios y diferentes que son el Océano Pacífico, el Mar Caribe y las áreas continentales. En la Figura 1, se muestra la producción nacional en los últimos 25 años, se observa que la pesca ha disminuido, especialmente en aguas dulces, mientras que la acuicultura se ha incrementado. La

producción pesquera total para 2010 fue 128.742 toneladas, de las cuales, la acuicultura aportó el 55.09% (MADR- INCODER, 2011).

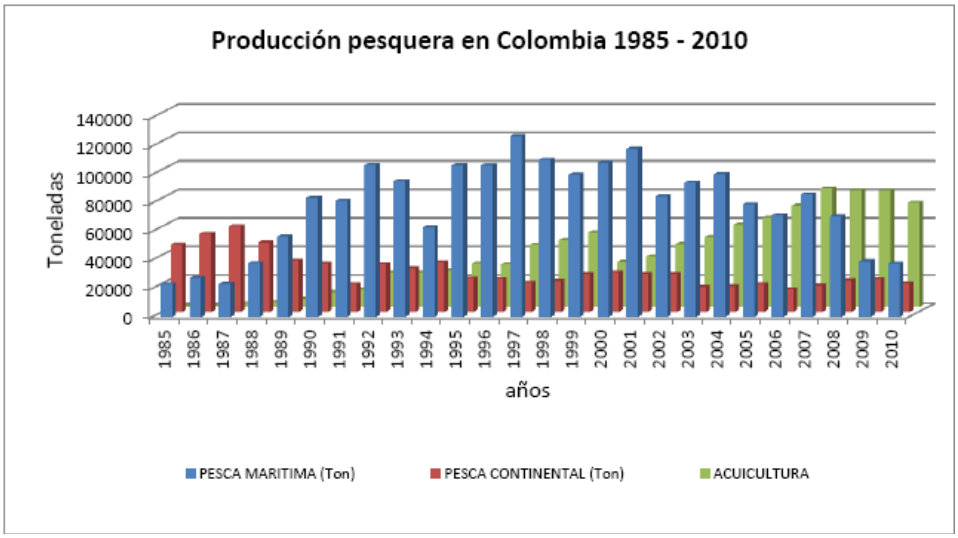


Figura 1. Producción Pesquera en Colombia 1985-2010. Fuente: MADR- INCODER, 2011.

En cuanto a la producción pesquera nacional en el año 2010, el aporte de las capturas en el Océano Pacífico representó el 59% de la producción total y se estima que en esta región hay alrededor de 13.000 pescadores artesanales; las capturas en el mar Caribe tuvieron una participación del 6%, contando la región con cerca de 3.500 pescadores artesanales. Sin embargo, partiendo del supuesto que para el año 2010 la pesca industrial fue muy reducida, se tiene que para el Pacífico la productividad media por pescador artesanal sería de 2.62 toneladas año, mientras que en el Caribe apenas alcanza a 0.99 Toneladas año (MADR- INCODER, 2011).

La tendencia de crecimiento de la acuicultura en el periodo 1985 a 2010 es muy alta representando el 20.44% anual promedio y pasa de 572 toneladas en 1985 a cerca de 73000 en 2010 mostrando menor crecimiento que otros países de Latinoamérica, supera la tasa media del crecimiento del resto del sector agropecuario y del conjunto total de la economía nacional (Figura 2).

La pesca marina en Colombia se caracteriza por el tamaño comparativamente pequeño de stocks comercialmente importantes en sus aguas jurisdiccionales, que contrasta con una alta diversidad de especies típica de zonas tropicales. Además, la gestión en el manejo, la administración y el fomento de la pesca se ha limitado en los

últimos 10 años por cambios frecuentes en la institucionalidad del sector, que ha llevado a un poca representatividad del sector, poco control de la actividad y una deficiente recopilación de información estadística pesquera y acuícola. (Rojas *et al*., 2012).

La principal relación o interacción entre la pesca y la acuicultura en Colombia se ha dado a través de programas de repoblamiento en cuerpos de agua realizados por entidades públicas, que han tratado de aumentar la oferta pesquera en aguas continentales, para aumentar la seguridad alimentaria y la calidad de vida de los pescadores (MADR- INCODER, 2011).

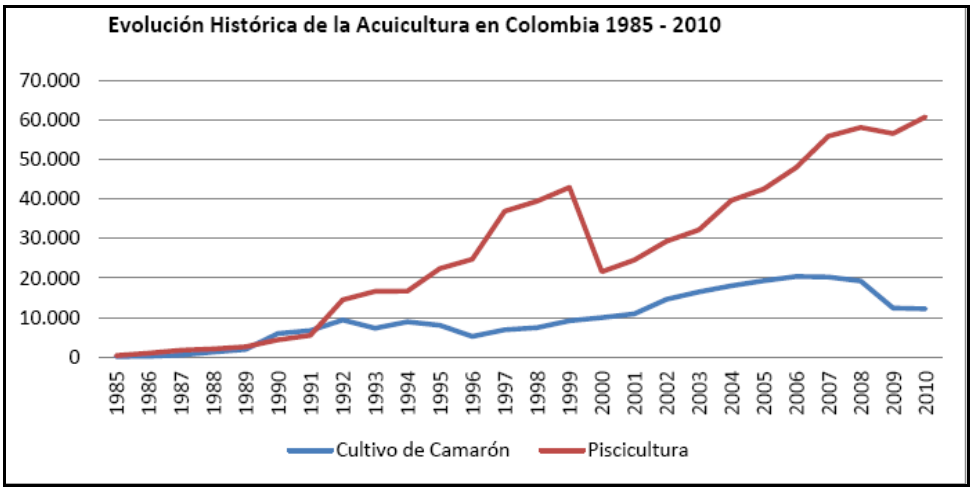


Figura 2. Evolución Histórica de la Acuicultura en Colombia 1985-2010. Fuente: MADR-INCODER, 2011.

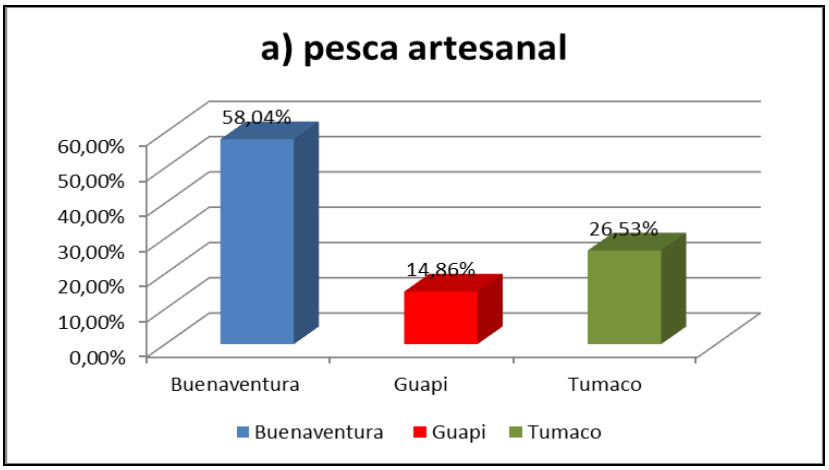
1.4. Situación Actual del Pargo en Colombia como especie comercial

Las especies de la familia Lutjanidae constituyen un importante recurso pesquero alrededor de las zonas marinas tropicales en el mundo y son explotadas intensivamente por su excelente calidad y valor comercial (Landinez - García, *et al.,* 2009).

Considerando la importancia de buscar alternativas económicas y productivas en la acuicultura surge la iniciativa de tener un acercamiento con la piscicultura marina, siendo el pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* y el pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* especies con mayor potencial acuícola. Éstos son considerados especies de importancia comercial por ser recursos de extracción por los pescadores artesanales

en varias zonas del pacífico colombiano, para el sustento diario, por lo tanto toda actividad investigativa alrededor de la conservación y repoblamiento de la especie es importante para el bienestar de la población.

En cuanto a los desembarcos de *Lutjanus guttatus* durante el 2010, se observa que Buenaventura es el principal puerto de la región Pacifico para los desembarcos, con una participación del 58% en la pesca artesanal y un 87% en la actividad industrial. El producto se comercializa por kilos y el precio varía de acuerdo al tamaño; La producción tiene como destino las ciudades de Medellín, Quibdó, Cali, Bogotá y Armenia (CCI, 2011) (Figura 3).



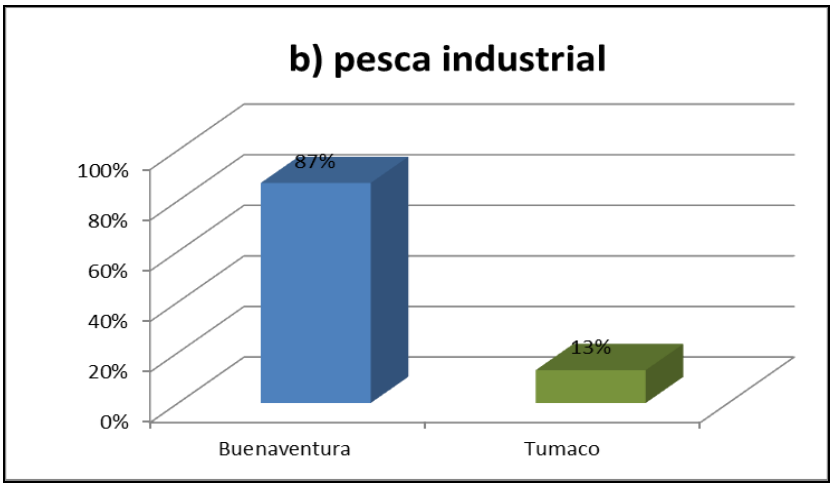


Figura 3. Distribución porcentual de los desembarcos de pargo lunarejo en el Pacifico colombiano durante el año 2010. a.) Pesca artesanal, b.) Pesca industrial. Fuente. CCI, 2011.

En el año 2010, se desembarcaron 241.006 kg de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*, registrándose un incremento del 8%, al contrastar los desembarcos reportados

durante el 2009 (221.660 kg). Durante el 2010 se desembarcaron 84.411kg de pargo lunarejo en la pesca industrial y 156.595 kg en la pesca artesanal, lo cual muestra una tendencia de aumento en la captura de esta especie (CCI, 2011) (Figura 4).

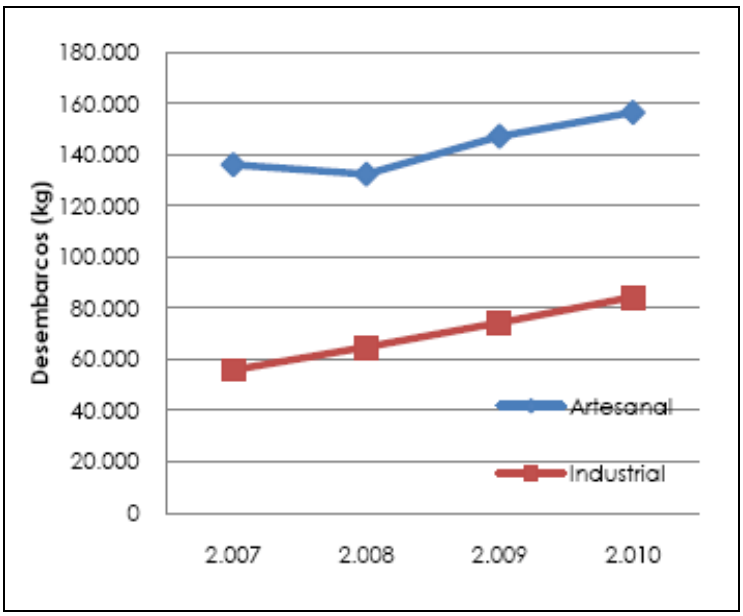


Figura 4. Capturas anuales (kg) desembarcadas en la pesca industrial y artesanal de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* en el Pacífico colombiano para el periodo 2007 - 2009. Fuente. CCI, 2011.

En cuanto a los datos acerca de desembarcos y captura de *Lutjanus argentiventris* en el Pacifico Colombiano, en sus principales puertos no se encuentra información disponible a la fecha, avalada por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y el Sistema de Información de Pesca y Acuicultura.

2. JUSTIFICACION

Estas dos especies de pargo son consideradas de importancia comercial por ser un recurso de extracción por pescadores artesanales e industriales, por lo tanto, toda actividad pesquera debería estar planificada sobre un esquema de administración para mantener el rendimiento óptimo de los recursos, basado en estudios poblacionales, programas de repoblación, así como también transferencia de tecnología y de conocimientos para desarrollar sistemas productivos de las especies.

Es por ello que se evalúan estudios genéticos que ayuden a identificar si las especies de pargo *Lutjanus guttaus y Lutjanus argentiventris* de la zona pacifica colombiana correspondiente a Bahía Tumaco, Bahía Málaga y Bahía Solano, pueden tener comportamientos poblacionales similares y poder plantear políticas de repoblamiento y/o explotación adecuadas.

Dado que el pargo es una especie demersal, la identificación y caracterización genética de grupos de peces localmente adaptados y diferenciados, es fundamental para preservar la variación genotípica en poblaciones naturales, así como para detectar, en algunos casos oculta, la diferenciación adaptativa en respuesta a la heterogeneidad ambiental (Carvalho y Hauser, 1995).

3. HIPOTESIS

Hoy en día se usan datos moleculares para establecer hipótesis de relaciones filogenéticas entre organismos, para estimar la variación dentro de las poblaciones y probar hipótesis de adaptaciones ecológicas. Los cuales pueden proveer de información adecuada para sustentar y probar hipótesis evolutivas. Por lo tanto:

- Existe alta variación genética en las especies *Lutjanus guttatus y Lutjanus argentiventris* del Pacifico Colombiano correspondientes a Bahía Tumaco, Bahía Málaga y Bahía Solano.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estimar la variabilidad genética de dos especies de Pargo *Lutjanus guttatus y Lutjanus argentiventris* en la zona Pacifica de Colombia a través del estudio del ADN mediante técnica Microsatélite, RAMs.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar la aplicabilidad de la técnica RAMs (Random Amplified Microsatellites) en la estimación de la variabilidad genética de dos especies de pargo del pacifico colombiano.

- Estimar la Variabilidad genética entre individuos de la especies *Lutjanus guttatus* de tres zonas del Pacifico Colombiano (Bahía Tumaco, Bahía Málaga y Bahía Solano).

- Estimar la Variabilidad genética entre individuos de la especies *Lutjanus argentiventris* de tres zonas del Pacifico Colombiano (Bahía Tumaco, Bahía Málaga y Bahía Solano).

5. MARCO TEORICO

5.1. Distribución y Hábitats

La familia Lutjanidae tiene distribución cincuntropical que coincide estrechamente con la de los arrecifes coralinos, está compuesta por 17 géneros, y 103 especies. El género *Lutjanus* se encuentra compuesto por 65 especies de las cuales 39 se distribuyen en el Indopacifico, 9 en el pacifico Americano, 12 en el Atlántico Occidental y 5 en el Atlántico Americano (Vásquez, 2005). Según Claro y Lindeman (2004), los pargos se originaron en la región Indo-Pacífico, donde se encuentran la mayor cantidad de géneros, y diversidad de especies. Su distribución va desde Carolina del Norte, hasta el sur de Brasil, incluyendo Bermudas, el Caribe y Golfo de México; habitando zonas de numerosas y extensas áreas de sustrato rocoso en la plataforma continental y zonas de aguas cálidas debido a la influencia de la Corriente del Golfo.

La amplia distribución de la mayoría de las especies en casi todas las islas y plataformas continentales evidencia la gran capacidad de dispersión y adaptación de estas especies (Claro y Lindeman, 2004). Las cuales generalmente realizan migraciones ontogénicas a través de la plataforma. Con el crecimiento, los peces que se asientan en aguas someras se mueven hacia los arrecifes exteriores y durante el desove los adultos nadan a veces decenas de kilómetros para llegar hasta el mismo borde de la plataforma (Lindeman *et al.*, 2000).

Generalmente todas las especies de la familia Lutjanidae se concentran cerca del fondo (rocas, grietas, montículos, etc.), sobre fondos areno-fangosos o pedregosos, en pronunciado declive, aunque en pocos casos también se les encuentra en fondos blandos (Cervigón *et al.,* 1992).

La mayoría de las especies del género *Lutjanus* son típicamente marinas pero algunas pueden entrar en aguas salobres o hipersalinas, especialmente durante su etapa juvenil; en conjunto se clasifican como demersales, aunque algunos tienen hábitos pelágicos. Muchas se concentran alrededor de los refugios artificiales, por lo que estas estructuras han sido utilizadas ampliamente para la pesca (Claro y Lindeman, 2004).

La dependencia por su hábitat se ve comprometida por las diferentes presiones antrópicas de los ecosistemas, sobre todo por el aumento de la población, el crecimiento de la frontera industrial y turística en zonas costeras, la contaminación, la sobrepesca y la muerte de juveniles por pesca de camarones, entre otros. La correspondencia de éstas altera su ciclo natural, en cuanto a sobrevivencia, migración

de juveniles a zonas más profundas y tasas de reclutamiento. Lo anterior puede afectar la conservación de la especie por la dependencia alimentaria del pargo por grupos que también son de consumo humano (ej. camarones, jaibas, esquilas etc.), ya que éstos son el alimento esencial para juveniles y adultos jóvenes. Pudiendo causar migraciones, conllevando a la extinción de poblaciones locales (Rojas *et al.*, 2004).

Lutjanus guttatus se distribuye a través del Golfo de California hasta el Perú, siendo más común en las zonas costeras de la parte central y baja del Golfo de California que en la parte alta del mismo. Se encuentra frecuentemente a profundidades de 4.6 a 12 metros, en general vive solitario o en pequeños grupos, ocasionalmente forma grandes cardúmenes, principalmente habita fondos rocosos a una profundidad máxima de 30m, aunque pueden encontrarse en arrecifes y zonas arenosas. Los juveniles se concentran en aguas someras y bahías protegidas, esteros y algunas veces en aguas dulces. La mayor actividad de esta especie es desplegada en las horas de la noche, durante el día se refugian entre las rocas (Ocampo y Rubio, 1989).

En el Pacifico Colombiano, *Lutjanus guttatus*, es una especie ampliamente distribuida la cual tiene gran importancia comercial a nivel regional y posibilidades de exportación, así como condiciones favorables para su cultivo. Además su mantenimiento en cautiverio se puede realizar sin menores dificultades, por tanto es una alternativa viable para el cultivo en jaulas y piscinas (Gamboa y Valverde, 2005).
Lutjanus guttatus se ha reportado en Isla Gorgona (Muelle, Playa Blanca), Ensenada de Tumaco, Bahía de Guapi, Punta Coco, Golfo de Tortugas, Bahía de Buenaventura (Punta Soldado, Limones), Bahía Málaga (Curichichi, La Muerte), a profundidades de 0.9 a 3.6 m (Rubio, 1988). La especie es generalmente capturada en los arrastres de la flota camaronera, flota semiindustrial y por los pescadores artesanales, utilizando para ello trasmallos, chinchorros y atajos (Rubio, 1988).

En cuanto a *Lutjanus argentiventris*, los animales adultos habitan arrecifes rocosos y coralinos costeros, cerca de cuevas y cavidades de hasta 60 m de profundidad, aunque es posible encontrarlo asociado a muelles, y desechos; esta especie eurihalina incluso llega a estar en aguas dulces. Durante el día se encuentra formando pequeñas agregaciones, mientras que en la noche permanecen solitarios resguardándose en cuevas o grietas. Sus actividades diurnas incluyen el cortejo, siendo más evidente

durante los meses de invierno. Los juveniles aparecen al final de la primavera y se localizan regularmente en sistemas lagunares-estuarinos (Fisher *et al.,* 1995).

Lutjanus argentiventris se puede encontrar por la costa Pacifico hasta Bahía Magdalena y el Golfo de California, además de localizarse en las Islas Galápagos y Cocos (Vásquez, 2005). En Colombia presenta una distribución espacial dentro y fuera de la zona marina del Parque Nacional Natural Gorgona, especialmente en las zonas norte y sur de la isla (Santamaría–Miranda *et al.,* 2005).
En la zona sur del pacifico colombiano la época de pesca del pargo se ha ubicado tradicionalmente entre mayo-julio, la cual se reconoce como de mayores capturas, lo que hace suponer que tiene un patrón de migración desde y hacia la zona (Rojas *et al.*, 2004).

5.2. Taxonomía de *Lutjanus gutattus* y *Lutjanus argentiventris*

Tomando como referencia a Nelson (1994) la ubicación taxonómica completa de *Lutjanus gutattus y L*utjanus *argentiventris* es:

Phylum:	Chordata
Subphylum:	Vertebrata
Superclase:	Gnathostomata
Clase:	Actinopterygii
Division:	Teleostei
Subdivision:	Euteleostei
Superorden:	Acanthopterygii
Serie:	Percomorpha
Orden:	Perciformes
Suborden:	Percoidei
Superfamilia:	Percoidea
Familia:	Lutjanidae
Subfamilia:	Lutjaninae
Genero:	*Lutjanus*
Especie:	*L. gutattus* (Cuvier, 1828) y
Especie:	*L. argentiventris* (Peters, 1869)

El pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* presenta una coloración que varía de rosado a amarillento, con líneas doradas o amarillentas en los flancos colocadas en posición oblicua. La característica más notable es la presencia de una mancha negra debajo de la aleta dorsal, entre la 8a espina y el 3er radio blando. Sus aletas pélvicas y la anal son de color amarillento. Presenta un preopérculo con escotadura y tubérculo poco acentuados; dientes vomerianos. Aleta dorsal con 10 espinas y 12 o 13 radios blandos aleta anal con 3 espinas y 8 radios; aletra pectoral con 17 radios. Se puede encontrar a tallas máximas de 80cm de longitud total (Baldetti, 1999).

Figura 5. Ejemplar adulto de pargo lunarejo, *Lutjanus guttatus*. Fuente: Gamboa y Valverde, 2005.

El color amarillo del *Lutjanus argentiventris* es una característica que distingue a éstos animales, en estadio adulto presenta una coloración rosácea –rojiza en la porción anterior, llegando a ser anaranjado brillante o amarillo en la mayor parte del cuerpo. Los jóvenes poseen una línea azul cielo por debajo del ojo, la cual se fracciona en manchas conforme el pez alcanza la madurez; llegando a desaparecer por completo con la edad (Vásquez, 2005).

Posee el perfil anterior de la cabeza muy empinado, hocico algo puntiagudo y preoperculo con escotadura. Las aletas generalmente son amarillas o naranja; la aleta dorsal presenta 10 espinas y 14 radios blandos, aleta anal con 3 espinas y 8 radios; la aleta caudal ligeramente bifurcada; 5-6 hileras de escamas entre la línea lateral paralelas con ella. Presentan dientes cónicos o coniformes generalmente enfrente de la mandíbula y dientes vomerianos triangulares con una extensión media posterior. Alcanza una talla máxima de 66 cm en total (Baldetti, 1999).

Figura 6. Ejemplar adulto de pargo amarillo, *Lutjanus argentiventris*. Fuente: http//www.discoverlife.org

5.3. Alimentación

Los pargos son depredadores carnívoros, oportunistas y eurifagos, que se encuentran en la zona bentónica a lo largo de los trópicos y sub-trópicos del mundo consumiendo una gran variedad de presas como cangrejos, camarones, variedad de invertebrados, como moluscos, poliquetos y otros (Castillo *et al.,* 2007).

En los estómagos de varias especies han sido encontrados de 80 a 120 taxa, muchos de ellos a nivel de familia o género. Sin embargo, en condiciones específicas del hábitat en que predominan determinadas presas, los pargos pueden tener un espectro alimentario más estrecho. La mayoría de las especies tienen hábitos nocturnos, pero aquellas de mayor talla, frecuentemente también se alimentan en horas del día (Claro y Lindeman, 2004).

Dentro de las formas planctónicas del contenido estomacal se incluyen copépodos, eufácidos y larvas de otros organismos no identificados. Con respecto a los moluscos, se reportan gasterópodos pelágicos (pterópodos y heterópodos) y urocordados pelágicos. Los pargos se consideran completamente carnívoros y en su dieta claramente domina el alimento animal. Sin embargo, en algunas ocasiones se ha reportado material vegetal en su tracto digestivo. Varios autores sugieren que este es ingerido accidentalmente al capturar su alimento rutinario (Gamboa y Valverde, 2005).

En las especies estudiadas del género Lutjanus se han observado cambios ontogénicos en la composición del alimento: las post-larvas y juveniles tempranos se alimentan de zooplancton (incluyendo larvas de peces). A partir del asentamiento se alimentan principalmente de pequeños invertebrados bénticos, preferentemente de crustáceos y moluscos (Rojas *et al.,* 2004).

En muchas especies de pargos se han observado notables variaciones estacionales en la utilización del alimento, relacionadas con las condiciones ambientales y la estructura del hábitat por ejemplo; después del desove y coincidiendo con temperaturas altas del verano, aumenta la intensidad de alimentación, lo cual favorece el crecimiento durante ese período de vida (Rojas *et al.,* 2004).

Utilizando como indicadores indirectos de la intensidad de alimentación el índice de repleción gástrica y el porcentaje de peces con alimento en el estómago, se ha observado que durante las agregaciones de desove masivo, disminuye notablemente la intensidad de alimentación; aunque solo decrece en los pocos días que dura el desove, y en los momentos en que los peces están agrupados en pequeñas áreas.

En el estado de Sinaloa, México se analizó el espectro alimenticio de *Lutjanus argentiventris*, el cual, estuvo compuesto por 13 presas pertenecientes principalmente a tres grandes grupos taxonómicos: crustáceos, peces y moluscos. Existiendo una variación estacional en el consumo de las presas según las épocas del año: los camarones entre Enero y Febrero; *Sarninops* entre abril y mayo y los crustáceos en Julio y Septiembre (Santamaría-Miranda *et al.,* 2005).

Rojas M. *et al*. (2004), En un estudio realizado en Los Cóbanos y Puerto La Libertad, El Salvador para *Lutjanus guttatus,* encontró que éste presenta un amplio espectro alimentario, considerando como una especie depredadora oportunista bentónico carnívoro y polífago, con preferencia hacia el consumo de crustáceos (seis familias, 11 especies), durante todo el año y en menor grado alterna su alimentación con peces (dos familias, dos géneros y dos especies) y ocasionalmente moluscos (Cefalopoda y Bivalvia). Encontrando además cambios ontogénicos notables en la alimentación ya que los juveniles (15.8-22.0 cm) consumieron casi exclusivamente crustáceos. Con el crecimiento se incrementó la proporción de peces en su dieta, llegando los adultos a ser ictiófagos exclusivos.

Saucedo (2000), analizó el contenido estomacal de individuos de *Lutjanus guttatus* en la costa de Jalisco y Colima, México, encontrando 30 componentes alimentarios pertenecientes a peces, crustáceos, moluscos y anélidos. Además encontró variaciones en el espectro alimentario, en el mes de julio los organismos más abundantes fueron los camarones, en noviembre los peces y en diciembre camarones y otros crustáceos y en mayo predominaron los peces.

Rojas-Herrera y Chiappa-Carrara (2002), describen a *Lujanus guttatus* como una especie depredadora generalista y facultativa, debido a que en el estudio realizado en la Costa de Guerrero, México la mayor parte de su dieta estuvo compuesta por peces en especial de las familias *Engraulidae* y *Clupeidae*. El segundo grupo en importancia estuvo representado por los Crustáceos; que constituyeron el componente alimenticio de los Juveniles, y en algunos casos por Moluscos y Poliquetos, ingeridos de forma casual. Durante la etapa adulta, esta especie consume mayor cantidad de peces.

Por su parte, Vásquez (2005), considera a *Lutjanus argentiventris* como un depredador selectivo ya que mediante un estudio en la bahía de la Paz, México, para determinar el espectro trófico y posibles variaciones de la dieta en función de la talla y el sexo identificó 65 tipos de presa, de los cuales 29 fueron crustáceos, 22 peces, 1 cefalópodo, 1 Poliqueto y material vegetal. En ambos sexos la dieta principal fueron los huevos de Lenguado, mientras que durante la época fría lo fue *Herengula thrissina*; y para el caso de los juveniles las presas de mayor importancia fueron *Upogebia pugettensis* y camarones.

Diversos estudios realizados en especies del genero *Lutjanus* han demostrado que los cambios en los patrones alimentarios pueden ser resultado de varios aspectos, entre ellos la abundancia del recurso presa, cambios ontogénicos, oferta alimentaria disponible, migraciones espaciales (desde el manglar hacia el pélagos) y desplazamientos batimétricos. Como no existen antecedentes que señalen los balances energéticos comprometidos en la búsqueda de alimento, se asume que la estrategia de los pargos es compensar con peces y moluscos la energía que fácilmente conseguía consumiendo crustáceos (Rojas *et al.,* 2004).

5.4. Reproducción

A la familia Lutjanidae se clasifica como organismos gonocóricos con dimorfismo sexual poco aparente. Altamente fecundos llegando a producir 5-7x 10^6 óvulos por hembra (Vásquez, 2005).

Según Grimes (1987), la madurez sexual en los pargos ocurre generalmente cuando alcanzan tallas equivalentes al 35-50% del largo máximo en la población. Sin embargo, tales cifras están sesgadas por el método de análisis. Muchos autores emplean la talla mínima encontrada, la cual es muy variable en cada especie y puede

no representar la población. Al utilizar la talla media de madurez, se observa que es más de 50% de la talla máxima en la mayoría de las especies.

Grimes (1987) y Claro y Lindeman (2004) reportan dos modelos estacionales de reproducción: 1) Poblaciones continentales y especies que desovan durante el verano (desovadores porcionales restringidos) y 2) Poblaciones insulares y especies que se reproducen a lo largo de todo el año, con pulsos durante la primavera y la época de lluvia.

Las poblaciones que habitan en ambientes relativamente ricos maduran a tallas menores, en relación con su largo máximo, que aquellas que viven en un medio más pobre. Otra hipótesis para explicar el efecto del hábitat sobre la talla de maduración es que la selección favorece a los peces grandes de las islas debido a que el costo fisiológico del desove prolongado durante casi todo el año es mayor que en los reproductores con un período más corto de desove, como ocurre en las poblaciones continentales (Claro y Lindeman, 2004).

Generalmente los sitios de desove de los pargos se localizan cerca del talud de la plataforma, en áreas de complejo relieve, donde el sistema de circulación permite la dispersión de las larvas y su posterior regreso a las aguas someras. La mayoría de las especies de Lutjanidae forman agregaciones de desove transitorias, generalmente estas especies realizan largas migraciones desde las aguas interiores de la plataforma hacia el borde de ésta (Figura 5).

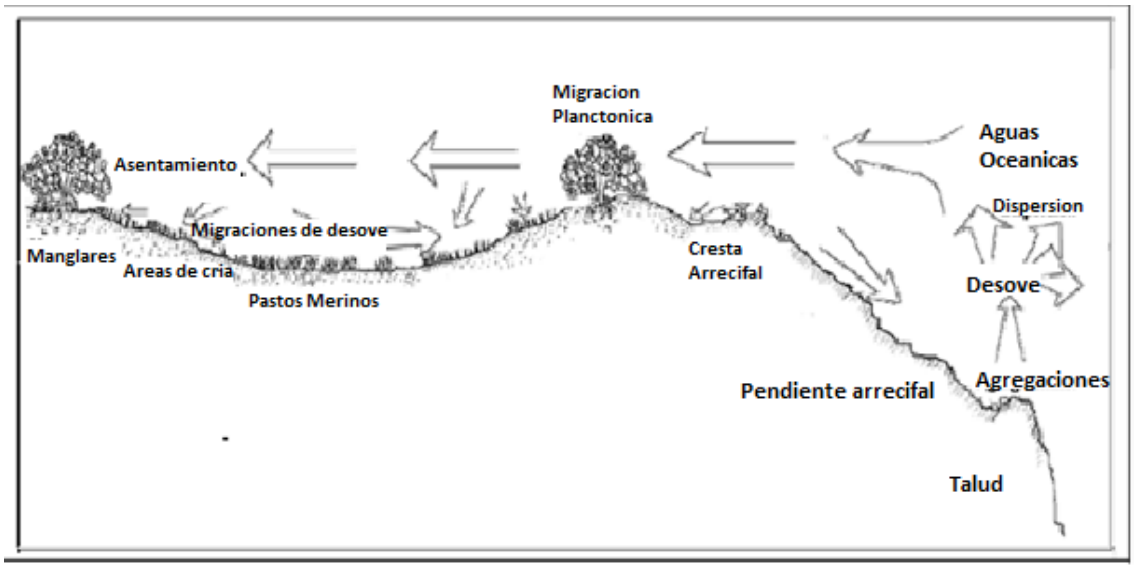


Figura 7. Esquema del ciclo reproductivo de los pargos. Fuente: Claro y Lindeman, 2004.

Los pargos producen huevos pelágicos (±0.8 mm diámetro) con un glóbulo de aceite; después de la fertilización, el vitelo es absorbido en aproximadamente dos días, después de los cuales comienza la alimentación activa. La etapa larval transcurre generalmente en aguas oceánicas o cerca la plataforma, principalmente entre 10 y 50 m de profundidad. Muchos autores han argumentado que la dispersión de larvas desde los sitios de desove es un factor esencial para el mantenimiento de las poblaciones en otros sitios a gran distancia corriente abajo (Claro y Lindeman, 2004).

En casi todas las especies de Lutjanidae el desove ocurre durante el crepúsculo o la noche, y generalmente asociado a alguna fase de la luna y con las mareas altas. (Claro y Lindeman, 2004). Existiendo la posibilidad de que algunas especies de *Lutjanus* puedan demorar su metamorfosis y asentarse en áreas costeras solo cuando encuentran condiciones favorables de régimen hidrológico y fases de la luna. Específicamente, ello incluiría la existencia de vientos y corrientes de marea hacia la costa asociadas con la luna nueva (Doherty, 1991).

La tasa de crecimiento demersal es alta y puede alcanzar 1 mm por día. Los pargos si presentan pequeñas diferencias morfológicas y ecológicas, asociadas con el momento del asentamiento y con los estadios de los juveniles tempranos (Castillo *et al., 2007).*

A pesar de su importancia comercial, poco se sabe acerca de la biología reproductiva de *Lutjanus guttatus*. Diversos autores han reportado estudios en los cuales se observa las diferencias en cuanto a tallas de madurez sexual y picos reproductivos en la Tablas 3 y 4 se resumen algunos.

Rojas (1997) reporta que en el Golfo de Nicoya, Costa Rica, presenta un prolongado período de desove, con dos picos principales, uno en el mes de abril y otro más en el mes de octubre. Se cree que cuando el *Lutjanus guttatus* alcanza tallas entre 20 y 24 cm de longitud estándar (tallas poco frecuentes en zonas estuarinas) e inicia una migración mar afuera para su reproducción, la cual posiblemente comienza en el mes de julio. El desove se extiende durante los meses de septiembre a noviembre y se puede catalogar como sincrónico, lo cual sugiere una sola época de desove en el año que podría coincidir con picos de fuerte pluviosidad.

También se ha reportado la edad de madurez sexual de *Lutjanus guttatus* cuando alcanza valores similares de 29 cm de longitud en Colima y México (Sarabia- Méndez *et al.,* 2010) y Rojas (1997) de 31.5 cm en el golfo de Nicoya, Costa Rica. La

longevidad determinada está en 13.5 años y se propone una talla mínima de captura de 45 cm.

Cruz-Romero *et al*. (1991), determinaron dos picos reproductivos para esta especie en el estado de Colima, México, uno durante la época de lluvias que coincide con la presencia de temperaturas altas (julio-noviembre) y otro más corto de febrero a abril.

Arellano- Martínez *et al*. (2001), encontraron en los organismos de *Lutjanus guttatus* que recolectaron desde febrero de 1993 a diciembre de 1994 una proporción de sexos poblacional fue de 1M:0.96H y no se observaron diferencia significativa (P≤0,05) de la proporción esperada de 1:1. Las gónadas se analizaron histológicamente y se describieron las fases de desarrollo gonadal. *L. guttatus* presento un desarrollo asincrónico de las gónadas y se considera un desovador parcial. La actividad reproductiva estuvo presente todo el año aunque con dos períodos reproductivos principales (marzo-abril y agosto-noviembre) representados por altos porcentajes de gónadas categorizadas como maduras y en desove.

El pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* es una especie gonocórica con una proporción de sexos de 1:0:9 (H:M) en Baja California Sur, la etapa de desoves múltiples ocurre a finales de junio y en los primeros días de noviembre. El intervalo de peso para la fecundidad en las hembras de 540 a 639 g (entre 26 y 28 cm aproximadamente) es de 1.000 a 15.725 huevos por hembra, con un porcentaje de eclosión del 83.26% (Vásquez, 2005).

Dado su amplio rango de distribución en el Pacífico oriental, es posible que la especie adopte diferentes estrategias reproductivas, de acuerdo con la zona en que se encuentre. Así, la estrategia de un período reproductivo prolongado en Colombia le permite mayor éxito en la reproducción de acuerdo con las condiciones medioambientales del Pacífico colombiano, mientras que en México las temporadas demarcadas de reproducción van más acorde con las condiciones medioambientales de esas latitudes (Rojas *et al.,* 2004).

Las dos especies del género Lutjanus han sido estudiadas en el Parque Nacional Natural Gorgona en Colombia por varios autores los cuales reportan diferencias en cuanto a su talla de madurez sexual y picos reproductivos por ejemplo en el año 1999; Zorrilla evaluó los aspectos reproductivos de algunos peces demersales encontrando que para *L guttatus* la madurez sexual se obtuvo entre 40-44 cm de longitud total y los

picos entre noviembre, diciembre y marzo, para *L. argentiventris* encontró que la madurez estuvo cuando alcanzaron 54,5 cm de longitud total y los picos reproductivos entre junio, agosto y diciembre, reportando además que la captura infiere con la población ya que no se estaría recuperando con respecto a su madurez sexual. Por su parte en el año 2003, Peña evaluó los aspectos reproductivos y la ecología trófica de las especies encontrando que la talla de madurez sexual fue de 46,5 para *L. guttatus* y 50,7 para *L. argentiventris* y los picos reproductivos de abril, julio, septiembre y noviembre y agosto, octubre y diciembre respectivamente. Planteando igualmente que la actividad pesquera en la costa pacífica colombiana está afectando la disponibilidad de recursos afectando el equilibrio de las comunidades de peces.

Cuando alcanzan tallas de 18–24 cm de longitud total los individuos comienzan a migrara mar afuera para su reproducción, esto se corrobora por diversos autores quienes sugieren que las especies del genero Lutjanus requieren para su reproducción temperaturas y salinidad superior a la de los sistemas estuarinos y el fotoperiodo también influye en la maduración de las gónadas (Zorrilla, 1999).

Tabla 3. Periodos de reproducción para *L. guttatus*, y *L. argentiventris* reportado por varios autores.

	Periodo de reproducción	Sitio	Referencia
L. guttatus	Junio –Julio y Septiembre – Octubre	Jalisco, México	Cruz –Romero *et al* (2006)
	Marzo – Abril y Julio - Noviembre	Colima, México	Cruz Romero *et al* (1991)
	Mayo – Junio y Noviembre a Enero	Colima, México	Cruz – Romero y Espino – Barr (2006)
	Abril y Agosto	Michoacan, Mexico	Sarabia Méndez *et al*, 2010
	Marzo y septiembre	Golfo de Nicoya, Costa Rica	Soto Rojas, *et a*l (2009)
	Abril y Agosto – Diciembre	Guerrero, México	Arellano *et al* (2001)
	Nov- Dic- Marzo	Colombia	Zorrilla (1999)
	Abril – Julio – Sept –Nov	Colombia	Peña (2003)
L. argentiventris	Junio – Agost- Diciembre	Colombia	Zorrilla (1999)
	Mayo a Diciembre	Colombia	Rojas et al. (2004)
	Agosto- Octubre – Diciembre	Colombia	Peña (2003)

Tabla 4. Talla a la cual se alcanza la madurez sexual en varias localidades del Océano pacifico.

Especie	Relación macho/ hembra	Edad de madurez sexual (cm)	Lugar	Referencia
L. guttatus	- -	17-18	Colima, Mex	Cruz –Romero *et al*. (1991
		33	Costa Rica	Rojas (1997)
	1:1	18-26	Golfo de Nicoya, Costa Rica	Soto Rojas et al. (2009)
	1: 0.96	18-36	Guerrero, Mex	Arellano- Martínez (2001)
		30,6	Michoacan, Mex	Sarabia Méndez et al. (2010)
	1:1	25	Guatemala	Baldetti (1999)
	1:1	40-44	PNNG (Colombia)	Zorrilla (1999)
	1:!,2	46,5	PNNG (Colombia)	Peña (2003)
L. argentiventris		19-20	Colima, Mex	Cruz –Romero *et al*. (1991)
		25	El salvador	Funes y Matal (1989)
	1:1,2	51,5	Colombia	Rojas et al. (2004)
	1:1	35	Guatemala	Baldetti (1999)
	1:1,1	54,5	PNNG (Colombia)	Zorilla (1999)
	1:1	50,7	PNNG (Colombia)	Peña (2003)

5.5. Crecimiento

Diversos autores han evaluado el crecimiento de las especies de pargo *L. guttatus* y *L. argentiventris* principalmente en Golfo de Nicoya Costa Rica (Soto-Rojas *et al.,* 2009) México (Sarabia-Méndez *et al.,* 2010; Castillo *et al.,* 2007) y el Golfo de California (González–Ochoa *et al.,* 2009; Maldonado-García *et al.,* 2012) basándose en el modelo de Von Bertalanffy para describir el crecimiento de los peces, ya que suministra información sobre la forma de crecimiento de los peces en términos de longitud mediante la siguiente ecuación: $L_t = L_\infty (1-e^{-k(t-to)})$, en la cual L_t es la longitud del pez al tiempo o edad t, $L\infty$ es la longitud máxima que podría alcanzar el pez, k es la tasa intrínseca de crecimiento o constante catabólica, t es la edad y t_o es la edad teórica en que el pez tenia longitud cero, considerando un crecimiento de acuerdo a la ecuación (Rojas, 2001).

Vale la pena resaltar que K es el factor de condición es decir el estado fisiológico del pez, que está condicionado por la interacción de factores bióticos y abióticos y las variaciones en ese estado pueden ser explicadas a través de éste factor de condición. Además indica las condiciones alimentarias recientes y varia durante el ciclo de

madurez sexual de un pez, elimina el efecto del ovario y refleja el verdadero estado fisiológico del pez durante el periodo de desove (Zorrilla, 1999).
Se expresa de la siguiente manera:

$$K = \frac{Pt}{Lt \times 100}$$

La comparación de las relaciones longitud- peso de una misma especie en diferentes zonas de estudio pone de manifiesto diferencias notables. Sin embargo se coincide en afirmar que la familia Lutjanidae presenta altas longevidades y crecimiento lento. (Soto-Rojas *et al.,* 2009), por ello al comparar los parámetros poblacionales entre investigadores surgen divergencias que se relacionan con variaciones de tiempo y espacio propias de las poblaciones de cada especie. En la tabla 5 se obtienen valores comparativos de parámetros de crecimiento para *L. guttatus* reportados por Soto-Rojas *et al*. (2009) y Sarabia-Méndez *et al.* (2010).

Tabla 5. Parámetros de crecimiento de *Lutjanus guttatus* en el pacifico mexicano. Soto-Rojas *et al*. (2009) y Sarabia- Méndez *et al.* (2010)

Autor	**L_∞ (cm)**	**Factor de condición k(años)**	**Sitio**
Cruz y Chávez (1993)	64	0,19	
Vargas (1998)	67	0,3	
Andrade (2003)	66,4	0,13	
Fishbase (2007)	64,2	0,19	
Soto Rojas *et al.* (2009)	65,9	0,13	Golfo de Nicoya, Costa Rica
Amezcua *et al*. (2006)	66,19	0,13	Golfo de California
Espino- Barr *et al.* (1996)	80,0	0,26	Colima
Cruz–Romero *et al* .(1991)	64,0	0.19	Colima
Ruiz-Luna *et al*. (1985)	74,0	0,19	Michoacán
Rojas- Herrera (2001)	68,4	0,13	Guerrero
Sarabia–Méndez *et al* (2010)	62,0	0,22	Michoacán

En cuanto a *Lutjanus argentiventris*, son pocos los trabajos realizados en esta especie. Vásquez, (2005); reporta un crecimiento longitudinal asintótico para *L. argentiventris*, con una longitud máxima de 685 mm; peso máximo de 6,68 g; tasa de crecimiento anual de 0.15 año, Una longevidad de hasta 19 años; talla mínima de maduración 190 a 200 mm.

Rojas *et al.* (2004), al realizar un estudio acerca de la dinámica población de esta especie en el Parque Nacional de Gorgona, encontró que la estimación de los parámetros de crecimiento en machos fueron L_∞ *(LT)* = 970 mm, K = 0,27 año-1, t_0 = -0,53 años, y en hembras L_∞ *(LT)* = 980 mm, K = 0,29 año-1, t_0 = -0,49; no presentando diferencias significativas al realizar el estudio comparando los fenómenos de la niña y del niño para la época de estudio, además reportan un crecimiento mayor de esta especie al compararla con estudios realizados en México . Difieren estos resultados de los encontrados por Torres (1996) en Bahía Solano donde reporta 270-360 mm L_t.

Rubio *et al*. (2001) reporta una tasa de crecimiento en *L. argentiventris* criado en jaulas flotantes en Buenaventura entre 0.56 y 0.74 g y tasas máximas de crecimiento que fluctuaron entre 1 y 1.6 g/día, las supervivencias para la especie fluctuaron entre 80-100%; siendo máxima la supervivencia a las mayores densidades ensayadas.

Maldonado–García *et al.* (2012), reporta un óptimo crecimiento y eficiencia en la utilización de dietas con niveles de proteína del 55%, en fases de desarrollo tempranas, ya que los peces era juveniles de 18g.

Las diferencias en la talla promedio de captura en diferentes lugares y a diferentes profundidades es un argumento más que apoya la eventual distribución batimétrica por tallas de esta especie (Rojas *et al*., 2004).

Tabla 6. Comparación de los parámetros de crecimiento en estudios realizados sobre *L. argentiventris* (Rojas *et al.,* 2004).

Autor	L_∞ (mm)	Factor de condición k(años)	Lugar
Cruz – Romero *et al.* (1996)	685 -802	0.16	Colima, Mexico
Torres (1996)	720	0.15	Colombia
Rojas et al. (2004)	970	0.20	Colombia

5.6. Área de estudio, Zona Pacifica Colombiana

El Pacífico colombiano comprende de norte a sur las áreas de los departamentos de Chocó, Valle del Cauca, Cauca y Nariño. Tiene una longitud de línea de costa de 1392km aproximadamente y se extiende desde punta Ardita en las fronteras con Panamá (7°17´N y77°52´W) hasta bahía Ancón de Sardinas en inmediaciones de la desembocadura del río Mataje en los límites con el Ecuador (1°28´N y 78° 46´W) (Narváez y Severiche, 2010).

El Pacífico Colombiano es un territorio de suma importancia por ser una de las zonas más ricas del planeta en diversidad de recursos naturales. Geomorfológicamente, se encuentra dividido en dos grandes zonas: a partir de Cabo corrientes, en Choco, hacia el Norte se extiende una gran zona de acantilados, dominadas en su mayoría por las estribaciones de la Serranía del Baudó. Al sur de cabo Corrientes el paisaje es bajo, con extensas llanuras intermareales, planicies aluviales, deltas e islas barreras, interrumpido en las bahías de Málaga, Buenaventura y norte de Tumaco por colinas y terrazas altas (Narváez y Severiche, 2010).

La región es una de las zonas más lluviosas y húmedas del planeta debido a la influencia de la Zona de Convergencia Intertropical (ZCIT) y otros factores de carácter regional y local. Se destacan tres zonas de comportamientos característicos: zona norte, ubicada entre Punta Ardita y la población de Pizarro en el departamento del

Choco, zona central, hasta Punta del Coco en el Cauca y zona sur, de este punto hasta los límites de Cabo Manglares en el departamento de Nariño. El potencial hídrico de la vertiente del Pacífico es una fuente de riqueza natural, siendo abundante en fauna marina y fluvial, con variedad de peces, moluscos y crustáceos, lo que ha incrementado la actividad pesquera en la región que por lo general es de tipo artesanal (Narváez y Severiche, 2010).

Sin embargo, la presencia de fenómenos como El Niño, el viento superficial del oeste, conocido localmente como “Chorro del Chocó”, o locales, condicionados por el relieve, vegetación, la latitud y la altitud, además de las corrientes marinas, causan variaciones importantes que modifican las condiciones del comportamiento climático (Narváez y Severiche, 2010).

Esta zona está clasificada como cálida, con temperaturas entre 27 y 29°C, un promedio anual de 25.7°C y fluctuaciones extremas entre 19 y 32°C. En la zona norte los registros de temperatura oscilan entre 20.6°C y 32.6°C, mientras que en la zona central la temperatura promedio es de 27°C y en la zona sur de 25.7°C (Tejada *et al*., 2003; Posada *et al*., 2009).

En la costa Pacífica colombiana los vientos Alisios del Sureste se recurvan por efecto de la fuerza de Coriolis y se convierten en vientos Ecuatoriales del Oeste ó Alisios del Oeste (Tejada *et al*., 2003). Entre enero y abril, cuando la ZCIT se dirige hacia el norte, los vientos son débiles, con un rango de 0.3 y 3 m/s. De mayo a septiembre, cuando la ZCIT ejerce su máxima influencia la intensidad del viento aumenta, alcanzando valores promedio de 6 m/s. El regreso de la ZCIT hacia el sur, al final de año, implica de nuevo condiciones de calma con vientos débiles.

La distribución espacial del brillo solar anual indica tres horas al día promedio, que va desde las 7:00 a 10:00 horas. En tanto que los valores de humedad relativa son muy similares en toda la costa pacífica con promedios de 85.63 % en la zona norte y de 86.41 % al sur (Posada *et al.*, 2009).

5.6.1. Bahía Tumaco

La bahía de Tumaco, se constituye como la mayor entrante del litoral nacional, entre las latitudes 1°45’ y 2°00’N y las longitudes 78°30’ y 78°45 O, comprendiendo un área aproximadamente de 350 km^2, con profundidades que varían entre 0 y 50 m. Se divide

en dos regiones claramente diferenciadas: una de tipo oceánico (noroeste de la línea imaginaria entre Bocagrande e Isla del Gallo), donde las profundidades son superiores a los 40 m, y una interna, de tipo somero, cuya batimetría exhibe mediciones de 1 a 10m. Está limitada en la parte oeste por el Océano Pacifico; al este por el continente en sectores conocidos como Llanaje, Soleda, la Chorrera; por el norte con la Isla del Gallo y Salahonda; y por el Sur con las islas Tumaco y Bocagrande. La marea influye en la variación de la concentración de diferentes parámetros fisicoquímicos y biológicos, por lo que se considera un factor determinante de la calidad de agua para la bahía de Tumaco. Durante la marea baja, el rango de temperatura está entre 26.5-28.8°C. La salinidad superficial de la bahía de Tumaco registro el menor valor promedio en septiembre (25.47) y el mayor en octubre (28.91) (Velasco y Rodríguez, 2010).

5.6.2. Bahía Málaga

Se encuentra ubicada en la porción media de la costa Pacífica colombiana y, de acuerdo a sus características bioclimáticas pertenece a la categoría de bosque muy húmedo tropical (*bmh-T)*. La Bahía de Málaga se halla ubicada entre los 3° 58' y 4° 05' de latitud Norte y los 77° 19' y 77° 21' de longitud Oeste. Tiene un área total de 126 Km^{2}, correspondientes al espejo de agua, y un área de influencia estimada en 200.000 Ha. El área de influencia tiene como límites el río San Juan al Norte, al Este la carretera de acceso a la Base Naval de Bahía Málaga, al Sur la costa del Istmo de Pichidó y al Oeste las 12 millas del Mar Territorial. Administrativamente Bahía Málaga pertenece al Municipio de Buenaventura, en el Departamento del Valle del Cauca, Colombia (PNN, 2009). Bahía Málaga presenta variabilidad fisicoquímica: la temperatura del agua superficial oscila entre 26,6 ºC y 29,7 ºC; y la salinidad, entre 1,3 y 30, como consecuencia de los aportes de agua dulce que recibe por quebradas de caudal relativamente bajo (La Sierpe y Los Agujeros). La humedad relativa de la región es aproximadamente de 90 % y las precipitaciones son abundantes y oscilan entre los 5.000-7.000 mm al año (Betancour- Portela, *et al.,* 2011).

En correspondencia con esta gran riqueza ecosistémica, Bahía Málaga alberga una inmensa diversidad de especies de fauna y flora, continental y marina, siendo un refugio para una gran variedad de especies (PNN, 2009). La salinidad del agua en la región del borde exterior, es inferior a la de las zonas centrales de la bahía en los períodos de lluvia. Aparentemente las aguas del río San Juan, que desemboca

algunos kilómetros al norte, son retenidas por las aguas de la marea ascendente y se dirigen hacia el sur pegadas a la costa alcanzando y penetrando ligeramente a la zona central de la bahía (Cantera, 1991). Esta masa de agua puede observarse como una pluma turbia que desciende desde una de las desembocaduras del río San Juan y que entra a la bahía hasta la zona conocida como el estero de los Agujeros.

5.6.3. Bahía Solano

Bahía Solano está situada en la parte norte del litoral Pacífico, en Latitud 06°14' 00" Norte y Longitud 77°24'00" Oeste. El puerto de Bahía Solano se encuentra a 2 metros aproximadamente sobre el nivel del mar, tiene un área de 1.667 kilómetros cuadrados y una población de 7.000 habitantes. La amplitud de marea es de hasta 3.46 metros y prevalecen los vientos del norte. Las condiciones climáticas de la zona están determinadas fundamentalmente por la Zona de Convergencia Intertropical (ZCIT). La faja intertropical de bajas presiones en donde confluyen durante todo el año los vientos Alisios del nordeste y sureste llamada ZCIT genera dos periodos de precipitación (Abril Junio y Septiembre- Noviembre). El régimen de la precipitación para el municipio de Bahía Solano, está directamente influenciado por la zona de convergencia intertropical (ZCIT), la cual a su vez puede sufrir intensificaciones o atenuaciones en su efecto por el factor orográfico. Este fenómeno se pone de manifiesto por el efecto de las corrientes húmedas procedentes del océano, constituyéndose por lo tanto en una de las regiones más húmedas de Colombia. Los totales anuales de precipitación normalmente superan los 5.000 mm anuales. El promedio anual de temperatura es de 26.3ºC. La humedad relativa media en general se mantiene por encima del 85%, tanto en el período de mayor lluviosidad como en el de menor precipitación (IIAP, 2005).

El número de horas de brillo solar se haya influenciado en la zona en gran medida por la precipitación en los diferentes meses del año. Los valores oscilan entre 52 y 100 horas mensuales, presentando al mes de noviembre como el más bajo y el mes de febrero como el más alto (IIAP, 2005).

5.7. Variabilidad genética

El uso de métodos genéticos moleculares aportan nueva información concerniente a la estructura genética de especies, dando lugar al surgimiento de métodos conceptuales y operacionales en campos que van desde la estimación de filogenia a nivel de especies hasta el estudio de patrones en la estructura genética (Slatkin, 1994).

La estructura genética refleja el número de alelos intercambiados entre poblaciones, y este intercambio de genes homogeniza las frecuencias alélicas entre ellas, determinando los efectos relativos de la selección y de la deriva genética. El alto flujo de genes descarta una adaptación local y por lo tanto también impide los procesos de especiación, entonces, si la cantidad de genes cambiados es bastante grande entre subpoblaciones, ellos forman una unidad panmíctica, es decir totalmente al azar. Por otro lado, el alto flujo de genes genera nuevo polimorfismo en las poblaciones, e incrementa el tamaño efectivo de la población, por esta razón se opone a la deriva genética, generando una nueva combinación de genes sobre las cuales la selección puede potencialmente actuar (Balloux, 2002).

En años recientes, los métodos de genética molecular han sido ampliamente usados para estimar la diversidad genética en las poblaciones, y determinar la estructura genética dentro y entre especies. Comprender el patrón de variación genético de la especie, significa evaluar los genotipos de diferentes individuos (Slatkin, 1994).

El uso de métodos moleculares para definir unidades biológicas se basa en el supuesto de que una unidad se encuentra aislada reproductivamente de otras por lo menos parcialmente por lo que las diferencias genéticas se acumulan entre ellas por procesos históricos y contemporáneos (deriva génica, selección natural, flujo genético influenciados por factores bióticos y abióticos. Estas diferencias genéticas hacen de cada unidad un componente importante en la evolución de la especie Mediante la determinación genética de unidades dentro de una especie se han dado avances importantes en su conservación y manejo (Sandoval-Castillo, 2000).

Las técnicas moleculares se han convertido en un valioso instrumento para determinar la diversidad genética de las poblaciones (Pineda *et al.,* 2006). El uso de éstas ha permitido evaluar aspectos genéticos de las especies, algunas en peligro de extinción,

como la variación genética de poblaciones disminuidas geográficamente, la existencia del flujo génico entre poblaciones, la estructura genética y la definición de unidades génicas para la conservación. Con ese objetivo se han analizado técnicas genéticas particularmente la reacción en cadena de la polimerasa PCR y la secuenciación de ADN en estudios poblacionales y filogenéticos; también el ADN mitocondrial, los loci isoenzimaticos, los microsatélites o repeticiones cortas en tandem (STR), los polimorfismos de amplificación al azar (RAPD), de longitud (AFLP) y de restricción (RFLP) (Lamprea *et al.,* 2004).

La aplicación del análisis de microsatélites en peces, ha permitido establecer la relación genética intra e inter especifica entre poblaciones, mapeo genómico, pruebas de parentesco y realizar inferencias sobre un apropiado manejo de individuos en cautiverio dentro de los programas de selección artificial (O´Connell y Wright 2006).

La disminución de la variabilidad genética en las piscícolas es común debido al inadecuado manejo reproductivo, intensificando su efecto de forma que el componente genético se va homogenizando (Pineda-Santis *et al.,* 2007), siendo posible encontrar problemas de adaptabilidad y supervivencia en progenies usadas para la producción como para programas de repoblamiento (Lopera-Barrero *et al*., 2008). En lotes en cautiverio se atribuyen los problemas de disminución de la variabilidad a la utilización de pocos reproductores y al cruzamiento de individuos emparentados (Wasko *et al*., 2004).

Cuando existe una alta diferenciación genética entre los peces liberados de programas de repoblamiento, y entre las poblaciones nativas, como resultado del repoblamiento, se pueden perder importantes genes asociados con factores de adaptación a las condiciones ambientales locales (Povh *et al*., 2006). Un ejemplo de esto fue el encontrado por Almeida *et al*., (2003) y Leuzzi *et al.,* (2004), al comparar poblaciones de peces de una mismas especie separadas geográficamente en un río de Brasil, y reportando la existencia de variabilidad genética entre poblaciones.

5.7.1. Conservación de la diversidad genética

La introducción de peces en los ríos es una práctica común. Entretanto, los peces migratorios son muy prolíficos lo que limita la utilización de un gran número de reproductores. Lo cual puede promover un efecto cuello de botella, reduciendo la

variabilidad genética. Por tanto, las introducciones de peces de forma irracional, aun cuando realizadas con las mejores intenciones, pueden provocar una reducción de la variabilidad genética. Consecuentemente, esta reducción puede conducir a la pérdida de resistencia a enfermedades y de la capacidad de adaptación a nuevos ambientes (Povh *et al*., 2008).

Las introducciones de peces de forma no planeada pueden provocar una reducción de la variabilidad genética, por manejo genético y reproductivo inadecuado, y pueden provocar erosión genética en las poblaciones naturales receptoras de alevinos liberados. Así, con el propósito de implementar un programa de conservación eficiente, se debe considerar la preservación genética de las poblaciones de peces nativos, para lo cual es importante obtener una identificación y caracterización de procedimientos genéticos y reproductivos utilizados en lotes de esta especie, cuando orientados a la repoblación (Rodríguez–Rodríguez, *et al.,* 2010).

La reproducción de un gran número de peces no garantiza que su descendencia posea alta variabilidad. Es común que en la formación de las parejas de reproductores sean utilizados peces de la propia piscícola. Esto puede favorecer el cruzamiento entre reproductores emparentados genéticamente (endogamia), aumentando la homocigosis y reduciendo la variabilidad genética (Moreira *et al.*, 2003). La selección casual (no intencionada) de los peces para la reproducción también es un factor que puede reducir la variabilidad genética en las generaciones siguientes (Povh *et al*., 2006).
La reducción de la variabilidad genética puede promover mayor sensibilidad a las variaciones ambientales y eventualmente puede provocar la extinción de una especie (Lopera-Barrero *et al*., 2008). Además, puede afectar el crecimiento y la reproducción. Por tanto, la mantención de la variabilidad genética tiene gran importancia para la conservación de las especies (Barroso *et al*., 2005) y es necesaria para que los individuos enfrenten positivamente las variaciones ambientales y consigan su completo desarrollo (Povh *et al*., 2006).

El cruzamiento de peces de la población nativa con peces liberados al ambiente en programas de repoblamiento puede promover la pérdida de importantes genes para la adaptación local (Vasemägi *et al*., 2005). Esto se debe a que las poblaciones de una determinada especie tienen un conjunto de genes que les permite adaptarse al medio en que se encuentran. Así, cuando una población local es abastecida con individuos

criados en cautiverio, que no son originarios del hábitat de la población nativa, se pueden reducir o perder los genes asociados a la supervivencia (Almeida *et al*., 2003). Por lo tanto, para rehabilitar poblaciones reducidas es necesario mantener la variabilidad genética de la población nativa, aspecto que se debe considerar al momento de liberar peces al ambiente a través de programas de repoblamiento (Povh *et al*., 2006).

La identificación y caracterización genética de grupos de peces localmente adaptados y diferenciados, es fundamental para preservar la variación genotípica en poblaciones naturales, así como para detectar, en algunos casos oculta, la diferenciación adaptativa en respuesta a la heterogeneidad ambiental a pequeña escala (Carvalho y Hauser, 1995).

Colombia es considerada como uno de los países megadiverso, porque en una extensión menor al 1 % de la superficie continental mundial, contiene el 10 % de la diversidad biológica del planeta, incluyendo una alta variedad de especies de peces marinos y continentales. Durante la práctica de la pesca tradicional en los ríos colombianos, un gran número de especies de peces son capturados indiscriminadamente sin tener en cuenta el impacto genético en las poblaciones, lo que ha conllevado a una fuerte disminución en un gran número de animales de especies de las principales cuencas hidrográficas (INPA, 2001). Para contrarrestar esta erosión íctica, se planea recuperar algunas zonas de pesca devastadas mediante la repoblación. Si bien se conocen aspectos relevantes sobre la reproducción, alimentación y cultivo de algunas de estas especies, poco o nada se conoce sobre su composición genética, lo cual es indispensable para una adecuada intervención en cuencas o microcuencas.

Es evidente que por el impacto que las especies nativas han sufrido, los lotes de reproductores de las pisciculturas pueden ser una alternativa para la recuperación de las poblaciones de peces. Por lo tanto, el repoblamiento de peces en los ríos permite promover la conservación de los recursos genéticos especialmente cuando existe riesgo de extinción (Barroso *et al*., 2005).

El monitoreo genético es lo ideal en un programa de reproducción cuya finalidad es la conservación genética (ej. repoblamiento). Para esto, los marcadores moleculares son

una herramienta realista y útil para la investigación y el monitoreo de la condición genética en poblaciones nativas y en lotes mantenidos en cautiverio. En consecuencia, cualquier acción para recuperar el ambiente debe considerar métodos científicos de monitoreo. Con este propósito, los marcadores moleculares son una de las metodologías más adecuadas (Povh *et al*., 2006).

Las especies de peces de importancia comercial y especialmente aquellas amenazadas de extinción requieren un monitoreo genético continuo de aquellas mantenidas en piscícolas y de las poblaciones naturales. La disminución de la variabilidad genética puede volver un programa de repoblamiento ineficiente y proporcionar impactos genéticos irreversibles en las poblaciones nativas (Povh *et al*., 2008) que pueden llegar a la extinción de especies. Según Lopera–Barrero *et al,* (2008) el cruzamiento de individuos genéticamente distintos a aquellos encontrados en una población natural puede promover la perdida de genes importantes de adaptabilidad al ambiente, que puede influenciar en la supervivencia de progenies en el ambiente natural.

Los marcadores genéticos son instrumentos importantes para el estudio de poblaciones y lotes de peces. El desarrollo de metodologías moleculares ha permitido el análisis del genoma y de las variaciones existentes, tanto en regiones que codifican productos génicos, como en aquellas cuyas funciones aún permanecen desconocidas (Regitano, 2001).
Entre los marcadores moleculares utilizados para analizar la diversidad genética de peces, se destacan los marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) y microsatélite, ambos relacionados a la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

5.7.2. Marcadores Moleculares en acuacultura

La acuacultura es una actividad económica que, en las últimas décadas se ha expandido, intensificado y diversificado, logrando e incluyendo avances tecnológicos. De acuerdo a las estadísticas de la FAO (2011), la contribución de la acuicultura en el mercado se ha incrementado y esta rápida expansión la ha colocado dentro de los sectores productivos de alimentos de origen animal, como una de las ramas con mayor crecimiento. Debido a su importancia económica, se ha enfatizado en la

necesidad de que el sector acuícola continúe desarrollándose y alcance su máximo potencial en un esquema sustentable y sostenible.

Como todas las industrias, para lograr rentabilidad la acuicultura busca mejorar la producción a menor costo minimizando factores de riesgo, buscando por un lado optimizar los alimentos y las técnicas para el control de patógenos además de la selección y el mejoramiento genético para producir organismos con mejores rendimientos aumentando la resistencia a enfermedades y otros factores (Montaño *et al.,* 2006).

La identificación de genes relevantes para un fenotipo de interés ha abierto grandes posibilidades en la biotecnología acuícola, incluyendo el mejoramiento en las tasas de crecimiento y mejorando la calidad de los pies de cría. El desarrollo de marcadores moleculares ha tenido un gran impacto en la genética animal permitiendo un rápido progreso en trabajos de variabilidad, cruzamiento e identificación de parentesco de especies y líneas y construcción de mapas genómicos de especies acuáticas (Montaño *et al.,* 2006).

Actualmente, la búsqueda de una mejor respuesta en los caracteres cuantitativos ha conducido a inadecuadas prácticas de hibridación y en consecuencia a altos niveles de depresión causados por la endogamia (Kocher, 1997). La pérdida o aumento de la variabilidad genética en las explotaciones comerciales puede repercutir negativamente en caracteres productivos y de interés económico. Algunas prácticas de manejo que se presentan en las piscícolas y que inciden en la diferenciación y diversidad genética están relacionadas con el tamaño efectivo de la población el cual disminuye por desigualdad en la proporción sexual.

La diversidad entre organismos es consecuencia de las diferencias en las secuencias de ADN y de los efectos ambientales. La variación genética es notable, y cada individuo de una especie, posee una secuencia de ADN única. Las variaciones en el ADN son mutaciones resultantes de la sustitución de un solo nucleótido, inserción o deleción de fragmentos de ADN de diversas longitudes (desde uno a varios miles de nucleótidos), o duplicación o inversión de fragmentos de ADN (Montaño *et al.,* 2006).

La información sobre la diversidad genética es esencial para optimizar tanto las estrategias de conservación de los recursos zoogenéticos como las de utilización. Dado que los recursos para la conservación son limitados, suele ser necesaria una priorización. Las herramientas moleculares permiten la identificación de genes implicados en un conjunto de caracteres, incluyendo los caracteres adaptativos, así como los polimorfismos que causan la variación genética funcional. Existe un conjunto de marcadores ya disponibles para detectar polimorfismos del ADN nuclear. En los estudios de diversidad genética, los marcadores más utilizados son los microsatélites (Montaño *et al.,* 2006).

5.7.3. Microsatélites Amplificados al Azar, RAMs

Los microsatélites RAMs son regiones de secuencias de ADN pequeñas y repetidas, generalmente de dos a tres nucleótidos, los cuales pueden o no estar asociados con genes. Dado que la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína, y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencia, estas regiones son a menudo altamente variables y muy útiles para medir similitudes entre especies o variedades relacionadas (Morillo y Morillo, 2003).

Los polimorfismos que se observen corresponden a diferencias de longitud provocadas por un número distinto de repeticiones. Dependiendo del ADN utilizado como molde en la amplificación, los microsatélites son nucleares o de cloroplasto. La amplificación de estos elementos exige un conocimiento previo de la secuencia para poderlos utilizar como cebadores en la amplificación. Los microsatélites se corresponden con regiones hipervariables, por lo que presentan un alto grado de polimorfismo. Estos marcadores permiten realizar estudios individuales entre poblaciones, mapas genéticos y estudios filogenéticos (Morillo y Morillo, 2003).

Zietkiewics *et al.* (1994), concibió un novedoso método de medición de la diversidad genética en plantas y animales utilizando una técnica que combina el uso de cebadores que contienen secuencias microsatélites y un extremo 5’ degenerado. Esta técnica combina los beneficios de los análisis microsatélites con el universal análisis del RAPD; Hantula *et al*. (1996), propusieron denominar esta técnica como microsatélites amplificados aleatoriamente (RAMS). Escogiendo cuatro cebadores

(GT, ACA, CCA, CGA), diseñados con una longitud de 18 bases incluyendo el extremo 5' degenerado, el cual sirve de anclaje para asegurar la unión del cebador al inicio del microsatélite.

Los RAMs se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es un método altamente reproducible y permite la detección de polimorfismo en el ADN intra e interespecífico (Muñoz *et al.,* 2008). Los patrones obtenidos con los RAMS pueden ser usados para estudios de poblaciones; ésta técnica no requiere la estimación exacta de la cantidad de ADN antes de la reacción, la cual es útil cuando se analizan muchas muestras de una población y para la identificación de especies o razas (Bonilla y Espinosa, 2003).

Los fragmentos de ADN amplificados en la reacción están compuestos por dos microsatélites que están lo suficientemente cerca para que el área entre ellos pueda ser amplificada por PCR (Zietkiewics *et al.,* 1994). Como el rango evolutivo entre los microsatélites es considerablemente más alto que en la mayoría de los otros tipos de ADN habría una gran probabilidad de hallar polimorfismos mediante los RAMS que por otras técnicas (Bonilla y Espinosa, 2003).

El número medio de alelos por población, la Heterocigocidad observada y esperada (Ho y He), son los parámetros más usuales en la evaluación de la diversidad interracial. Los parámetros más simples para evaluar la diversidad interracial son los índices de diferenciación genética o de fijación (Muñoz, *et al.,* 2008).

Se han propuesto varios estimadores (F_{ST} y G_{ST}), el más ampliamente utilizado de los cuales es F_{ST}, que mide el grado de diferenciación genética de las subpoblaciones calculando las varianzas estandarizadas de frecuencias alélicas entre poblaciones. Se puede calcular la significación estadística para los valores de F_{ST} entre pares de poblaciones (Weir y Cockerham, 1994) para comprobar la hipótesis nula de una falta de diferenciación genética entre poblaciones, y por tanto, la división de la diversidad genética. Puede realizarse un análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) para evaluar la distribución de diversidad dentro y entre grupos de razas.

Los datos genéticos moleculares, complementados por datos de otras fuentes, como la evidencia arqueológica y los registros escritos, proporcionan información útil sobre los orígenes, movimientos posteriores y cambios de la diversidad genética en las

especies (Muñoz, *et al.,* 2008). El análisis combinado de los datos de microsatélites obtenidos en estudios separados es muy deseable, pero rara vez ha resultado posible. Ello se debe a que la mayoría de estudios de genética poblacional que usan marcadores de ADN se limitan a un pequeño número de razas, a menudo de un único país (Bonilla y Espinosa, 2003).

La aplicación de sistemas distintos de genotipificación causa variación entre estudios respecto al tamaño estimado de alelos en los mismos loci. Para promover el uso de marcadores comunes, la FAO propone ahora una lista actualizada y jerarquizada de loci de microsatélites para las especies agropecuarias más importantes. La FAO recomienda el uso de marcadores en el mismo orden jerárquico, para maximizar el número de marcadores que se utilizan en las investigaciones. Se ha encontrado gran abundancia de este tipo de marcadores en todas las especies estudiadas; en peces se ha estimado uno de ellos cada 10 Kb. Además se han encontrado repartidos en todo el genoma, tanto en regiones codificantes, regiones intrónicas como en secuencias fuera de los genes. La mayoría de los microsatélites son de tamaño relativamente pequeño, partiendo de algunos pocos repetidos hasta algunos cientos. Se ha observado que los microsatélites formados por un número mayor de repeticiones se relacionan con un mayor polimorfismo (Liu y Cordes, 2004).
En investigación acuícola los microsatélites ya han sido utilizados para estudios de mapas genéticos, asignación de paternidades y estudios de genética de poblaciones (Liu y Cordes, 2004).

5.7.4. Resultados de estudios de variabilidad genética en acuicultura

En acuicultura, la mayor parte de los trabajos se han enfocado hacia la evaluación de poblaciones cautivas y en menor cantidad se han realizado trabajos que evalúan la variabilidad genética a lo largo de varias generaciones empleando en ambos casos diferentes marcadores genéticos.

El salmón y la trucha son especies importantes para la acuicultura comercial, como alimento, atractivo turístico y deportivo. Además, el genoma del salmón *Salmo salar* está siendo utilizado como un modelo para estudiar el proceso evolutivo por duplicación de genes (Force *et al.*, 1999). Por su parte, la trucha arcoiris

Oncorhynchus mykiss ha sido estudiada desde el punto de vista biomédico principalmente en carcinogénesis, toxicología e inmunología comparada (Thorgaard *et al.*, 2002).

Empleando AFLP se han construido mapas génicos del salmón Atlántico y están buscando los genes que confieren resistencia a la anemia del salmón, un avance que incrementará el rendimiento en el cultivo de esta especie. Además, se ha utilizado AFLP para el análisis de impacto ecológico en trucha arco iris, detectando biomarcadores de impacto de tóxicos y otros agentes antropogénicos (Bagley *et al.*, 2001).

La Tilapia es una de las especies cuyo consumo ha ido aumentando rápidamente y donde la acuicultura tiene gran participación al proveer la mayor parte. En esta especie la técnica de AFLP se ha utilizado para la construcción de mapas génicos de tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (Kocher *et al.*, 1998) y para la búsqueda de QTLs de tolerancia al frío y ganancia de peso corporal en híbridos (Moen *et al.*, 2004). También han sido útiles para monitorear cruzas entre diferentes especies con intención de obtener una tilapia mejorada, con mayor tolerancia al frío y a la salinidad (Agresti *et al.*, 2000)

Utilizando la técnica RAPDs, Torres *et al.* (2004), en *Oreochromis spp* procedente de diferentes piscícolas del Valle del cauca, evaluaron ocho cebadores, presentando un polimorfismo que estuvo en el rango de 68.3 a 73.3% lo cual permitió discriminar las poblaciones de *Oreochromis spp*. En cuanto a la Heterocigocidad esperada los niveles encontrados para las poblaciones de *Oreochromis spp* estuvieron entre 0.19 y 0.25; y para el valor de G_{ST} fue de 0.22. Encontrando un alto grado de diferenciación en las poblaciones, es decir que en las piscícolas evaluadas existen diferencias en la estructura genética originada por el manejo genético y condiciones ambientales de la especie.

El Bagre es el pez cultivado de mayor consumo en EEUU. Actualmente se realizan estudios con bagre de canal *Ictalurus punctatus* utilizando AFLP para analizar la diversidad genética en stocks de organismos domesticados, obtención de la huella genética como criterio para selección de pies de cría y manejo para futuros análisis de interacción entre poblaciones de bagre domesticados y salvajes (Mickett *et al.*, 2003).

Los marcadores AFLP también se han utilizado para construcción del mapa génico y análisis genético del bagre de canal y del bagre azul.

Fernández–Calienes *et al.* (2003), Amplificaron al azar el ADN de 10 individuos de 5 poblaciones de *Rivulus* colectados en la región occidental de Cuba ya que este género es de gran interés para el control de las larvas de mosquitos. Evaluaron 5 cebadores de los cuales no resultó ningún marcador monomórfico, lo que evidenció una alta variabilidad genética entre los peces de las 5 poblaciones. Según la distancia genética entre los individuos, se forman 4 grupos, para cada uno de los cuales aparecen marcadores genéticos de RAPD que son específicos, porque no se evidencian en el resto de los individuos. Estos resultados apoyan la utilización del RAPD como una herramienta eficiente para la caracterización genética de poblaciones de peces del género *Rivulus* al ser capaz de detectar diferencias intraespecie e interespecie.

Pineda et al. (2006), determinaron el polimorfismo de cuatro microsatélites en individuos de *Piaractus brachypomus* provenientes directamente del medio natural, en el rio Meta. Encontrando que la diversidad genética entre las especies de peces es muy alta, sugiriendo que los individuos son aptos para el cruzamiento, para programas de conservación y para el mejoramiento genético ya que conservan parte de su acervo genético original.

Lopera-Barrero *et al.* (2008), evaluaron seis lotes de peces usados en programas de repoblamiento, para estimar la variabilidad genética mediante el marcador molecular RAPD. Los peces analizados fueron *Leporinus elongatus, Piaractus mesopotamicus* y *Prochilodus lineatus*) en tres estaciones piscícolas, ubicadas Paraná, Brasil. Los valores de variabilidad genética estimados por el porcentaje de fragmentos polimórficos y por el índice de diversidad de Shannon mostraron una alta variabilidad genética entre los lotes de *L. elongatus* y *P. lineatus*, debido posiblemente al efecto fundador y al manejo reproductivo adoptado en cada piscícola. Se determinó que existió baja diferenciación genética entre los lotes de *P. mesopotamicus*. Los resultados de este estudio fueron claves para determinar el manejo reproductivo y genético de los lotes de cada piscícola y la orientación de programas de repoblamiento, permitiendo la conservación de la variabilidad genética, de gran importancia en ambientes en cautiverio.

5.7.5. Estudios de variabilidad genética realizados especies del género *Lutjanus*

Para las especies del genero *Lutjanus* se han realizado diversos estudios para conocer parámetros reproductivos y de crecimiento más que de la diversidad genética, para ello han trabajado con microsatelites en especies como *L. argentimaculatus, L. campechanus, L. synagris, L.peru, etc.*

Los principales análisis se han centrado, en la caracterización de marcadores, que posteriormente se utilizarán para evaluar la diversidad genética existente en las poblaciones naturales y de piscifactoría, así como para el desarrollo y seguimiento de programas de selección de reproductores partiendo de stocks genéticamente diferenciados.

Sandoval – Castillo (2000), analizo la estructura genética poblacional de *L. peru* en Sinaloa, Baja California Sur y Jalisco utilizando la región control mitocondrial con técnica de PCR RFLPs. Determinando diversidad haplotípica de 0.9657 y nucleotídica de 3.23%. Planteando que no hay evidencia de la existencia de una población reproductivamente asilada entre Sinaloa y Baja California; sin hacer inferencias en la de Jalisco por el tamaño de muestra ya que fue muy pequeño. Además los linajes dominados por haplotipos encontrados en alguna de las poblaciones y los bajos valores de divergencia interpoblacionales permitieron suponer que las poblaciones no se encuentran aisladas y no presentan un alto potencial para ser heterogéneas en un corto periodo de tiempo evolutivo.

Heist y Gold (2000), analizaron la estructura genética de *L. campechanus* a partir de cinco loci polimórficos en tres localidades del Golfo de México y una en la Península de Yucatán, México; encontrando de 5 a 13 alelos por locus y una Heterocigocidad esperada que fluctuó entre 0,143 y 0,779, lo cual indica que las poblaciones de *L. campechanus* en el Golfo de México se comportan como una sola Población. Además no existe relación entre la divergencia genética y la distancia geográfica al comparar las localidades muestreadas, indicando la ausencia de un significativo efecto de aislamiento por distancia relativo a la divergencia genética. La aparente falta de estructura de la poblacional entre *L. campechanus* del Golfo es consistente con la

idea de que el flujo génico excluye la divergencia genética, ya que en general esta especie realiza pocos movimientos especialmente en estado larval.

Rocha-Olivares y Sandoval-Castillo (2003), analizaron la diversidad genética y estructura de tres poblaciones de *Lutjanus peru* en las costas de Baja California Sur, Sinaloa y Jalisco, Mexica; mediante análisis de fragmentos de restricción de toda la región de control mitocondrial. El análisis de Heterocigocidad de las frecuencias haplotipicas (χ^2 =125.1) no fue significativo y el valor de F_{ST} 0.0062 tampoco lo fue. El AMOVA corroboro la ausencia de diferenciación entre poblaciones peninsulares y continentales, sugiriendo la acción de mecanismos pasivos de trasporte larvario entre las poblaciones.

Garber *et al*. (2004), estudiaron el ADN mitocondrial en regiones del pargo rojo *Lutjanus campechanus* desde el Golfo de México y la Costa atlántica de la Florida, donde se secuenciaron para generar una base genética. La diversidad nucleotipo y haplotipo estuvo en un rango de 1.8% a 2.5% y 0.94% a 1% respectivamente. La diversidad en el ADN mitocondrial fue relativamente alta y encontraron una He para el haplotipo y nucleotidos de 0.95, más alta al considerarla con otros estudios, reportando así que la población de pargo rojo en el Golfo de México presenta una distribución unimodales característico de la expansión de la población recientemente; y las muestras de la Costa Atlántica presentaron una distribución multimodal, sugiriendo una población más estable históricamente.

Zhang *et al.* (2006), usaron microsatélites aislados para *Lutjanus argentimaculatus,* en el este de Asia. El ADN fue extraído de músculo dorsal. Inicialmente alrededor de 200ng de ADN fueron utilizados con Eco RI y Endonucleasas y la ligación fue con adaptadores (*Eco* RI adaptor), presentando un alto grado de polimorfismo (0.35-0.78) y una Heterocigosidad esperada por locus de 0.62 a 0.88. Polimorfismo considerable para esos microsatélites, lo que provee información valiosa para estudios de estructura genética en poblaciones de *Lutjanus argentimaculatus* y especies filogenéticamente cercanas pertenecientes a la familia Lutjanidae como: *Lutjanus russelli, Lutjanus erythropterus*, *Lutjanus sanguineus, Lutjanus lineolatus, Lutjanus malabarius*,*Lutjanus johni y Pristipomoides microlepis.* Indicando que los cebadores usados en este estudio son útiles también para especies de pargo filogenéticamente cercanas.

Chueng Lo *et al.* (2006), aislaron nueve microsatélites polimórficos para *Lutjanus erythropterus* entre los cuales ocho eran repeticiones de tetranucleótidos, y uno era CA-microsatélite. El número de alelos presentes para 48 individuos estuvo entre 11 – 33. La Heterocigocidad esperada vario desde 0.49- 0.97, con promedio de 0.74 donde seis de los nueve marcadores conformaron el equilibrio Hardy–Weinberg. Considerando que el desarrollo de los microsatélites puede ser considerado para estudios de la estructura poblacional de esta especie.

Renshaw *et al*. (2007), aislaron y caracterizaron loci microsatélites en especies de pargo *Lutjanus synagris, Lutjanus analis y Ocyurus chrysurus*, incluyendo 25 microsatelites codificados nucleares para 32 individuos evaluados; basados en estudios de las especies evaluadas se tuvieron en cuenta microsatelites que generaron 25 loci para *L. synagris* 24 para *Ocyurus chrysurus* y 21 loci para *L. analis*. Las comparaciones por pares de microsatélites para las especies evaluadas no se apartan significativamente de equilibrio genotípico.

En Colombia son escasos los estudios que involucran aspectos genéticos de las especies evaluadas (Landinez *et al.* 2009), los datos obtenidos se basan en aspectos biológicos y reproductivos y pesqueros de especies del género *Lutjanus* en Colombia, (Rubio *et al.* 2001; en Buenaventura) y especialmente en el Parque Nacional de Gorgona (Suarez, 1999; Zorrilla, 1999; Peña, 2003, Rojas *et al.* 2004) existiendo poca información disponible en relación con la diferenciación de stocks, lo cual es crucial para la definición y manejo de las unidades pesqueras en el País.

Landinez *et al. (*2009), Analizaron la estructura genética de *Lutjanus synagris* en tres regiones del Caribe Colombiano (Santa Marta, Islas del Rosario y Capurganá), con el ánimo de generar información que permitiera establecer políticas adecuadas de manejo pesquero, con la ayuda de secuencias microsatélites que han sido reportadas para otras especies de la familia Lutjanidae dado que para esta especie no se han desarrollado cebadores especie-específicos que amplifiquen regiones microsatélites

Encontraron que ocho cebadores de los 14 evaluados fueron polimórficos e informativos para la especie en estudio. Se encontró que todos los *loci* estaban muy alejados del equilibrio de Hardy-Weinberg debido a una marcada deficiencia de heterocigotos observada en todas las poblaciones estudiadas. Tanto el análisis de varianza molecular (Φ_{ST} en la población total= 0.006, *P*= 0.022) como el análisis espacial de varianza molecular mostraron una leve estructuración poblacional

estadísticamente significativa que separó la población de Capurganá de las demás regiones sin evidencia de aislamiento por distancia (Prueba de Mantel *Rxy* = 0.023, *P*= 0.057). Los resultados sugieren que las condiciones oceanográficas predominantes en dicha región son determinantes en la estructura genética; además se evidenciaron dos stocks genéticos distintos que deben ser manejados de acuerdo a su estructura poblacional.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Ubicación geográfica / Zonas de Muestreo

Las muestras procedían de peces capturados por pescadores artesanales en el año 2012, en la Zona de Explotación Económica (EEZ) del Pacifico Colombiano correspondiente a Bahía Tumaco, Bahía Málaga y Bahía Solano (Figura 8).

Figura 8. Mapa de las regiones de muestreo para el estudio de diversidad genética de *Lutjanus guttatus y Lutjanus argentiventris* en el Pacífico Colombiano. Fuente: Google Earth, 2012.

6.2. Material experimental

Las muestras analizadas consistían en aproximadamente 5 cm de la aleta dorsal colectadas en tubos de 50 ml con alcohol al 70% y mantenidas bajo refrigeración (4°C). Los tubos se rotularon dependiendo de la especie y zona de muestreo, hasta el momento de su procesamiento, llegando a un total de 79 muestras, las cuales no fueron uniformes debido a la disponibilidad de las especies en las zonas de muestreo. (Tabla 7).

Tabla 7. Número total de muestras por especie y sitio de muestreo.

Especie	Bahía Tumaco	Bahía Málaga	Bahía Solano	TOTAL
Lutjanus guttatus	**10**	**15**	**14**	**39**
Lutjanus argentiventris	**9**	**16**	**15**	**40**
Total	**19**	**31**	**29**	**79**

6.3. Métodos

Los análisis de las muestras se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira. Se estudió la variabilidad genética de dos especies de Pargos, con amplificación por PCR utilizando Marcadores Moleculares RAMS (Microsatélites Amplificados al azar).

6.3.1. Extracción de ADN

En el laboratorio, las muestras fueron numeradas, separadas por ubicación. El ADN fue extraído a partir de la digestión de la aleta con proteínasa K, con el uso del kit de extracción de ADN para sangre y tejido animal DNeasy® Blood y Tissue, Quiagen (Valencia, California), al cual se le debió hacer estandarización de la técnica en cuanto a volumen de Buffer empleado.

6.3.2. Evaluación de cantidad y calidad de ADN

Después de la extracción, el ADN se almaceno en tubos Eppendorf de 1,5 ml, en congelador a -4ºC, debidamente identificado, se realizó electroforesis en gel de agarosa a 0,8% corridos en tampón TBE 0.5X (Tris-borato 0045M; EDTA 0.001M) a 80 V durante 45 minutos y teñidos con bromuro de etidio 1µl, para observar los resultados de la extracción del ADN de las muestras. Después de corrido el gel, el ADN se visualizó sometiendo el gel a luz ultravioleta y fotografiándose el material obtenido.

La cuantificación del ADN se hizo adicionándose en cada gel el ADN del bacteriófago Lambda en concentraciones de 30, 60 y 90 ng/µl. Se realizaron diluciones de todas las muestras extraídas a una concentración final de 10 ng/µl (Figura 9).

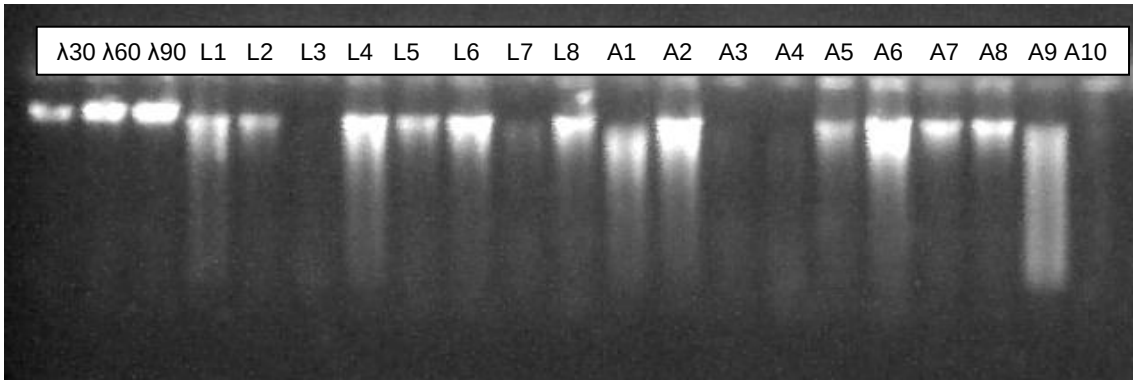


Figura 9. ADN total de pargo teñido con bromuro de etidio. (λ30; λ60 y λ90 Concentraciones del bacteriófago Lambda; L1, L2 (*L. guttatus* Tumaco); L3, L4, L5 (*L. guttatus* Málaga); L6, L7 y L8 ((*L. guttatus* Solano); A1, A2, A3 (*L.argentiventris* Tumaco); A4,A5,A6 (*L.argentiventris* Málaga); A7, A8, A9 y A10 (*L.argentiventris* Solano).

6.3.3. Metodología para marcadores moleculares tipo RAMs

Se realizó PCR utilizando la técnica RAMs basada en marcadores microsatélites utilizando cebadores que contienen 18 nucleótidos. Esta técnica se basa en la reacción de cadena de la polimerasa (PCR), el método es altamente reproducible y permite la detección de polimorfismo intra e inespecíficos (Muñoz *et al*., 2008). Se evaluaron ocho cebadores para RAMs (Tabla 8), con las condiciones de amplificación por PCR descritas por Muñoz *et al*.,(2008).

La amplificación se realizó en un volumen de 25µl y una concentración de 10 ng de DNA, 1x de Buffer Taq, 2,5mM de MgCl2, 2mM de cebador, 0,625 U Taq polimerasa, 1,25mM de cada dNTP. Las condiciones de PCR fueron distintas para cada primer en cuanto a temperaturas de hibridación. En la tabla 9 se describen las condiciones de amplificación de la técnica.

Tabla 8. Cebadores RAMs. (Muñoz *et al.,* 2008)

Cebador	Secuencia
CT	DBDCTCTCTCTCTCTCTC
CGA	DHBCGACGACGACGACGA
CA	DBDACACACACACACACACA
AG	HBHAGAGAGAGAGAGAGAG
TG	HVHTGTGTGTGTGTGTGT
CCA	DDBCCACCACCACCA
GT	VHVGTGTGTGTGTG
ACA	BDBACAACAACAACAACA

Designación para sitios degenerados

H (A o T o C): B (G o T o C)
V (G o A o C): D (G o A o T)

Tabla 9. Condiciones de amplificación para RAMs.

CONCENTRACIÓN INICIAL		CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN
1. Buffer de Taq	10x	1x	2.5 µl
2. dNTP'S	1.25 mM	0.2 Mm	4 µl
3. cebador	50 µM	2 µM	1 µl
4. $MgCL_2$	25 mM	2,5mM	2.5 µl
5. AND	10 ng/µl	20ng	2 µl
6.Taq polimerasa	5 u/µl	0.625U	0.125 µl
7.H_2O			12.9 µl
	Volumen final		25 µl

El perfil térmico se estableció de acuerdo al cebador seleccionado (Tabla 10 y 11). Los productos amplificados se visualizaron en geles de poliacrilamida al 7% (37:1 acrilamida – bisacrilamida) corridos a 160 voltios por una hora y diez minutos y teñidos con bromuro de etidio descritos en los protocolos estándar (Sambrook *et al.,* 1989). Una vez teñidos, los geles se observan en un transiluminador FBTIV-88, FisherBiotech® y fueron fotografiados con una cámara digital Kodak. Los productos de amplificación se almacenaron a -20 º C.

Tabla 10. Perfil de amplificación modificado, utilizado en la técnica Microsatélites RAM. Recomendado por (Muñoz *et al*., 2008).

PASOS	TEMPERATURA (º C)	TIEMPO (MIN.)	ETAPAS
1	95	5:00	Desnaturalización inicial
2	95	0:30	Desnaturalización
3	41-61	0:45	Hibridación
4	72	2:00	Extensión
5	37 veces desde2		
6	72	7:00	Extensión final

Tabla 11. Temperatura de hibridación para cebadores RAMs.

TEMPERATURA (°C)	PRIMER
50	AG – CA – ACA
55	CCA – TG
58	GT
41	CT
61	CGA

6.4. Análisis de datos

La información de los patrones de bandas obtenidos se registró en una matriz binaria de presencia (1) o ausencia (0). Para la selección de bandas polimórficas se consideró como locus polimórfico aquel en el cual la frecuencia del alelo más común fue menor al 95%. A partir de esta matriz y usando los programas SIMQUAL del paquete NTSYS-pc (*Numerical Taxonomy System for Personal Computer)* y el programa TFPGA (*Tools for Population Genetic Analisys*) para obtener los valores de heterocigosidad esperada y % de loci polimórficos se realizaron los análisis estadísticos (Muñoz, *et al.,* 2008).

Para el estudio del conjunto de individuos, se tuvo en cuenta la definición de similaridad de Nei-Li (1979), también conocida como similaridad de DICE (1945) cuya fórmula es:

$$Sij = \frac{2a}{(2a + b + c)}$$

Donde:

Sij= Similaridad entre el individuo i y el j.

a = N° de bandas presentes simultáneamente en los individuos i y j.

b = N° de bandas presentes en i y ausentes en j.

c = N° de bandas presentes en j y ausentes en i.

El coeficiente de Dice omite la consideración de pares negativos (0-0) y da doble peso a los pares positivos (1-1), lo que lo hace útil en términos de similaridad del DNA, en la que la ausencia compartida de una banda no es necesariamente una indicación de similaridad entre dos individuos.

El análisis de agrupamiento se realizó con el programa SAHN de NTSYS –pc (versión 2.02, 1998) utilizando UPGMA, método gráfico de agrupamiento por parejas, que usa el promedio aritmético no ponderado. El dendrograma se construyó con el programa TREE de NTSYS –pc (versión 2.02, 1998). Para estimar la diversidad genética se utilizaron los parámetros de heterocigocidad promedio esperada (He) y el porcentaje de loci polimórficos (P), los cuales se estimaron sobre todos los loci y el promedio de los mismos de acuerdo con la fórmula no sesgada de Nei (1973), así:

$$\mathbf{H = 1 - \Sigma f(i)2}$$

f(i): Frecuencia del alelo i en la población.

Para estimar las distancias genéticas entre los grupos se utilizó el coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) y cuando es igual o cercano a cero, la heterocigocidad promedio de todas las subpoblaciones es equivalente a la esperada para el total de la población, por lo que existe homogeneidad genética. Cuando F_{ST} tiene un valor cercano a uno, entonces los efectos de perdida de heterocigocidad debida a la subdivisión poblacional son equivalentes a los esperados por endogamia dentro de una localidad (Weir, Cockerham, 1984).

Se realizó un análisis de varianza molecular utilizando el programa Arlequin versión 3.5 (Excoffier, 2011).

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. Amplificación de ADN

Para los cebadores designados se presentó amplificación y polimorfismo en las especies de *Lutjanus guttatus* (Figura 10) y *Lutjanus argentiventris* (Figura 11).
Además las muestras analizadas harán parte del banco de ADN del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, con el propósito de generar datos que puedan utilizarse en futuras investigaciones.

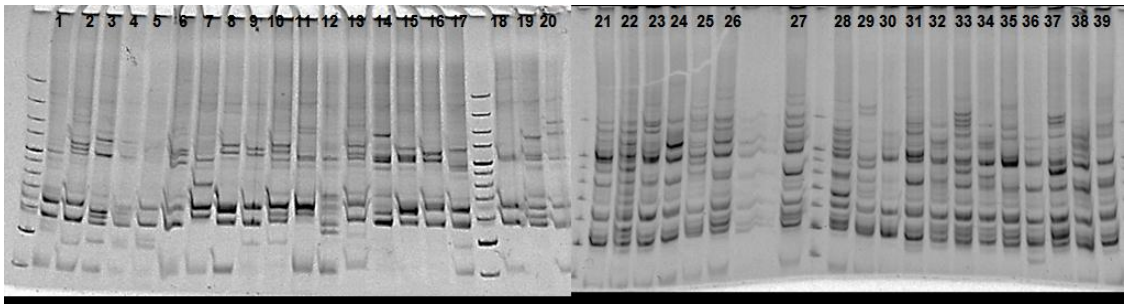


Figura 10. Gel de Poliacrilamida de individuos de *Lutjanus guttatus*, cebador ACA.

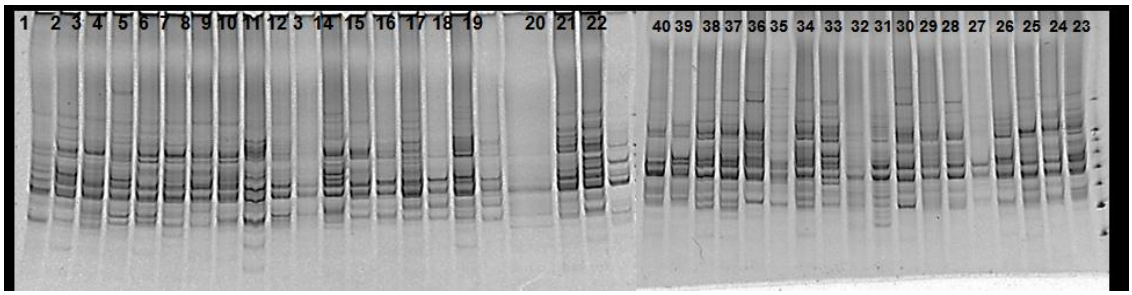


Figura 11. Gel de Poliacrilamida de individuos de *Lutjanus argentiventris*, cebador AG.

7.2. Características de los cebadores

Se utilizaron cuatro de los ocho cebadores RAM por presentar algún grado de polimorfismo en los 79 individuos de Lutjanus. Los cebadores GT, CA y CGA no amplificaron en ninguna de las muestras y el cebador TG no amplificó para la mayoría de las muestras. Los cuatro cebadores utilizados generaron un patrón de 61 bandas para *L. guttatus* y 47 bandas en *L. argentiventris* y el número de bandas por cebador estuvo entre 8 para AG y 20 CCA (Tabla 12 y 13).

Tabla 12. Cebadores, Heterocigocidad esperada y porcentaje de loci polimórficos para *L. guttatus.*

Cebador	Bandas totales	Bandas polimórficas	He	% Loci polimórficos
CCA	20	17	**0,31**	**90,0**
AG	11	8	0,25	81,8
ACA	14	12	0,23	78,5
CT	16	15	**0,35**	**93,5**
Total	**61**	**52**	**0.29**	**86,8**

Tabla 13. Cebadores, Heterocigocidad esperada y porcentaje de loci polimórficos para *L. argentiventris.*

Cebador	Bandas totales	Bandas polimórficas	He	% Loci polimorficos
CCA	11	10	**0,24**	**81,8**
AG	8	5	0,21	62,5
ACA	18	18	**0,29**	**100**
CT	10	7	0,25	80,0
Total	**47**	**40**	**0,26**	**85,1**

Los resultados de este estudio muestran gran polimorfismo, evidenciado en el elevado promedio de bandas polimórficas, lo que sugiere que los cuatro cebadores seleccionados son informativos para especies del género Lutjanus. Lo anterior es similar a lo encontrado para *C. hippurus* para los cebadores AG, CCA, CT y CGA, encontraron un patrón de 99 bandas y el número de bandas por cebador estuvo entre 15 para AG y 35 para CGA (Ordoñez *et al.,* 2012).

En trabajos realizados en diversidad genetica de animales mediante la utilizacion de la tecnica RAM para 35 cerdos criollos se obtuvo un patron de 46 loci polimorficos y el numero de bandas estuvo entre 13 y 17 para los cebadores CGA, CT y CCA. (Oslinger *et al.,* 2006); y en pato criollo colombiano para estimar su diversidad genética, se obtuvieron un total de 116 *loci* de los cuales 71 eran polimórficos con tres cebadores RAMs, para la caracterización molecular de 53 individuos (Hernández *et al.*, 2007).

De otra parte mediante el estudio de diversidad genética en Tilapia *Oreochromis sp,* evaluando 25 cebadores mediante técnica RAPD en cinco piscícolas, se identificaron 109 patrones de bandas siendo algunas especificas o únicas para peces de cada una

de las piscícolas evaluadas, variando de 3 a 10 bandas dependiendo del sitio de muestreo (Torres *et al*., 2004).

Al comparar el número de *loci* RAMs generado por estos estudios y el obtenido por el presente trabajo (61 y 47 *loci*) se considera que la técnica empleada es adecuada para estimar parámetros genéticos y evaluar la diversidad genética de especies del género Lutjanus en el Pacifico Colombiano.

Para obtener los valores de heterocigocidad esperada y % de loci polimórficos se utilizó el programa TFPGA. La heterocigocidad esperada estima la probabilidad de que dos alelos extraídos al azar del conjunto de genes de una población sean diferentes. En las Tabla 12 y 13, se puede observar el valor de heterocigocidad para la población de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* que fue de 0,29 y para la población de pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* fue de 0.26, lo que nos indica una alta diversidad en la población. Los valores más bajos los arroja el cebador ACA (0.23) para *L. guttatus* y CT (0.21) para *L. argentiventris.* A su vez, se observa que los valores de polimorfismo para *Lutjanus guttatus* y *Lutjanus argentiventris* fueron de 86.8% y 85.1% respectivamente.

Al discriminar los valores más altos de polimorfismo y heterocigocidad por cebadores, se encontró que para la especie *Lutjanus guttatus* los cebadores CCA y CT tuvieron valores más altos de polimorfismo (90% y 93.5%) y de Heterocigocidad (0,31 y 0,35), y con los cebadores ACA y CCA, polimorfismo (100% y 81.8%) y heterocigocidad (0,29 y 0,24) para *Lutjanus argentiventris*, permitiendo deducir que estos cebadores fueron los que más aportaron a la diversidad y resultan apropiados para su utilización en futuras investigaciones sobre la evaluación de la diversidad genética y estructura poblacional de especies pertenecientes al género *Lutjanus.* encontrando similitudes en los datos reportados por Zhang *et al.* (2006) para la especie *L. argentimaculatus* cuyos valores altos de polimorfismo y Heterocigocidad proporcionan información valiosa para continuar realizando estudios en especies filogenéticamente cercanas.

En cuanto a los valores más bajos de Heterocigocidad (He) y Polimorfismo en las especies el cebador ACA para *L. guttatus (*0.23 y 78.5%) y el cebador AG para *L. argentiventris (*0,21 y 62.5%) fueron los cebadores con menos aporte a la diversidad

(Figura 12). De manera general hubo correlación entre He y polimorfismo en los cebadores evaluados.

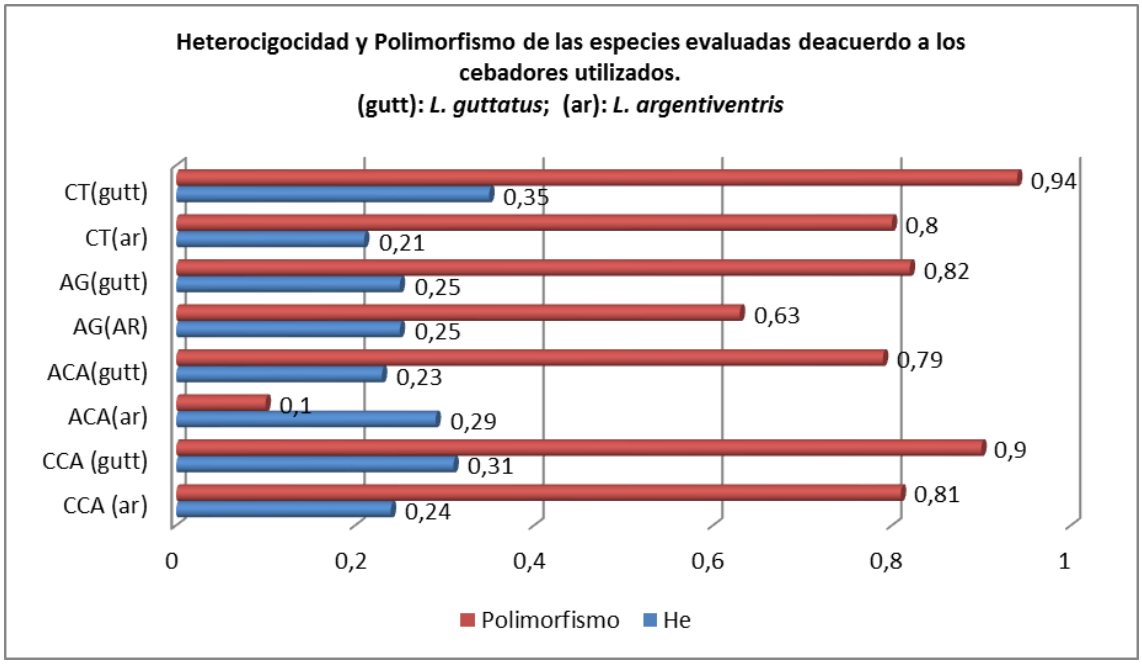


Figura 12. Heterocigocidad esperada y % loci polimórficos *Lutjanus guttatus* **(gutt)** y *Lutjanus argentiventris* **(ar).**

7.3. Heterocigocidad esperada (He) y porcentaje de loci polimórficos por zona de muestreo y cebadores utilizados.

Teniendo en cuenta la distribución geográfica de las dos especies se realizó el análisis de Heterocigocidad esperada y % Loci polimorficos de acuerdo a la zona geográfica y cebador utilizado (Tablas 14 y 15).

Tabla 14. Analisis de Heterocigocidad esperada (He) y % Loci polimorficos por zona geografica y cebador utilizado para *L. guttatus.*

Lutjanus guttatus						
	Heterocigocidad esperada			%Loci polimórficos		
Cebador	**TUMACO**	**MALAGA**	**SOLANO**	**TUMACO**	**MALAGA**	**SOLANO**
CCA	0,18	0,28	0,30	60,0	80,0	90,0
ACA	0,24	0,24	0,24	78,5	71,4	71,4
AG	0,33	0,26	0,13	81,8	81,8	27,0
CT	0,25	0,40	0,23	75,0	93,7	81,25
Promedio	**0,22**	**0,30**	**0,24**	**63,9**	**81,9**	**72,13**

Tabla 15. Análisis de Heterocigocidad y % Loci polimórficos por zona geográfica y cebador utilizado para *L. argentiventris.*

Lutjanus argentiventris						
	Heterocigocidad esperada			%Loci polimórficos		
Cebador	**TUMACO**	**MALAGA**	**SOLANO**	**TUMACO**	**MALAGA**	**SOLANO**
CCA	0,11	0,21	0,22	54,5	54,5	54,5
ACA	0,30	0,24	0,16	72,2	66,6	50,0
AG	0,15	0,24	0,16	37,5	62,5	50,0
CT	0,22	0,22	0,17	60,0	80,0	60,0
Promedio	**0,22**	**0,23**	**0,18**	**59,5**	**65,9**	**53,1**

De manera general, se encontró correlación entre Heterocigocidad y polimorfismo en los cebadores evaluados. Aunque no existen estudios de diversidad genética usando marcadores moleculares RAMs en especies del género Lutjanus para realizar comparaciones, diversos autores han usado otros métodos moleculares para evaluar la diversidad genética en peces y algunas de la Familia Lutjanidae.

Al comparar los valores de Heterocigocidad y % de Loci Polimórficos de este estudio con los resultados obtenidos por Ordoñez *et al*., (2012) evaluando la diversidad genética del Dorado *C. hippurus* se encuentra que existe similaridad en relación con la Heterocigocidad esperada que fue de 0.22 y el porcentaje de loci polimórficos de 62.6%, reportando que no hay un grado de diferenciación genética significativo, y lo explican dado la actividad migratoria de la especie influenciada por las condiciones ambientales. También en la especie *Lutjanus russelli* en el sur de China (Yu-Song *et*

al., 2007), mediante 37 marcadores microsatélites encontraron valores altos de He de 0.41 y Polimorfismo de 95%, con lo cual sugieren que pueden ser usados para estudios de estructura genética en esta especie.

En Colombia, en el rio Meta, Pineda *et al*. (2006), realizo un estudio de diversidad genética con microsatélites para la especie *Piaractus brachipomus* reportando un valor promedio de Heterocigocidad esperada de 46.8% y el polimorfismo entre 0.017 y 0.90. Los resultados muestran que la diversidad genética entre las especies de peces es muy alta, ya que tan solo con cuatro microsatélites se pudieron identificar alelos que no han sido descritos en la especie

En cuanto a los valores de He y % loci polimorficos para *L. guttatus* y *L. argentiventris* de acuerdo a la zona de muestreo, se observa que Bahía Málaga presenta los valores más altos (0.30 y 81,9%) y (0.23 y 65,9%) para la totalidad de los cebadores evaluados (Figura 13).

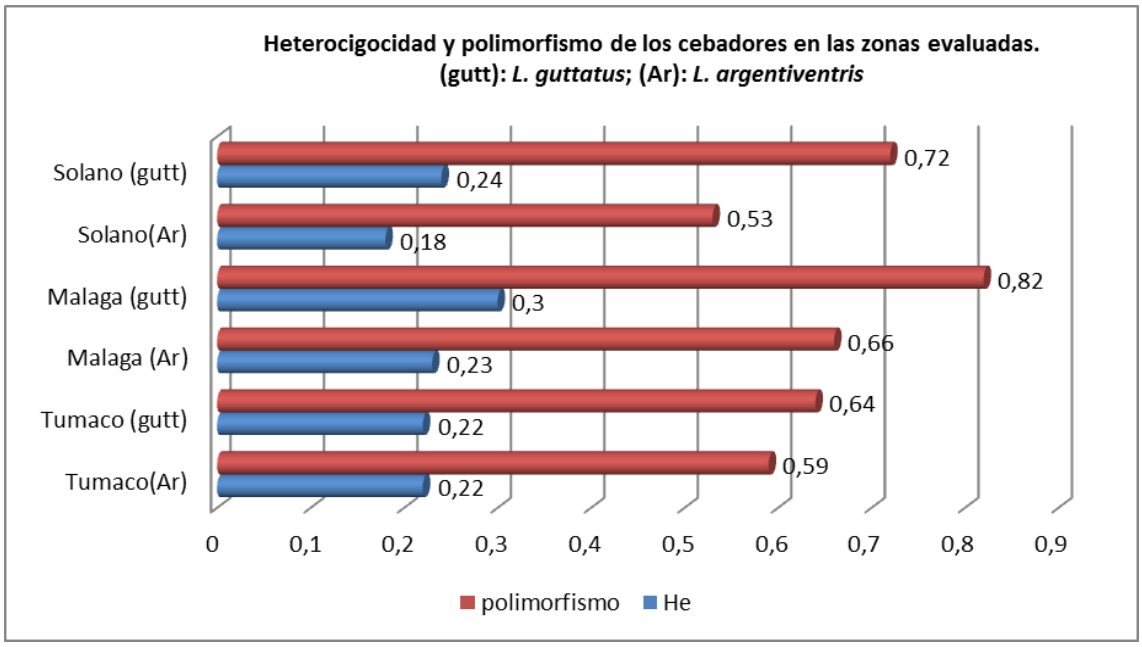


Figura 13. Heterocigocidad esperada *Lutjanus guttatus (gutt) y Lutjanus argentiventris (ar)* en las zonas de estudio.

Se considera entonces a Bahía Málaga como un punto neutral donde coinciden las dos especies, ya que es el sitio más cercano a los otros dos por posición geográfica convirtiéndose en un punto intermedio lo que lo hace una zona de alta diversidad genética ideal para el asentamiento de las poblaciones de Lutjanus.

La técnica molecular utilizada en este estudio mostró un alto grado de polimorfismo y sensibilidad para la discriminación de las especies y zonas evaluadas, lo que sugiere que los marcadores moleculares RAMs son útiles para la evaluación de la diversidad genética de especies y poblaciones naturales, además, la técnica ha sido reportada para la caracterización molecular de especies animales como por ejemplo el cerdo criollo (Oslinger *et al*., 2006), en ganado bovino Hartón del valle (Piedrahita *et al*., 2003), en cabras (Vinasco *et al*., 2008) el pato criollo (Hernández *et al*., 2007) y peces (Ordoñez *et al.,* 2012). Sus ventajas incluyen bajo costo, reproducibilidad, no requiere información previa, alto polimorfismo y fácil implementación (Muñoz *et al.* 2008).

7.4. Coeficiente de diferenciación genética (F_{ST})

A partir de las muestras de cada zona se realizó la estimación del índice de fijación (F_{ST}) para verificar la existencia de diferenciación genética entre las muestras de peces de acuerdo a cada una de las especies. El valor de encontrado de F_{ST} en este estudio fue de 0.23 para *Lutjanus guttatus* y de 0.34 para *Lutjanus argentiventris* lo que indica que existe una alta y gran diferenciación genética entre las zonas para cada especie (Tabla 16).

Este valor revelo la alta diferenciación genética existente entre las zonas de muestreo para cada una de las especies posiblemente debido a las condiciones oceanográficas y a las distancias geográficas entre las zonas.

Tabla 16. Clasificación de la diferenciación genética de acuerdo al F_{ST} propuesta por Wright (1978).

Valores de F_{ST}	Grado de diferenciación	Valor F_{ST} de este Estudio
0 - 0.05	**Poca diferenciación genética**	
0.06 - 0.15	**Moderada diferenciación genética**	
0.16 – 0.25	**Alta diferenciación genética**	***L. guttatus 0.23***
Mayor de 0.25	**Gran diferenciación genética**	***L. argentiventris 0.34***

Otros estudios como Ordoñez *et al*, (2012) en *C. hippurus* encontró valores de F_{ST} de 0.084 lo que indica una moderada diferenciación genética. Rocha Olivares y Sandoval Castillo, (2003); para *L. peru* reportaron valores de F_{ST} de 0,0062 valor que corresponde a poca diferenciación genética.

Por su parte Landinez-García *et al.,* (2009) encontraron dos stocks genéticos distintos con leve estructura poblacional que separó la población de Capurganá, de las poblaciones de Islas del Rosario y Santa Marta; al evaluar a *L. synagris* mediante la adaptación de marcadores moleculares tipo microsatélite.

Melón–Barroso *et al.,* (2005) en *Brycon opalinus* reporto un F_{ST} de 0,0432; considerando para su estudio valores significativos de diferenciación genética.

7.5. Análisis descriptivo

Mediante la elaboración de un dendograma se realizó un análisis descriptivo intra e interespecie con el coeficiente de Dice Nei-Li (1972), mediante el método de clasificación UPGMA. En la figura 15 se observa que a un nivel de similitud de 0,37 se observan las diferencias por especies de *Lutjanus guttatus y Lutjanus argentiventris* y en las figuras 16 y 17 se observan las diferencias intraespecies lo que ratifica la técnica RAM como apropiada para realizar estudios de diferenciación genética.

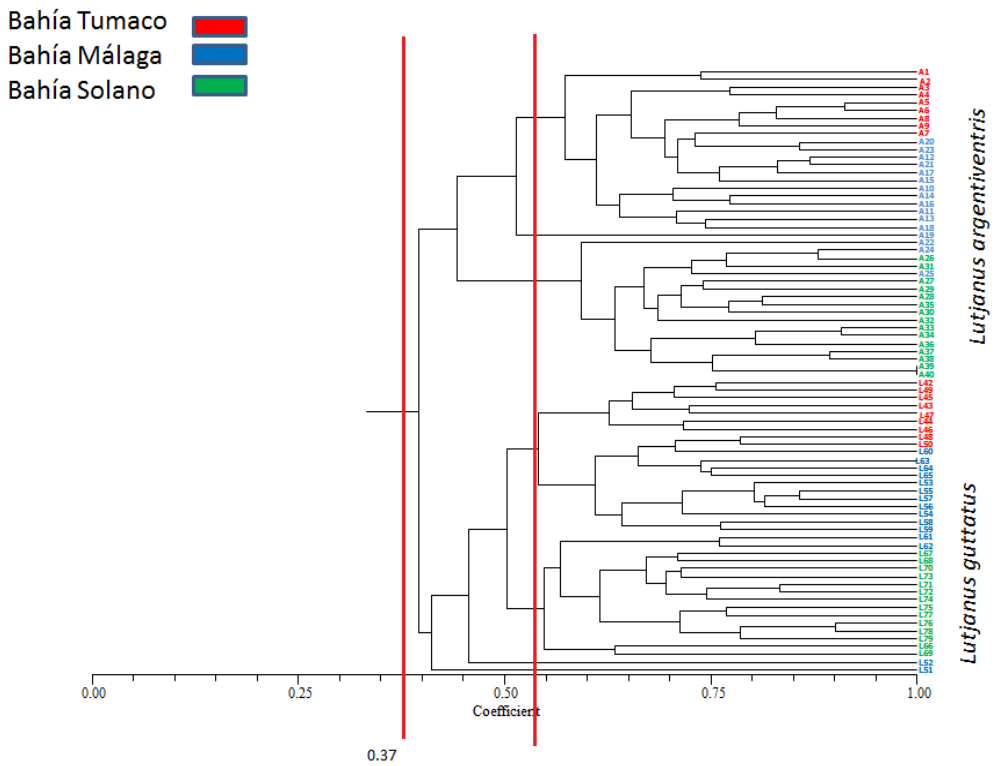


Figura 15. Dendrograma obtenido con el coeficiente de similitud de Dice.

En los dendogramas se observan diferencias y agrupamiento por zonas geográficas para ambas especies, esto debido a las distancias geográficas que separan una zona de otra. En *Lutjanus guttatus* dos individuos de Bahía Málaga comparten similitudes (alelos) con individuos de Bahía Solano (Figura 16), en cuanto a *Lutjanus argentiventris* las similitudes están entre los individuos de Bahía Tumaco y Bahía Málaga (Figura 17).

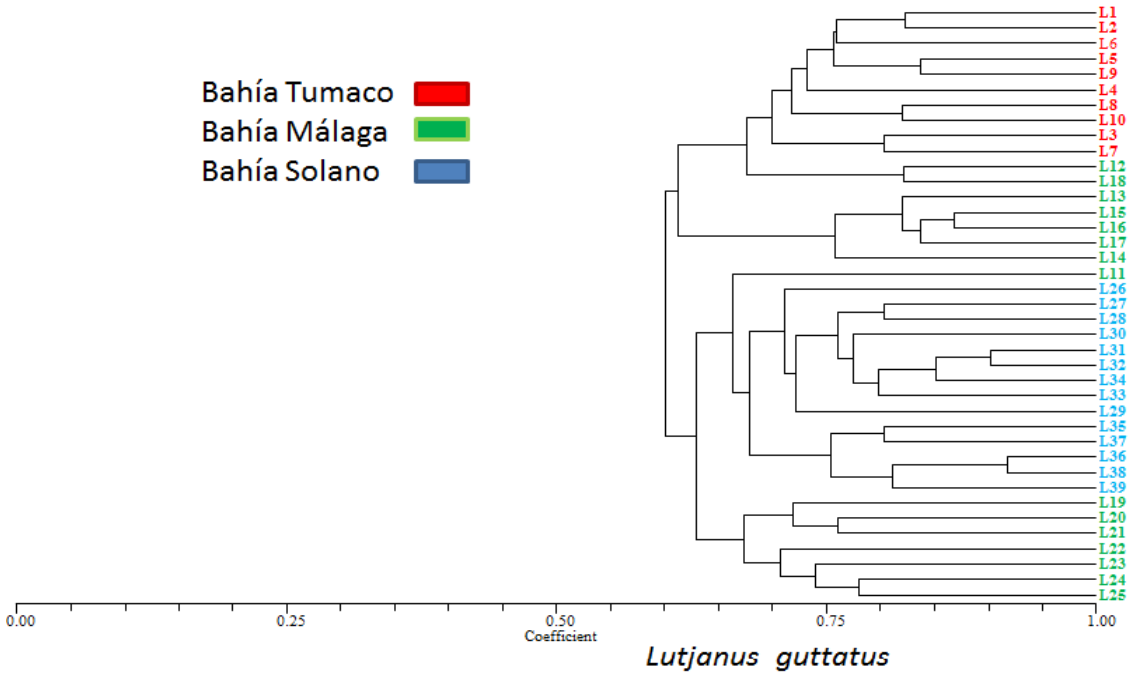


Figura 14. Dendrograma de *Lutjanus guttatus* obtenido con el coeficiente de similitud de Dice.

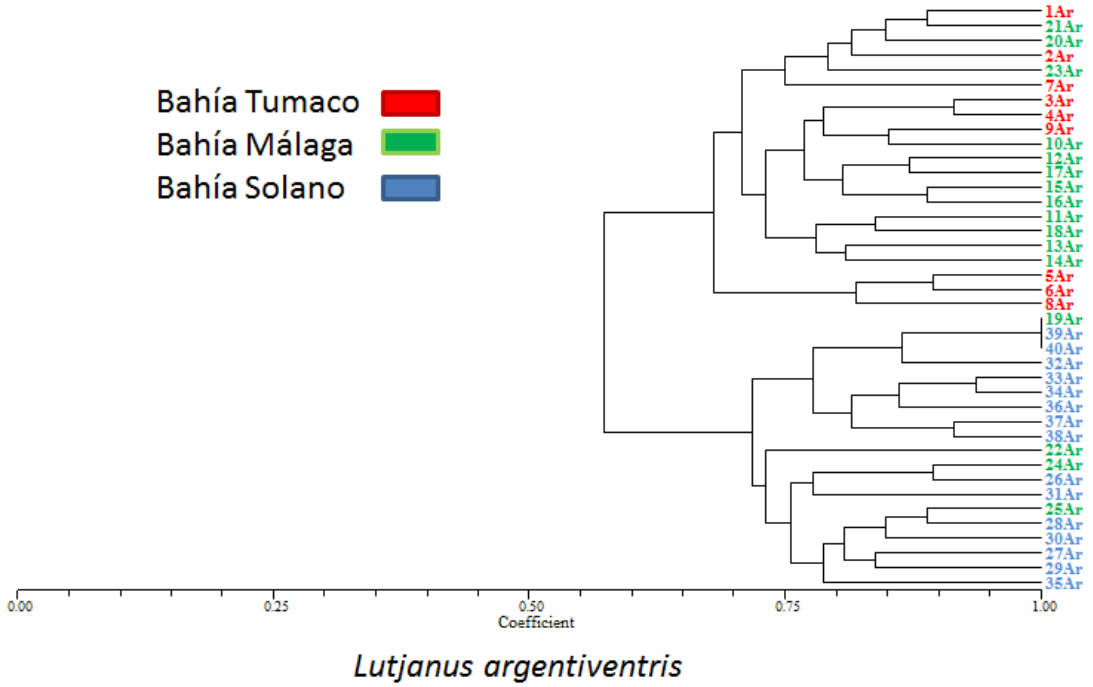


Figura 15. Dendrograma de *Lutjanus argentiventris* obtenido con el coeficiente de similitud de Dice.

En varios estudios de diversidad genética especialmente aquellos que trabajan con diversidad mitocondrial se elaboran arboles filogeográficos a fin de corroborar la información obtenida utilizando el neighbor-joining basados en Tamura-Nei. Por

ejemplo; Garber *et al.* (2004), no encontró evidencia de estructura filogenética en las muestras analizadas de *L. campechanus* por área geográfica, es decir que los individuos de tres localidades muestreadas en el Golfo de México, conforman una sola población.

Al realizar el árbol construido con las distancias haplotipicas de *L. peru* no mostro un patrón filogeográfico al encontrar que los los haplotipos de las tres localidades del Golfo de México fueron dispersos polifiléticamente en todos los linajes (Rocha-Olivares y Sandoval-Castillo, 2003)

7.6. Distancia genética

Para las dos especies evaluadas se encuentra distancia genética entre las zonas (Tabla 17), atribuible a la ubicación geográfica de éstas, por ejemplo para *Lutjanus guttatus* existió menor distancia entre Bahía Málaga y Bahía Solano, y mayor distancia con Bahía Tumaco (Figura 18). Para *Lutjanus argentiventris* la menor distancia genética se dio entre Bahía Tumaco y Bahía Málaga, en relación a Bahía Solano (Figura 19), lo cual es coincide con la distancia geográfica entre las zonas que se encuentran más alejadas.

Hurtado-Alarcón, (2009), reportó que las distancias genéticas discriminaron ejemplares de *Brycon henni* provenientes de las cuencas de los ríos Nare y Gautapé, en Antioquia.

Tabla 17. Similitud genética de *L. guttatus* y *L. argentiventris* en las zonas de muestreo.

	Población Solano	**Bahía Tumaco**	**Bahía Málaga**	**Bahía**
	B. Tumaco	*****		
	B. Málaga	0,8938	*****	
L. guttatus	B. Solano	0,8508	0,9130	*****
	B. Tumaco	*****		
L. argentiventris	B. Málaga	0,9443	*****	
	B. Solano	0,8415	0,9005	*****

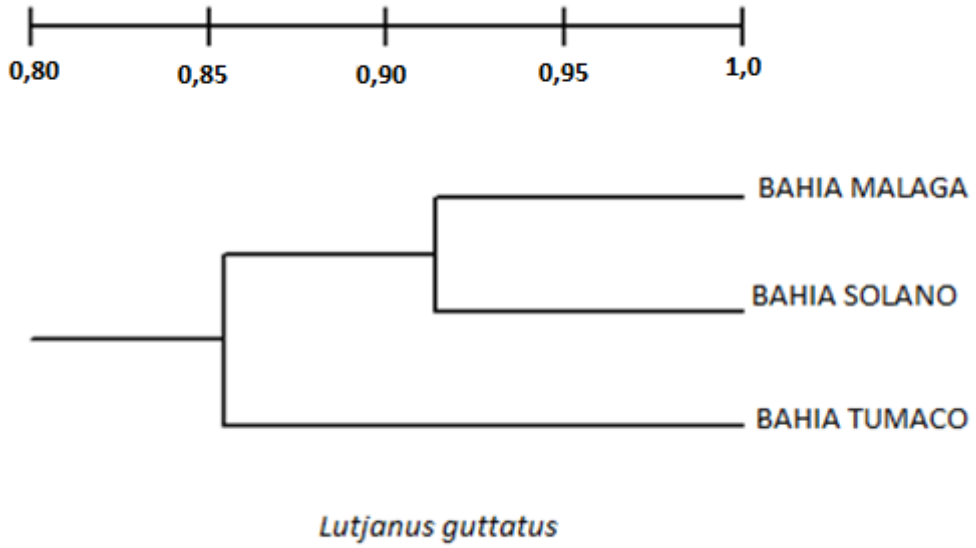


Figura 16. Dendograma similitud genética de *L. guttatus* en las zonas de muestreo.

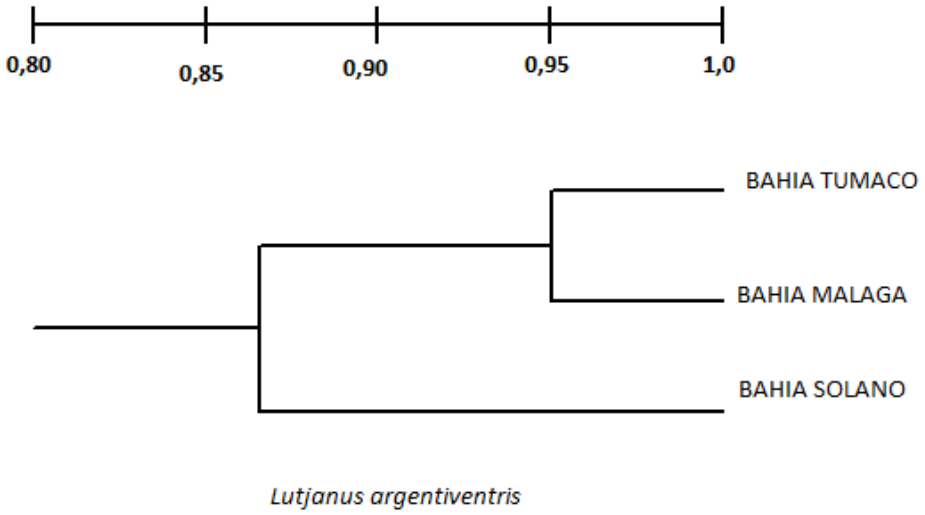


Figura 17. Dendrograma similitud genética de *L. argentiventris* en las zonas de muestreo.

El dendrograma construido mediante el método UPGMA con un *bootstrapp* de 1000 repeticiones, mostró un alto porcentaje de loci que soporta la formación de los nodos (Tabla 18), lo que indica una alta confiabilidad en el análisis de diversidad genética de

las especies en las tres zonas del Pacifico Colombiano y la efectividad de la técnica molecular RAMs para el estudio realizado.

Tabla 18. Información de los loci que soportan la construcción del dendrograma de distancias de las zonas de los sitios de muestreo de las especies *L. guttatus y L.argentiventris*

Especie	Nodo	Proporción de réplicas similares (1000 repeticiones	No. De loci que soportan el Nodo	% total de loci que soportan el Nodo
L. guttatus (7 loci producen árboles que contienen vínculos)	1	28	45,90%	45,90%
	2	61	100,00%	100,00%
L. Argentiventris (6 loci producen árboles que contienen vínculos)	1	23	48,94%	48,94%
	2	47	100,00%	100,00%

7.7. Análisis de varianza molecular

Este método se usó para verificar si existe diferenciación de las poblaciones de acuerdo a los sitios geográficos donde fueron colectadas. El análisis de varianza molecular mediante el programa Arlequin 3.5 mostró una variación dentro de los individuos de cada zona para *L. guttatus* del 77,3%, y para *L. argentiventris* del 67% (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis de Varianza Molecular mediante Arlequin 3.5.

Especie	Fuente de variación	GL	Variación (%)	F_{ST}
Lutjanus guttatus	Entre Poblaciones	2	22,63	$0,23^{++}$
	Dentro de Poblaciones	39	77,37	
Total		**39**		
Lutjanus argentiventris	Entre Poblaciones	2	32,9	$0,33^{++}$
	Dentro de poblaciones	38	67,06	
Total		40		

$^{++}$ (P α>0,01)

Esta alta variación podría indicar la existencia de subpoblaciones dentro de cada zona conformadas por individuos procedentes de diferentes lugares. Aun así, existe diferencia genética para ambas especies entre las zonas evaluadas (22.6% para *L. guttatus* y 32.9% para *L. argentiventris*).

Heist y Gold, (2000), explican que el 99% de la variación de cada microsatélites fue distribuida entre las localidades investigadas de *L. campechanus* en el Golfo de México, encontrando una sola población (stocks) en el norte del Golfo, similares datos a los obtenidos por Garber *et al.* (2004), quienes analizaron poblaciones *L. campechanus* encontrando un varianza molecular de 100,3%, considerando cada muestra como un sitio separado.

Al realizar el AMOVA comparado entre las zonas de estudio se obtiene:

Lutjanus guttatus				
Zonas	**Distancia Geográfica (Km)**	**Fuente de variación**	**Variación (%)**	**F_{ST}**
Tumaco y Málaga	273.01	Entre Poblaciones Dentro de Poblaciones	21,64 78,35	$0,22^{++}$
Tumaco y Solano	499.19	Entre Poblaciones Dentro de Poblaciones	32,16 67,84	$0,32^{++}$
Málaga y Solano	250.55	Entre Poblaciones Dentro de Poblaciones	20,75 79,25	$0,21^{++}$
Lutjanus argentiventris				
Tumaco y Málaga	273.01	Entre Poblaciones Dentro de Poblaciones	10,37 89,63	$0,10^{++}$
Tumaco y Solano	499.19	Entre Poblaciones Dentro de Poblaciones	48,98 51,01	$0,48^{++}$
Málaga y Solano	250.55	Entre Poblaciones Dentro de Poblaciones	*44,23* *55,77*	$0,44^{++}$

$^{++}$ (P α>0,01)

Por su parte, Rocha-Olivares y Sandoval-Castillo encontraron para *L. peru*, un AMOVA que demostró que la variabilidad genética atribuible a las diferencias entre las poblaciones de Sinaloa y Baja California Sur vs Jalisco y dentro de éstas no es significativa. Argumentando falta de diferenciación genética entre las poblaciones lo que concuerda con las similitudes fenotípicas como características biológicas y reproductivas reportadas para las zonas de estudio por diversos autores.

Similares los resultados a los de Melon-Barroso *et al., (*2005) que al estimar la variación genética entre y dentro de poblaciones revelo que aproximadamente el 95% del total de la diversidad de *B. opalinus* está explicada por la variación dentro de poblaciones en Brasil.

Para Landinez *et al.* (2009), el AMOVA realizado para *L. synagris* en Colombia, mostró una leve estructuración poblacional estadísticamente significativa que separó la población de Capurganá de las regiones de Islas del Rosario y Santa Marta lo que indica la presencia de barreras entre estas poblaciones y la existencia de dos stocks pesqueros que deben ser manejados de acuerdo a su estructura poblacional.

8. CONCLUSIONES

- Cuatro cebadores RAMs polimórficos (CCA, ACA, CT y AG) fueron los que más aportaron para la diferenciación genética de las especies de pargo *Lutjanus guttatus y Lutjanus argentiventris* en las tres zonas del pacifico colombiano, lo que sugiere que son apropiados para realizar estudios de estructura poblacional y diversidad genética en poblaciones naturales de especies pertenecientes al género *Lutjanus*.

- Los valores de Heterocigocidad y polimorfismo se correlacionaron para ambas especies, indicando que existe diversidad genética en cada zona evaluada, y considerando a Bahía Málaga como un sitio donde coinciden las especies dado su cercanía geográfica con las otras zonas evaluadas siendo un punto intermedio.

- También presenta características de geomorfología ya que existe gran variedad de biotopos localizados en forma dispersa en toda su extensión. Los bordes costeros están influenciados por frentes de agua dulce provenientes de quebradas y algunos ríos que desembocan en la bahía a través formaciones conocidas como esteros, en las cuales hay asentamiento de asociaciones de manglares los cuales reposan sobre fondos fango-arenosos y hasta rocosos. Existe además islotes con sustratos rocosos lo cual es ideal para el asentamiento de las especies de pargo evaluadas.

- El coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}), determino que existe una alta diferenciación genética entre las tres zonas para cada una de las especies estudiadas, esta diferenciación genética puede ser atribuida a la capacidad adaptativa que tienen los individuos ya que estas zonas presentan condiciones ecológicas diferentes que las hacen apropiadas para la migración ontogénica a través de la plataforma.

- En el análisis del dendrograma realizado con el coeficiente de Dice Nei-Li se evidenció la formación de grupos por especies *Lutjanus guttatus y Lutjanus*

argentiventris y la clasificación entre las zonas geográficas, mostrando que existe una relación estrecha entre los agrupamientos formados y las zonas de procedencia, ya que los individuos provenientes de cada zona geográfica se encontraron distribuidos de manera cercana.

- El análisis de varianza molecular para estas especies estudiadas indicó que la variación existente dentro de cada zona puede ser atribuible a la gran cantidad de biotipos que se encuentran dentro de estas zonas lo que puede crear subpoblaciones. A su vez los valores de varianza molecular indicaron que existe variabilidad genética entre las poblaciones evaluadas.

- Este estudio de variabilidad genética es útil para futuros programas de repoblamiento, desarrollo de sistemas productivos marinos y manejo de stocks pesqueros de acuerdo a su estructura poblacional. Ya que al existir variabilidad genética entre individuos de una misma especie en diferentes zonas indicaría que todos los programas que se formulen tendrían como punto de partida proteger la heterogeneidad de la especie en cada zona a fin de ser orientados correctamente y con mayor objetividad.

- Se hacen necesarios estudios sobre el ciclo de vida de las especies *L. guttatus* y *L. argentiventris* en Colombia, además de profundizar en términos de variabilidad genética utilizando enzimas o marcadores moleculares como microsatélites que pueden permitir un análisis genético de mayor envergadura.

11. BIBLIOGRAFIA

- AGRESTI, J.J., SEKI, S., CNAANI, A., POOMPUANG, S., HALLERMAN, E.M., UMIEL, N., HULATA, G., GALL, G. y MAY, B. (2000) Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. En: *Aquaculture. 185*. p.43-56.
- ALLEN, G. (1995). Lutjanidae. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Vol. III. Pacífico Centro-oriental. FAO, CE, FIS, NORAD. Roma. En: Fischer W., F. Krupp, W. Schneider, V.H. Niem (Red. Téc.). p. 1231-1244.
- ALLEN, G.R., y ROBERTSON, D.R. (1994). Fishes of the tropical Eastern Pacific. Univ. Hawaii Press. p.332.
- ALMEIDA, F.S., SODRÉ, L.M.K., y CONTEL, E.P.B. (2003). Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). En: Genetics and Molecular Biology Vol. 26; p. 301-305.
- ANDERSON, W.D. (1987). Systematics of the fishes of the family Lutjanidae Perciformes: Percoidei, the Snapper. En: J.J. Polovina and S. Ralston. Tropical Snappers and Grupers; Biology and Fischeries Management. Westview Press. p.1-31.
- ANDRADE, R. (1998). Contribución al estudio de la biología y pesquería del pargo de la mancha *Lutjanus guttatus* capturado por la pesca artesanal en el pacífico de Guatemala. Tesis de Licenciatura. Universidad San Carlos de Guatemala, San Carlos. 27 p.
- ARELLANO-MARTÍNEZ, M., ROJAS-HERRERA, A., GARCÍA-DOMÍNGUEZ, F., CEBALLOS-VÁZQUEZ, P. Y VILLALEJO-FUERTE, M. (2001). Ciclo reproductivo del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) en las costas de Guerrero, México. En: Revista de Biología Marina y Oceanografía. Vol, 36., No.1. p. 1 – 8.
- ARREGUIN-SANCHEZ, F. y MANICKCHAND-HEILEMAN, S. (1998). The trophic role of lutjanid fish and impacts of their fisheries in two ecosystems in the Gulf of Mexico. En: Journal of Fish Biology. Vol. 53. p.143–153.
- BAGLEY, M.J.; ANDERSON, S.L. y MAY, B. (2001) Choice of methodology for assessing genetic impacts of environmental stressors: polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints. En: Ecotoxicology. Vol.10. p. 239-244.

- BALDETTI HERRERA C.A. (1999). Caracterización Biológica y pesquera de las especies de pargo (Pisces Lutjnidae); capturadas por la pesca artesanal y la industrial en el Litoral pacífico de Guatemala.
- BALLOUX, F., LUGON-MOULIN, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. En: Molecular Ecology. No. 11.p. 155-165.
- BARROSO, R.M., HILSDORF, A.W.S,. MOREIRA, H.L.M., CABELLO, P.H., y TRAUB-CSEKO, Y. (2005). Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. En: Aquaculture. 247; p51-65.
- BETANCOURT PORTELA, J.M., SÁNCHEZ DÍAZGRANADOS, J.G., MEJÍA-LADINO, L.M. y CANTERA KINTZ, J. R. (2011). Calidad de las aguas superficiales de Bahía Málaga, Pacífico Colombiano. En: Acta Biol. Colomb. Vol.16, No.2.
- BONILLA B., M. L. y ESPINOSA P., K. (2003).Colección, Caracterización Fenotípica y Molecular de poblaciones de uchuva *Physalis peruviana* L. Trabajo de Grado. Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira.
- BOROWSKY, R.L. (2001). Estimating nucleotide diversity from Random Amplified Polymorphic DNA and Amplified Fragment Length Polymorphism data. En: Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 18, p.143-148.
- CAICEDO, J.A. RUBIO, E., ZAPATA, L., y GIRALDO, A. (2006). Estimación del crecimiento de *Lutjanus peru* (Pisces: Lutjanidae) basado en capturas artesanales experimentales realizadas en el Parque Nacional Natural Gorgona y su área de influencia, océano Pacífico colombiano. En: Invest. Mar., Valparaíso. Vol. 34, No.2. p.163.
- CANTERA J. (1991). Etude structurale des mangroves et des peuplements littoraux des deux baies di pacifique colombien (Málaga el Buenaventura). Rapport avec les conditions du milieu et les perturbations antropiques. Université d Aix-Marseille.
- CAUJAPE, J. (2006). Brújula para genéticos desorientados en Genética de poblaciones. Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN. España.
- CASTILLO-VARGASMACHUCA, S., PONCE-PALAFOX, J.T., CHÁVEZ ORTÍZ, E. y ARREDONDO-FIGUERO, J.J. (2007). Effect of the initial stocking body weight on growth of spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) in marine floating cages. En: Revista de Biología Marina y Oceanografía. Vol. 42, No.3., p. 261 – 267.

- CARVALHO, G.R. Y HAUSER, L. (1995). Molecular genetics and the stocks concept in fisheries. Chapman y Hall, nueva York, EEUU. p. 55-79.
- CERVIGÓN, F., R. CIPRIANI, W. FISCHER, L. GARIBALDI, M. HENDRICKX, A. LEMUS, R. MÁRQUEZ, J. POUTIERS, G. y ROBAINA, B. (1992). Fichas FAO de identificación de especies para los fines de la pesca. Guía de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de Sur América. Roma. p. 513.
- CHIAPPA-CARRARA X, ROJAS-HERRERA, A., y MASCARÓ. M**.** (2004). Coexistencia de *Lutjanus peru* y *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en la Costa de Guerrero, México: relación con la variación temporal en el reclutamiento. En: Revista de Biología Tropical. Vol. 52. No. 1. p. 177-185.
- CLARO, R. (1994). Ecología de los peces marinos de Cuba. Instituto de Oceanología, Academia de Ciencias de Cuba y Centro de Investigaciones de Quintana Roo. México.
- CLARO, R. y LINDEMAN, K.C. 2004. Biología y manejo de los pargos (Lutjanidae) en el Atlántico occidental. En: Instituto de Oceanología, CITMA, La Habana, Cuba. p. 472.
- CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL (CCI) (2011). Sistema de Información de Precios y Mercados para la producción pesquera y Acuícola. Boletín semanal. 19-25 Mayo. Vol. 7. No.21. 28 p.
- CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL (CCI) (2011). Sistema de Información de Precios y Mercados para la producción pesquera y Acuícola. Artículo: Captura y comercialización del pargo lunarejo (L*utjanus guttatus)*, en el Municipio de Buenaventura. Boletín semanal. 19-25 Mayo. Vol. 7. No.21. 28 p.
- CRIALES, HERNÁNDEZ M., ARTEAGA, E., y MANJARRÉS, L. (2003). Distribución espacio-temporal y tallas de las larvas de tres especies de lutjánidos en el área norte del Caribe Colombiano. En: Rev. Acad. Colomb. Cienc. Vol. 27, No.102; p. 85-91.
- CRUZ-ROMERO, M., ESPINO-BAR, J., MIMBELA-LÓPEZ, A., GARCÍA-BOA, L., y GIRÓN-BOTELLO, E. (1991). Biología reproductiva de tres especies de Lutjánidos en Colima. En: Rep. Téc. C.R.I.P. Manzanillo, Colima. I.N.P., México. 118 p.
- CRUZ-ROMERO, M., CHÁVEZ, E.A., ESPINO, J., y GARCÍA, A. (1996). Assessment of a snapper complex (*Lutjanus* spp.) of the eastern tropical Pacific. En: F. Arreguin-Sanchez, J.L. Munro, M.C. Balgos & D. Pauly (eds.). Biology,

fisheries and culture of tropical groupers and snappers. ICLARM Conf. Proc. No. 48, Manila,Filipinas.

- CRUZ-ROMERO M, ESPINO-BARR, E., DEL MONTE-LUNA, P., GARCIA-BOA, A., AYALA-CORTÉS, A., GONZÁLEZ-RUÍZ, J.J. y SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, S. (2000). Huachinango del Pacífico. Sustentabilidad y pesca responsable en México. Evaluación y manejo. p. 297-326.
- CHUENG LO, L.; YUAN, Z.; y HUA, Y. (2006). Multiplex genotyping of novel tetranucleotide microsatellites from a marine foodfish species crimson red snapper (*Lutjanus erythropterus*). En: Molecular Ecology Notes. Vol., 6. p. 524–526.
- DOHERTY, J. (1991). Gene flow and larvar duration in seves especies of fish from the great barrier. En: Ecology. Vol 76. No, 8. p. 2372-2391.
- ESPINOSA, L.F. (2010). Informe Nacional sobre el Estado del Ambiente Marino en los Países del Pacífico Sudeste. Caso Colombia. INVEMAR, CPPS. Santa Marta. 147 p.
- EXCOFFIER, L. (1992). Software AMOVA (Analysis of Molecular Variance). Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland.
- EXCOFFIER, L. (2011). An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Arlequin 3.5. Institute of Ecology and Evolution. University of Berne. Suiza.174p. URL: http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3
- EZAZ, M.T., HARVEY, S.C; BOONPHAKDEE, C.; TEALE, A.J.; MCANDREW, B.J.; PENMAN, D.J. (2004). Isolation and physical mapping of sex-linked AFLP markers in nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). En: Mar. Biotechnol*. 6*: 435-445.
- FAO (2012). El estado mundial de La pesca y La Acuicultura en El Mundo. Roma.
- FERNANDEZ-CALIENES, A., HERNANDEZ, N., y FRAGA, J. (2003). Amplificación al azar del ADN de 5 poblaciones cubanas de peces larvívoros del género *Rivulus*. En: REV CUBANA MED TROP. Vol. 55. No. 3. p.203-207.
- FISHER, W., KRUPP, F., SOMMER, C., CARPERNTER, K., y NIEM, K. (1995). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacifico centro-oriental. Roma. Vol III; p.1201 – 1813.
- FORCE, A., LYNCH, M., PICKETT, F.B, AMORES, A., YAN, U.L., y POSTLETHWAIT, J. (1999) Preservation in duplicate genes by complementary, degenerative mutations. En: *Genetics. Vol.151*. p.1531-1545.
- GAMBOA, J. H., y VALVERDE, J. (2005). Aspectos básicos para reproducción Inducida del pargo lunarejo Lutjanus (steindachner, 1869). Reproducción de los

peces en el trópico. INCODER y Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. 224-241p.

- GARBER, A. F., TRINGAL, M., y STUCK, K.C. (2004). Population Structure and Variation in Red Snapper (*Lutjanus campechanus*) from the Gulf of Mexico and Atlantic Coast of Florida as Determined from Mitochondrial DNA Control Region Sequence. En: Mar. Biotechnol. Vol 6, p. 175–185.
- GONZÁLEZ-OCHOA, O., LÓPEZ-MARTÍNEZ, J., y HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N.*Y.* (2009). Population Characteristics of Spotted Rose Snapper *Lutjanus guttatus* Caught as Shrimp Bycatch in the Gulf of California. En: Interciencia, Vol. 34, No. 11. p. 808-813.
- GRIMES, C. (1987). Reproductive biology of the Lutjanidae: a review. En: Biology and Fisheries Management. p.659.
- HANTULA, J., DUSABENYAGASANI, M., HAMELIN R.C.(1996). Random Amplified microsatellites (RAMs) a novel method for characterizing genetic variation within fungi. En: Eur Path. No.26.p.159-166.
- HEIST, E. y GOLD, J. (2000). DNA Microsatellite Loci and Genetic Structure of Red Snapper in the Gulf of Mexico. En: Transactions of the American Fisheries Society. Vol, 129. p. 469-475.
- HERNÁNDEZ, D., MUÑOZ, D., VALENCIA, N., POSSO, A. Y MUÑOZ, J.E. (2007). Caracterización molecular del pato criollo colombiano en cuatro departamentos. En: Acta Agron. Vol.56. No., 3.
- HERRERA-ULLOA, A., CHACÓN-GUZMÁN, J., ZÚÑIGA-CALERO, G., FAJARDO, O. y JIMÉNEZ-MONTEALEGRE, R. (2009). Acuicultura de Pargo La Mancha *Lutjanus Guttatus* (Steindachner, 1869). En: Rev. Mar. y Cost. Vol. 1. p. 197-213.
- HURTADO ALARCÓN, J.C. (2009). Variabilidad genética y estructura poblacional en *Brycon henni* E. (Characiformes: Characidae) en la cuenca media de los ríos Nare y Guatapé, Antioquia. Universidad Nacional de Colombia, sede medellin. Tesis maestría.
- INSTITUTO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA (INPA). (2001). Reporte Anual Estadístico. Bogotá. Colombia.
- INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DEL PACIFICO (IIAP). (2005). Documento diagnóstico. Esquema de ordenamiento territorial. Año 2004-2016. Municipio de Bahía Solano. Departamento del Choco.
- KOCHER, T.D. (1997). Tilapia Status Report. Proceedings of the Aquaculture Species Genome Mapping Workshop, May 18-19, Dartmouth, Massachusetts.

- LAMPREA, N., LÓPEZ, L., SANTACRUZ, D., GUERRERO, J., y BURBANO, C. (2004). Modificaciones técnicas en el uso de microsatélites y AFLP para el estudio poblacional de diversas especies de peces en el río Sinú, Colombia. En: Rev. Col. Biotecn. Jul. Vol. VI. No. 001. p. 72-78.
- LANDÍNEZ-GARCÍA, R.M., OSPINA-GUERRERO, S.P., RODRÍGUEZ-CASTRO, D.J., ARANGO, R., y MÁRQUEZ, E. (2009). Genetic analysis of *Lutjanus synagris* populations in the Colombian Caribbean. En: Ciencias Marinas. Vol. 35, No.4; p. 321–331.
- LINDEMAN, K.C. (2004). Biología y manejo de los pargos (Lutjanidae) en el Atlántico occidental. En: Instituto de Oceanología, CITMA. (472), La Habana, Cuba.
- LIU, Z.J. y CORDES, J.F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. En: Aquaculture. 238. p. 1-37.
- LOONG CHUENG LO, L., YUAN ZHU, Z. y HUA YUE, G. (2006). Multiplex genotyping of novel tetranucleotide microsatellites from a marine foodfish species crimson red snapper (*Lutjanus erythropterus*).En: Molecular Ecology Notes. Vol, 6, p. 524–526.
- LOPERA-BARRERO, N.M., RIBEIRO, R.P., y POVH, J.A. (2007). O repovoamento de peixes: uma estratégia multidisciplinar. En: Pesca & Aqüicult. Vol.30, No.1; p. 71-74.
- LOPERA-BARRERO, N.M. (2008). Variabilidad genética de los lotes de *Brycon orbignyanus* utilizados en programas de repoblamiento: manejo y conservación. En: Acta biol. Colomb. Vol. 13, No. 1.
- LOPERA-BARRERO, N. M., POVH, J.A., RIBEIRO, R.P., GOMES, P.C., JACOMETO, C. B., y DA SILVA LOPES, T. (2008). Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. En: Cien. Inv. Agr. Vol. 35, No,1; p. 77-86.
- LOPERA-BARRERO, N.M., PEREIRA RIBEIRO, R., POVH, J., GOMES, P., VARGAS, L., y NOGUEIRA DE OLIVEIRA, S. (2008). Caracterización genética de lotes de peces usados en programas de repoblamiento y su importancia en la conservación genética en la piscicultura. En: Zootecnia Tropical. Vol. 26, No.4; p. 515-522.
- MARTÍNEZ –LAGOS, R. (2003). Maduración y desove del pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* en condiciones controladas de temperatura y foto período. Tesis de maestría. México. 118p.

- MELON BARROSO, R.; HILSDORF, A.; MOREIRA, H.; CABELLO, P. Y TRAUB-CSEKO, Y. (2005). Genetic diversity of wild and cultured populations of Brycon opalinus (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. En: Aquaculture 247. 51– 65p.
- MALDONADO-GARCÍA, M; RODRÍGUEZ-ROMERO, J; REYES-BECERRIL, M; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C.A.;CIVERA-CERECEDO, R; SPANOPOULOS, M. (2012). Effect of varying dietary protein levels on growth, feeding efficiency, and proximate composition of yellow snapper Lutjanus argentiventris (Peters, 1869). En: Latin American Journal of Aquatic Research, vol. 40, núm. 4, p. 1017-1025. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Valparaiso, Chile.
- MILLER, M. P. (1997). Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme andmolecular population genetic data.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL (MADR). (2011). Diagnóstico del Estado de la Acuicultura en Colombia. Plan Nacional de Desarrollo de la Acuicultura Sostenible en Colombia FAO - INCODER. Diciembre. 131p.
- MOEN, T., AGRESTI, J.J., CNAANI, A., MOSES, H., FAMULA, T.R, HULATA, G., GALL, G.A., y MAY, B. (2004). A genome scan of a four-way tilapia cross supports the existence of a quantitative trait locus for cold tolerance on linkage group 23. En: *Aquacult. Res. Vol.35*. p. 893-904.
- MONTAÑO-PÉREZ, K., VILLALPANDO-CANCHOLA, E., VARGAS- ALBORES, F. (2004) Ventajas del uso de marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético en camarón. En: *Panorama Acuícola*: 18-22.
- MONTAÑO-PÉREZ, K., VILLALPANDO-CANCHOLA, E. y VARGAS-ALBORES, F. (2006). AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) y su aplicación en acuicultura. En: Interciencia**.** Vol. 31. No. 8.
- MOREIRA, H.L.M., ZIMMERMANN, S., RIBEIRO, R.P., BASTOS, R.G., VARGAS, L.D., Y POVH, J.A. (2003). The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia. En: World Aquaculture, Salvador, Brasil (Abstract). p.460.
- MORILLO, A.; MORILLO, Y.; VASQUEZ, H., y MUÑOZ, J. (2005). Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAM de la colección de mora Rubus spp, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. En: Acta Agron. Vol. 54. No.,2. p. 15-24.

- MUHLIA, M. A., GUERRERO, D., RODRIGUEZ, J., ARVIZU, J., GUTIERREZ, F. (1996). Growth and survival of the pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* related to density in experimental conditions in tidal ponds in la Paz, Baja California Sur, Mexico. En: Annual The World Aquaculture society, Bangkok, Thailand. p.265.
- MUÑOZ, J. E., MORILLO, A. C., y MORILLO, Y. (2008). Uso de la técnica Microsatélites Amplificados al Azar (RAM) para estudios de diversidad genética en vegetales. En: Acta Agronómica. Vol. 57, No.4. p. 219-226.
- NARVÁEZ, S. y SEVERICHE, C. (2010). Generalidades de la región del Pacifico Sudeste.p. 11-19. En: Informe Nacional Sobre el Estado del Ambiente Marino en los Países del Pacifico Sudeste. Caso Colombia. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras – INVEMAR. CPPS. Santa Marta. Colombia.147p.
- NEI, M. (1978). Genetic distance between populations. En: Am Nat. 106. P. 283-292.
- NELSON, J. S. (1994). Fishes of the world. 3 Ed. John Wiley and Sons Inc. New York, USA. 600 p.
- LOPERA-BARRERO, N.M., POVH, J.A., RIBEIRO,R., GOMES, P., JACOMETO, C. y DA SILVA LOPES, T. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. En: Cien. Inv. Agr. 35(1): 77-86.
- OCAMPO, P., y RUBIO, E. (1989).Fomento a la pesca artesanal de camarones y peces en jaulas flotantes, una alternativa a la pesca artesanal, comunidad de la Plata. Corporación Valle del Cauca – CVC– Informe final. 40 p.
- O.CONNELL, M., y WRIGHT, J. (1997). Microsatellite DNA in fishes. En: Rev Fish Biol and Fisheries. Vol. 7. p. 331-363.
- ORDOÑEZ, M. *et al.,* (2012). Caracterización molecular del dorado C*. Hippurus* en el pacífico colombiano utilizando marcadores moleculares RAMs. (Artículo en revisión).
- OSLINGER, A., MUÑOZ, J.E.; ALVAREZ, L.A.; MORENO, F.; POSSO, A. (2006). Caracterización de Cerdos Criollos Colombianos Mediante la Técnica Molecular RAM. En: Act. Agron. Vol. 55. No. 4. p.45-50.
- OYARZÚN, C., GALLEGUILLOS, R. y MONSALVES, R. (1997). Variabilidad genética en peces demersales: Distribución en profundidad versus restricciones filogenéticas. En: Sci. Mar., Vol. 61. No.3. p. 291-296.
- PARQUES NACIONALES NATURALES DE COLOMBIA (PNN). (2009). Consejos Comunitarios de Juanchaco, La Barra, Puerto-España Miramar, Ladrilleros, La

Plata-Bahía Málaga, y WWF – Colombia. Propuesta de Declaratoria. Parque Nacional Natural Bahía Málaga. Síntesis para su Justificación. Septiembre.

- PEAKALL, R. y SMOUSE, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. En: Molecular Ecology Notes 6. p. 288-295.
- PEÑA, IGOR IVAN. (1999). Aspectos Reproductivos y Ecologia Trófica de *Lutjanus argentiventris, Lutjanus guttatuis* y *Brotula darkae* en el Parque Nacional Natural Gorgona, Pacifico Colombiano. Tesis. Universidad Del Valle. Cali.
- PIEDRAHÍTA, A. M., POSSO, A.M., MUÑOZ, J.E., y ALVAREZ, L.A. (2008). Variabilidad genética de Hartón del Valle mediante RAM. En: Acta Agron. Vol.57. No.1 Palmira.
- PINEDA SANTIS, H., ARBOLEDA CHACÓN, L., ECHEVERRY ECHAVARRIA, A., URCUQUI INCHIMA, S., PAREJA MOLINA, D., OLIVERA ÁNGEL, M., y BUILES GÓMEZ, J., (2007). Caracterización de la diversidad genética en el pez *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en Colombia central por medio de marcadores RAPD. En: Rev. biol. trop . Vol.55; No.3-4 San José set.-dic.
- PINEDA S. H., OLIVERA A, M., URCUQUI, S., TRUJILLO B, E., y BUILES G, J.J. (2006). Evaluación del polimorfismo por microsatélites en individuos de *Piaractus brachypomus* (Characidae, Serrasalminae) provenientes del río Meta, Colombia. En: Rev Col Cienc Pec. Vol. 19.
- POSADA, B.O., HENAO, W., y GUZMÁN, G. (2009). Diagnóstico de la erosión y sedimentación en la zona costera del Pacífico colombiano. INVEMAR, Serie Publicaciones Especiales No. 17, Santa Marta, 148 p.
- POVH, J.A., RIBEIRO, R.P., SIROL, R.N., MANGOLIN, C.A., GASPARINO, E., LOPERA-BARRERO, N.M., GOMES, P.C., STREIT JR. , D.P. y VARGAS, L. (2006). Importância do monitoramento genético pela utilização de marcadores moleculares na piscicultura. En: AquaCiência, Bento Gonçalves, Brasil (Resumen)
- POVH, J A., LOPERA BARRERO, N. M., RIBEIRO, R. P., LUPCHINSKI JR., E., GOMES, P.,y LOPES, T. S. (2008). Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade. En: Cien. Inv. Agr. Vol.35; No.1;p. 5-15.
- RAMOS-CRUZ, S. (2001). Evaluación de la pesquería de huachinango *Lutjanus peru* en la zona costera de Salina Cruz, Oaxaca, México, durante 1995. En: Ciencia Pesquera. Vol. 14. p.151-157.

- REGITANO, L.C.A. (2001). Introdução à análise de marcadores moleculares. En: Regitano, L.C.A. y Coutinho, L.L. Biologia molecular aplicada à produção animal. Brasil.p.25-39.
- REGITANO, L.C.A. (2001). Protocolo de Análise de Marcadores Microssatélites. En: Regitano, L.C.A. y L.L. Coutinho. Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal. EMBRAPA, Brasília, Brasil. p.195-215.
- RENSHAW, M., KARLSSON, S y GOLD, J.R. (2007). Isolation and characterization of microsatellites in lane snapper (*Lutjanus synagris*), mutton snapper (*Lutjanus analis*), and yellowtail snapper (*Ocyurus chrysurus*). En: Molecular Ecology Notes. Vol 7; p.1084–1087.
- RINZE TURTÓN, M., FRANCO ARENALES, F., ALFARO OCHOA, A. L., y GARCÍA PÉREZ, J. (2005). Evaluación del Potencial del Pargo Amarillo *Lutjanus argentiventris* para cultivo en condiciones controladas. Universidad de San Carlos de Guatemala. Centro de Estudios del Mar y Acuicultura –CEMA.
- ROCHA–OLIVARES, A., y SANDOVAL-CASTILLO, J. (2003). Diversidad mitocondrial y estructura genética en poblaciones alopátricas del Huachinago del Pacifico *Lutjanus peru*. En: ciencias Marinas. Vol., 29. No. 2 p. 197-209.
- RODRIGUEZ-RODRIGUEZ; M P., LOPERA-BARRERO; N. M., PEREIRA R; POVH, J; VARGAS, L.; NARDEZ SIROL, R. y BESPALHOK JACOMETO. C.; 2010. Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. En: Pesq. agropec. bras. Vol.,45. No.1.
- ROJAS, J.R. (1997). Fecundidad y épocas de reproducción del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. En: Revista de Biología Tropical. Vol. 44. No. 1. P. 477-487.
- ROJAS, J. R. (1997). Hábitos alimentarios del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. En: Rev. Biol. Trop. Vol.44, No. 3; y Vol.45; No.1; p. 471-476.
- ROJAS HERRERA, A. y CHIAPPA –CARRARA X. (2002). Hábitos alimenticios del flamenco *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en la costa de Guerrero, México. En: Ciencias Marinas. Vol. 28., No. 2.p.133-147.
- ROJAS, P., GUTIÉRREZ, C., PUENTES, V., VILLA, A., y RUBIO, E. (2004). Aspectos de la biología y dinámica poblacional del pargo coliamarillo *Lutjanus argentiventris* en el Parque Nacional Natural Gorgona, Colombia. En: Invest. Mar., Valparaíso. Vol. 32; No.2; p. 23-36.

- ROJAS, M. J.R, MARAVILLA, E, y CHICAS B. F. (2004). Hábitos alimentarios del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en Los Cóbanos y Puerto La Libertad, El Salvador. En: Rev. Biol. Trop. Vol. 52, No.1; p.163-170.
- ROJAS, P., PAVOLINI, G y PUENTES, V. (2012). Cadenas de comercialización de productos Pesqueros de especies pelágicas del pacífico Colombiano en el marco del corredor Marino del pacífico este tropical –CMAR. En: Puentes, V. y Moncaleano, A. (Eds.). Sistema de Gestión Regional para el Uso Sostenible de los Recursos Pesqueros del Corredor Marino del Pacífico Este Tropical (CMAR). Resultados de Gestión en Colombia.
- ROJO- VASQUEZ, J.A., ARREGUIN SÁNCHEZ, F., GODINEZ- DOMÍNGUEZ, E., y RAMÍREZ- RODRÍGUEZ, M. (1999). Selectividad de redes de enmalle para el Pargo Lunarejo (*Lutjanus guttatus)*, y el Pargo Alazán (*Lutjanus Argentiventris)* en la Bahía de Navidad, Jalisco México. Universidad Autónoma de Baja California. En: Ciencias Marinas. Vol.,25. No. 001. p.152-154.
- RUBIO RINCÓN, E.A., LOAIZA, J.H., y RIASCOS, Z. (2001). Crecimiento y Sobrevivencia del Pargo *Lutjanus argentiventris* (PISCES: Lutjanidae) criado en jaulas flotantes con salinidades variables en el Estuario de la Bahía de Buenaventura, Pacífico de Colombia. IX CONGRESO LATINOAMERICANO SOBRE CIENCIAS DEL MAR. San Andrés Isla, Colombia Septiembre 16 – 20, Resumen Ampliado.
- RUBIO, E.A. (1988)**.** Peces de importancia comercial del Pacífico colombiano. En: Cent. Inv. Mar. Cali, Colombia, 499 p.
- SAITOU, N., Y NEI, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. En: Mol. Biol Evol. 4: 406-425.
- SALINI, J. P., OVENDEN, J. R., STREET, R. y PENDREY, R. 2006. Genetic population structure of red snappers (*Lutjanus malabaricus* Bloch & Schneider, 1801 and *Lutjanus erythropterus* Bloch, 1790) in central and eastern Indonesia and northern Australia. En: Journal of Fish Biology. Vol.,68. p. 217–234.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., y MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd d. Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York.
- SANTAMARÍA-MIRANDA, A., ELORDUY-GARAY, J.F., VILLALEJO-FUERTE, M., y ROJAS-HERRERA, A.A. (2003). Desarrollo gonadal y ciclo reproductivo de *Lutjanus peru* (Pisces: Lutjanidae) en Guerrero, México. En: Rev. Biol. Trop. Vol. 51, No.2; p. 489-502.

- SANTAMARIA – MIRANDA, A., SAUCEDO LOZANO, M., HERRERA MORENO, N., y APUN MOLINA J.P. (2005). Hábitos alimenticios del Pargo amarillo Lutjanus argentiventris y del pargo rojo Lutjanus colorado (pisces Lutjanidae) en el norte de Sinaloa, México. En: Rev. Biol. Mar y Ocean. Vol, 40., No. 1. p. 33-44.
- SARABIA-MÉNDEZ, M., GALLARDO-CABELLO, M., ESPINO-BARR, E., y ANISLADO-TOLENTINO, V. (2010). Characteristics of population dynamics of *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) in Bufadero Bay, Michoacan, México. En: Hidrobiológica. *Vol.* 20, No.2; p. 147-157.
- SAUCEDO, M. (2000). Alimentación natural de juveniles de *Lutjanus peru* (Nichols & Murphy, 1922) y *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) (Lutjanidae: Perciformes) en la costa de Jalisco y Colima, México. Tesis de Licenciatura. Universidad de Colima. 120p.
- SLATKIN, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. En: Genetics. Vol. 139. p.457-462.
- SOTO ROJAS, R. L., MEJÍA-ARANA, F., PALACIOS, J. A., y HIRAMATSU, K. (2009).Reproducción y crecimiento del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. En: Rev. Biol. Trop. Vol. 57 (1-2); p.125-131, Marzo-junio.
- SUÁREZ, A. (1992). Contribucion al comnocimiento biológico de *Lutjanus guttatus* en la Costa Pacífica Colombiana. Tesis Biologia. Universidad del Valle.p.92.
- SUÁREZ, A. y RUBIO, F. (1993). Aspectos sobre el crecimiento y ciclo sexual de *Lutjanus guttatus* (Pisces:Lutjanidae) en la Bahía de Málaga, Pacífico de Colombia. Congreso Centroamericano y del Caribe en Ciencias del Mar. Universidad del Valle. Colombia. 152 p.
- TEJADA, C., GARCÍA, L., MÁLIKOV, I., y VILLEGAS, N. (2003). Compilación Oceanográfica de la Cuenca Pacífica Colombiana. Centro Control Contaminación del Pacífico Colombiano. Ed. DIMAR. Serie Publicaciones Especiales Vol. 1, San Andrés de Tumaco, 124 p.
- THORGAARD, G.H., BAILEY, G.S., WILLIAMS, D., BUHLER, D.R., KAATTARI, S.L., RISTOW, S.S., HANSEN, J.D., WINTON, J.R., BARTHOLOMEW, J.L., NAGLER, J.J., WALSH, P.K., VIJAYAN, M.M., DEVLIN, R.H., HARDY, R.W., OVERTURF, K.E., YOUNG, W.P., ROBISON, B.D., REXROAD, C. y PALTI, y. (2002) Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. En: *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 133. p.609-646.

- TORRES JARAMILLO, J., MUÑOZ, J.E., CÁRDENAS, H., ÁLVAREZ, L.A. Y PALACIO, J.D. (2010). Caracterización de tilapia roja (*Oreochromis sp.)* con marcadores moleculares RAPD. En:Acta Agronomica. Vol .,59. p.236 – 246.
- VARGAS, M. (1998). Estimación de parámetros biológico pesqueros para el pargo mancha *Lutjanus guttatus* en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. En: Uniciencia 15-16:79-84.
- VASEMÄGI, A., CROSS, R., PAAVER, T., KOLJONEN, L.M., y NILSSON, J. (2005). Extensive immigration from compensatory hatchery releases into wild Atlantic salmon population in the Baltic Sea: spatio-temporal analysis over 18 years. En: Heredity 95. p.76-83.
- VÁSQUEZ SÁNCHEZ, R. (2005). Hábitos alimenticios del Pargo Amarillo *Lutjanus argentiventris* (Peters 1869) en la Bahía de la Paz, B.C.S., México. Instituto Politécnico Nacional. México. 123 p.
- VELASCO VINASCO, E. y RODRÍGUEZ- RUBIO, E. (2010). Variabilidad mareal y temporal del zooplancton en la Bahía de Tumaco. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacifico, Área de Oceanografía Operacional, Capitania de Puerto, San Andrés de Tumaco, Nariño, Colombia.
- VINASCO MONDRAGON, A.M., ALVAREZ FRANCO, L.A., MUNOZ, J.E., POSSO, A.M. (2009). "Estudio de la Diversidad Genética de Cabras Criollas Utilizando Marcadores Moleculares RAMs" . En: Colombia Revista Colombiana de ciencias Pecuarias. Vol. 22. p.447 – 473.
- VIVEROS, E., RUBIO –RINCÓN, E., y GAMBOA D`CROZ J. H. (2008). Evaluación del crecimiento y sobrevivencia del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus (Steindachner, 1869)* en dos sistemas de producción, estanques en tierra y jaulas flotantes, en la estación acuícola Bahía Málaga. Pacifico colombiano. Memorias IV Congreso Colombiano de Acuicultura. En: Rev Colomb Cienc Pec. Vol. 21. p. 455-522.
- WASKO, A.P., MARTINS, C., OLIVEIRA, C., SENHORINI, J.A. y FORESTI, F. (2004). Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. En: Journal of Applied Ichthyology. Vol. 20: p. 48–52.
- WEIR, B.S. y COCKERHAM, C.C. (1994). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. En: Evolution. 38. p.1358-70.

- WHITELEY, A, SPRUELL, P y ALLENDORF, F. (2006). Can common species provide valuable information for conservation?. En: Molecular Ecology. Vol 15. p. 2767–2786.
- WILSON, K.; LI, Y.; WHAN, V.; LEHNERT, S.; BYRNE, K.; MOORE, S.; PONGSOMBOON, S.; TASSANAKAJON, A.;ROSENBERG, G.; BALLMENT, E.; FAYAZI, F.; SWAN, J.; KENWAY, M.; y BENZIE, J. (2002) Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. En: Aquaculture*. 204*: 297-309.
- WRIGHT, S. (1978). Evolution and the geneticw of populations. Vol. 4. Variability withng and amoung natural populations. Univ. Chicago. Press. 580 p.
- XU, Z., PRIMAVERA, J.H., PENA, L.D.D.L., PETTIT, P., BELAK, J. y ALCIVAR-WARREN, A. (2001). Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. En: Aquaculture. No. 199. p. 13-40.
- YU-SONG GUO, ZHONG-DUO WANG, CHU-WU LIU, LI LIU y YUN LIU. (2007). Isolation and characterization of microsatellite DNA loci from Russell's snapper (*Lutjanus russellii*). En: Molecular Ecology Notes. No. 7. p. 1219–1221.
- ZHANG, J.; ZEPING, C., y HUANG, H. (2006). Isolation and characterization of microsatellite loci from mangrove red snapper *Lutjanus argentimaculatus.* En: Molecular Ecology Notes. Vol. **6. p.**408–411.
- ZORRILLA, M. X. (1999). Aspectos Reproductivos de algunos peces demersales en Parque Nacional Natural Gorgona. Tesis. Universidad del Valle .
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSFI, A., y LABUDA, D. (1994).Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. En: Genomics. p.176-183.

12. ANEXOS

ANEXO A. protocolo de extracción ADN

PROTOCOLO: PURIFICACIÓN DE ADN TOTAL DE TEJIDOS ANIMALES (PROTOCOLO SPIN-COLUMN)

Puntos importantes antes de empezar:

- Todo paso de centrifugación se realiza a temperatura ambiente (15-25 °C) en una micro centrífuga.
- El votex debe de ser realizado por pulso-votex por 5-10s.
- Opcional: RNAsa A puede ser usada para digerir ARN durante el proceso. RNAsa no viene incluida en el kit.

Cosas para hacer antes de empezar:

- El Buffer ATL y AL puede formar precipitados por el almacenaje. Si es necesario calienta a 56°C hasta que los precipitados estén completamente disueltos.
- El Buffer AW1 y AW2, son suministrados concentrados. Antes de usarlo por primera vez, adicione la cantidad apropiada de etanol (96-100%) como está indicado en la botella para obtener la solución de trabajo.
- Precaliente un termociclador, incubadora, o plataforma oscilante a 56°C para el paso 2.
- Si usa tejidos congelados, dejar estabilizar la muestra hasta temperatura ambiente. Evite descongelar y congelar las muestras puesto que esto reduce el tamaño de ADN.

Procedimiento:

1. **Corte 25 mg de tejido (10mg de bazo) en pequeñas piezas, y coloque en un tubo de micro centrífuga de 1.5 ml. Adicione 180ul de Buffer ATL.**
   Asegúrese que sea la cantidad correcta de material usado. Se recomienda cortar tejido en pequeñas piezas para mejorar la eficiencia de la lisis. Si desea el tiempo de la lisis puede ser reducido macerando la muestra en nitrógeno líquido antes de adicionar el Buffer ATL y la proteinasa K.
2. **Adicione 20ul de proteinasa K. Mezcle a fondo por vortex, e incube a 56°C hasta que el tejido está completamente lisado. Haga vortex ocasionalmente durante la incubación para dispersar la muestra.**

El tiempo de lisis varía dependiendo del tipo de tejido. La lisis está completa generalmente de 1-3 horas. Es más conveniente que las muestras estén lisadas durante la noche.

Después de la incubación el lisado puede parecer viscoso, pero no puede ser gelatinoso pues puede inferir en la mini spin-column.

Opcional: si es requerido ADN libre de ARN, adicionen 4ul de RNasa A (100mg/ml), mezclar por vortex, incubar por 2 minutos a temperatura ambiente antes de continuar con el paso 3.

3. **Haga vortex por 15 s. Adicione 200ul de Buffer AL a la muestra, y mezcle a fondo por vortex. Entonces adicionar 200ul de etanol (96-100%), mezcle de nuevo a fondo por vortex.**

   Es esencial que la muestra, Buffer AL, y el etanol sea mezclados inmediatamente a fondo por votex o pipeteando la solución homogénea. El Buffer AL y el etanol pueden ser premezclados y adicionarse juntos en un paso para ahorrarse tiempo cuando se procesan múltiples muestras.

   Puede formase un precipitado blanco con la adición de Buffer AL y el etanol. Este precipitado no interfiere con el etanol, en éste caso es recomendado, sacudir fuertemente y hacer vortex.

4. **Pipetear la mezcla de paso 3 (incluyendo cualquier precipitado) dentro de la mini spin-column colocando en un tubo de colección de 2 ml. Centrifugar a 8000rpm por 1 minuto. Descartar el filtrado y el tubo de colección.**

5. **Colocar la mini spin-column en un nuevo tubo de colección de 2 ml. Adicionar 500ul de Buffer AW1, y centrifugue por 1 minuto a 8000rpm. Descartar el filtrado y el tubo de colección.**

6. **Colocar la mini spin-column en un nuevo tubo de colección de 2ml. Adicionar 500ul de Buffer AW2, y centrifugue por 4 minutos a 13200 rpm para secar la membrana. Descartar el filtrado y el tubo de colección.**

   Es importante secar la membrana de la mini spin-column, puesto que el etanol residual puede inferir con las reacciones siguientes. Este paso de centrifugación asegura que no se transportará ningún etanol residual durante las diluciones siguientes.

   Después de la centrifugación, remueva cuidadosamente la mini spin-column de tal forma que no haga contacto con el filtrado, puesto que esto dará lugar a

que se adhiera etano al cilindro. Si esto ocurre, vacíe el tubo de colección y reúselo en otra centrifugación por 2 minutos a 13200rpm.

7. **Coloque la mini spin-column en tubo de micro centrifuga de 1.5ml, y pipetee 200ul de Buffer AE directamente en la membrana. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugue por 1 minuto a 8000rpm de la dilución.**

   La dilución 100ul* (en lugar de 200ul) incrementa la concentración final de ADN.

8. **Recomendado: Para maximizar la obtención de ADN, repita la dilución una vez más como se describe en el paso 7.**

   Este paso conduce a incrementar la obtención de ADN total.

   Nota: no diluya más de 200ul en el tubo de micro centrífuga de 1.5ml porque puede que la mini spin-column entre en contacto con la dilución.

Anexo B. Matriz de datos obtenida mediante el análisis de patrones de bandas para *L. guttatus con* cuatro marcadores moleculares RAMs

POB		pob	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1	L1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
1	L2	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1
1	L3	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0
1	L4	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0
1	L5	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0
1	L6	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
1	L7	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
1	L8	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
1	L9	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
1	L10	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
2	L11	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
2	L12	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
2	L13	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
2	L14	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0
2	L15	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
2	L16	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
2	L17	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
2	L18	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
2	L19	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1
2	L20	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
2	L21	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
2	L22	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
2	L23	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
2	L24	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
2	L25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
3	L26	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	1	1	0	0	0	1	1
3	L27	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0

3	L28	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
3	L29	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
3	L30	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0
3	L31	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0
3	L32	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0
3	L33	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
3	L34	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
3	L35	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0
3	L36	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0
3	L37	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
3	L38	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
3	L39	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0

POB		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
1	L1	0	0	0	0	0	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
1	L2	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
1	L3	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
1	L4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
1	L5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
1	L6	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	L7	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
1	L8	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
1	L9	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
1	L10	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
2	L11	0	0	0	1	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
2	L12	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
2	L13	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
2	L14	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
2	L15	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
2	L16	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
2	L17	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1

2	L18	0	0	0	1	0	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
2	L19	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
2	L20	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
2	L21	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
2	L22	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
2	L23	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
2	L24	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
2	L25	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
3	L26	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1
3	L27	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
3	L28	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1
3	L29	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
3	L30	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
3	L31	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
3	L32	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
3	L33	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
3	L34	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
3	L35	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
3	L36	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
3	L37	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
3	L38	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
3	L39	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1

Anexo C. Matriz de datos obtenida mediante el análisis de patrones de bandas para *L. argentiventris* *con* cuatro marcadores moleculares RAMs

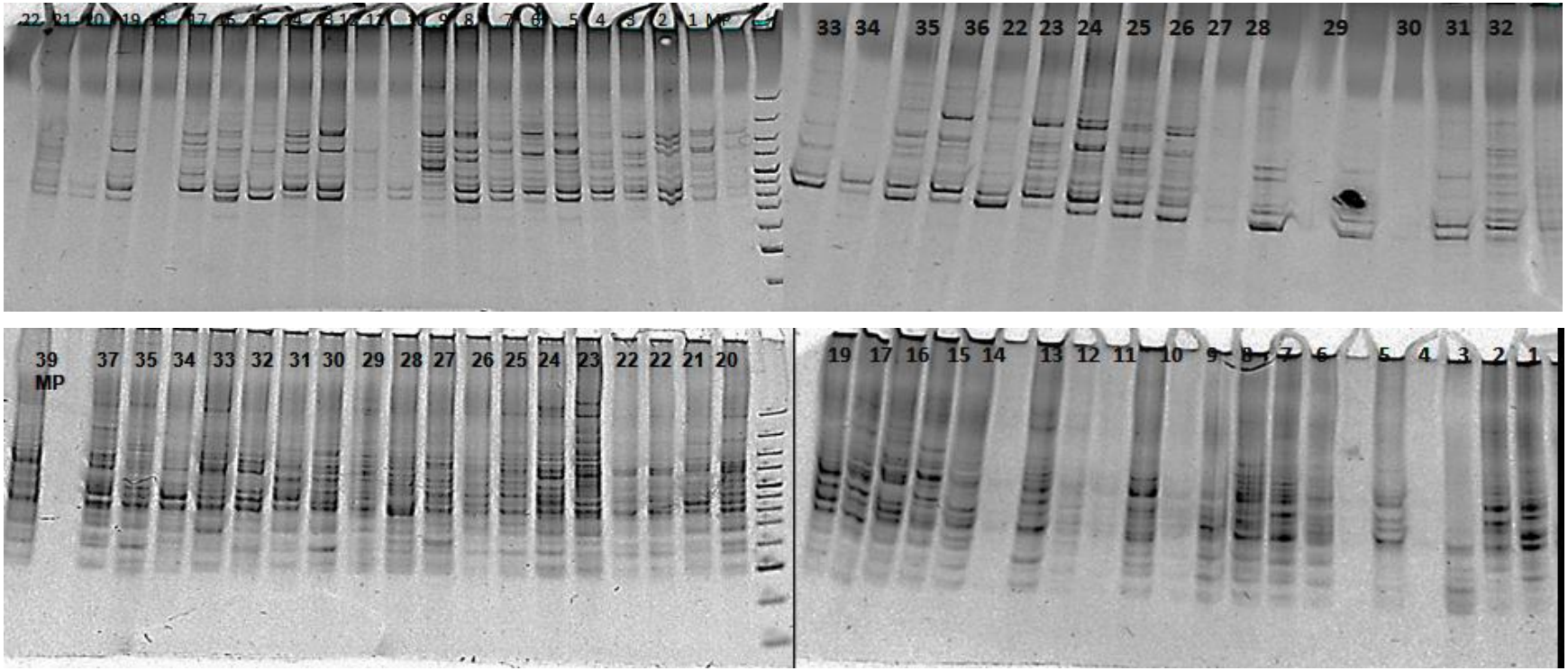
banda	pob	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A5	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
A6	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
A7	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
A8	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
A9	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
A10	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A11	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
A12	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A13	2	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
A14	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A15	2	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A16	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A17	2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A18	2	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
A19	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
A20	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
A21	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999
A22	2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
A23	2	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0
A24	2	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
A25	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
A26	3	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
A27	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0

A28	3	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
A29	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
A30	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
A31	3	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
A32	3	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
A33	3	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
A34	3	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
A35	3	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
A36	3	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
A37	3	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
A38	3	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
A39	3	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
A40	3	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0

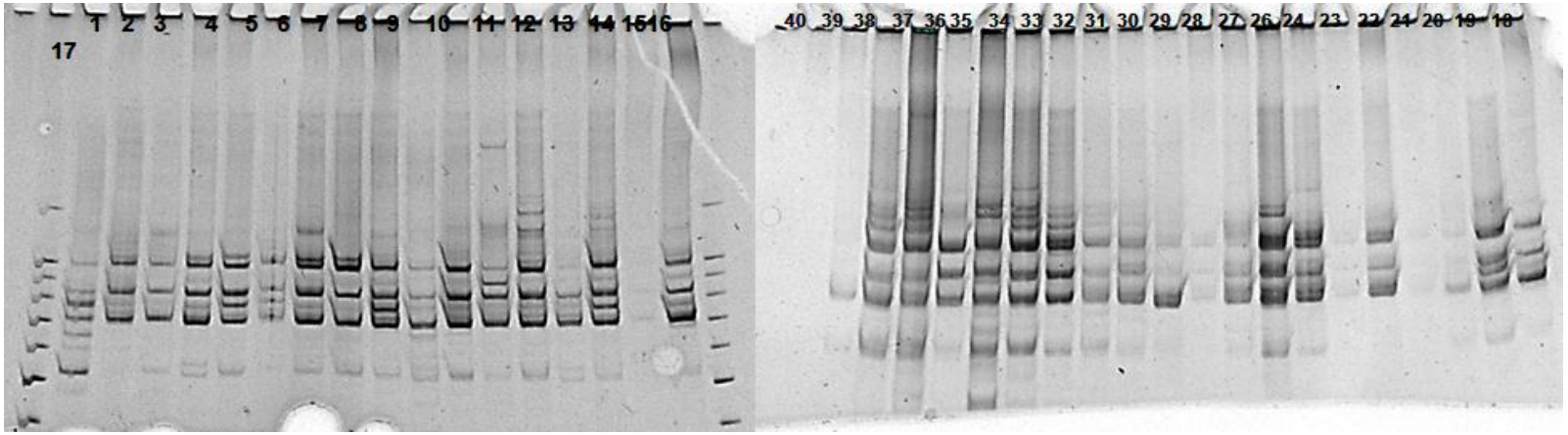
banda	pob	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
A1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
A2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
A3	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
A4	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
A5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
A6	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
A7	1	999	999	999	999	999	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
A8	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
A9	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
A10	2	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1
A11	2	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1
A12	2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
A13	2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1
A14	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1
A15	2	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
A16	2	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1

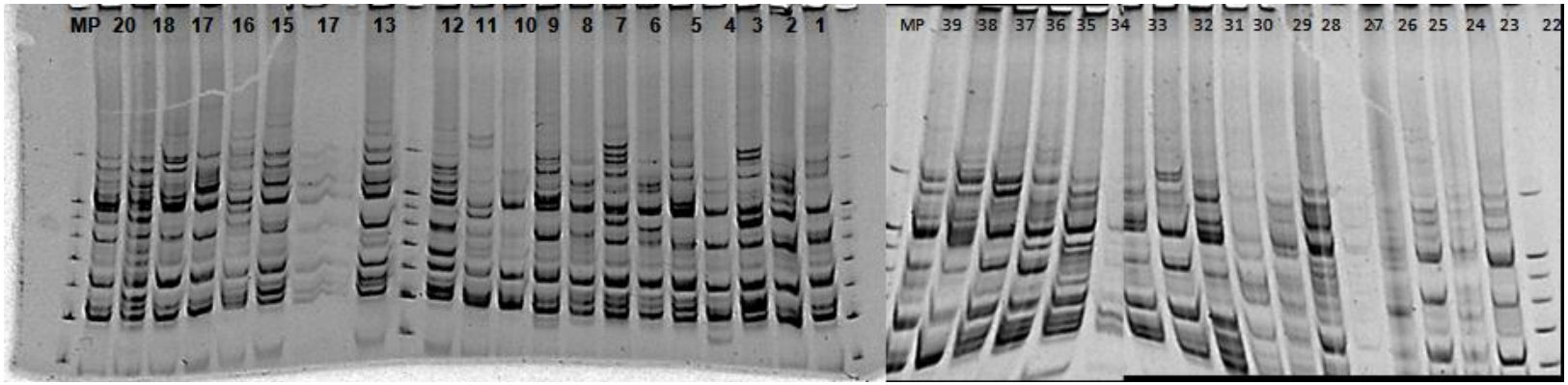
A17	2	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
A18	2	1	1	1	1	0	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	0	0	1	1	0	1	1	1
A19	2	999	999	999	999	999	0		1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1
A20	2	999	999	999	999	999	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
A21	2	999	999	999	999	999	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
A22	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
A23	2	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
A24	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
A25	2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1
A26	3	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
A27	3	1	0	0	0	0	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	0	0	0	1	0	1	1	1
A28	3	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1
A29	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1
A30	3	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1
A31	3	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
A32	3	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
A33	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
A34	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1
A35	3	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1
A36	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
A37	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1
A38	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1
A39	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1
A40	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1

Anexo D. Geles de policarilamida de los cebadores utilizados en la técnica RAMs. Cebador CT *Lutjanus argentiventris* y *Lutjanus guttatus*

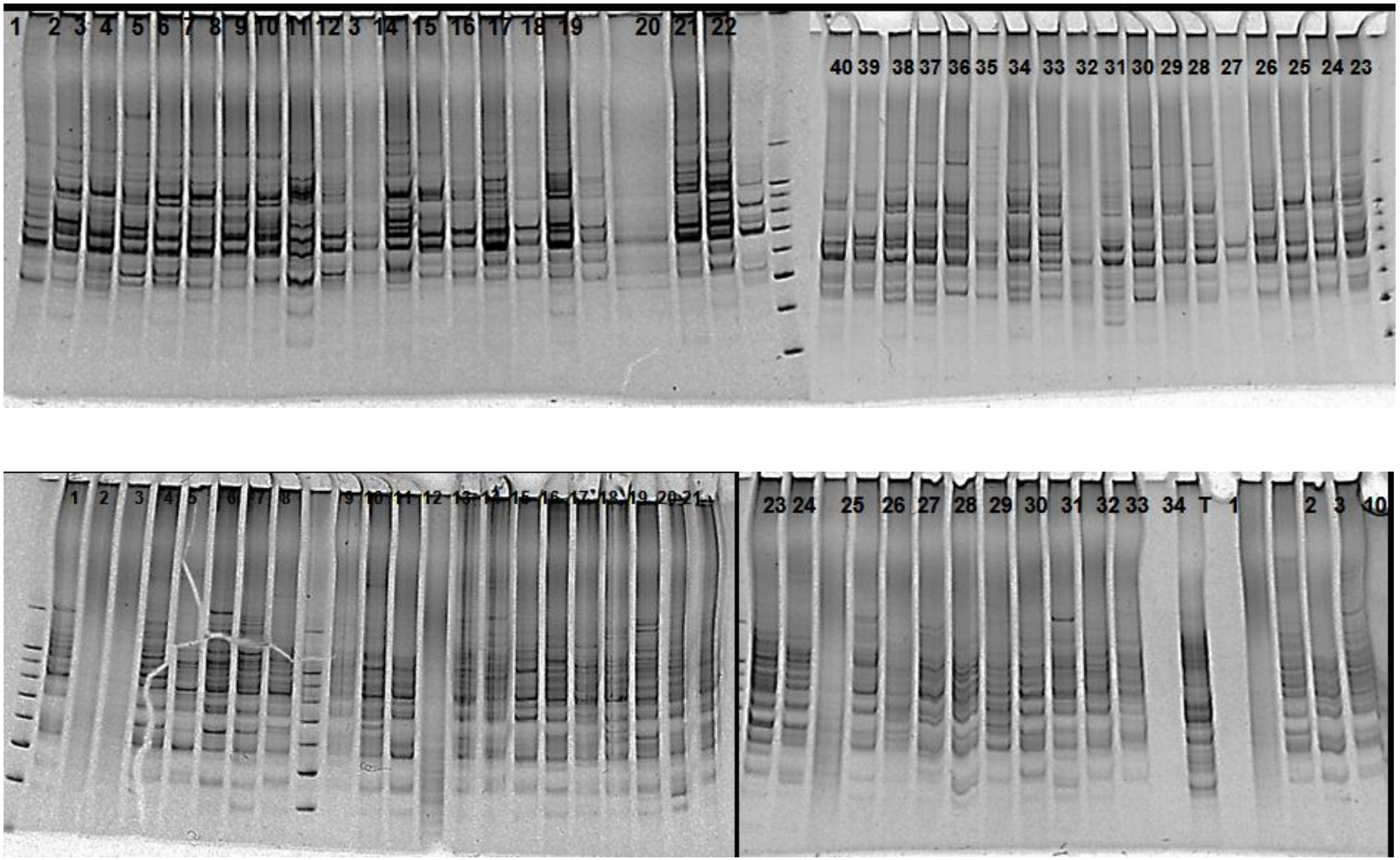
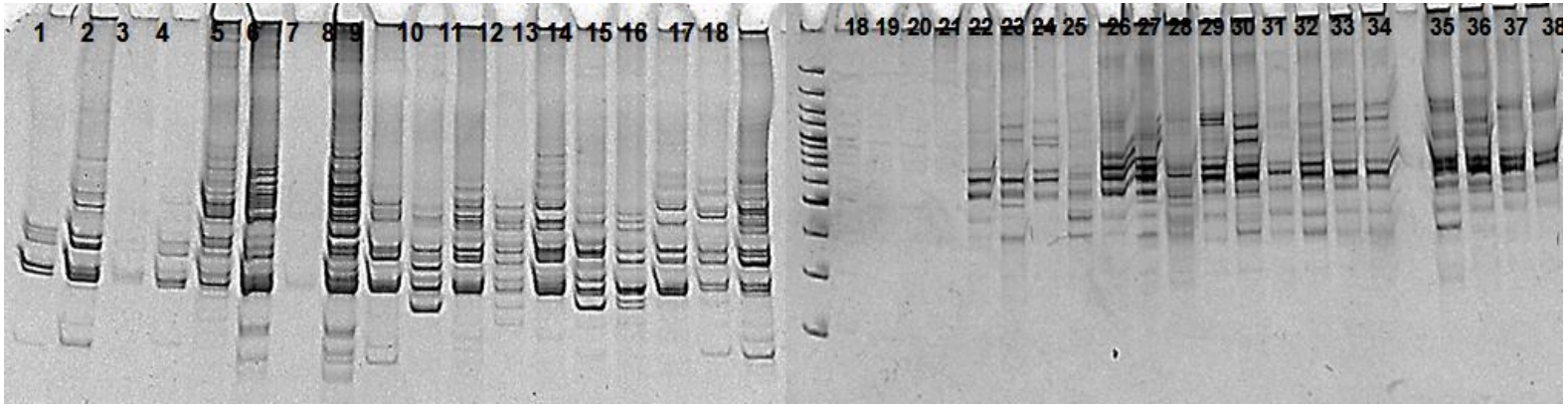
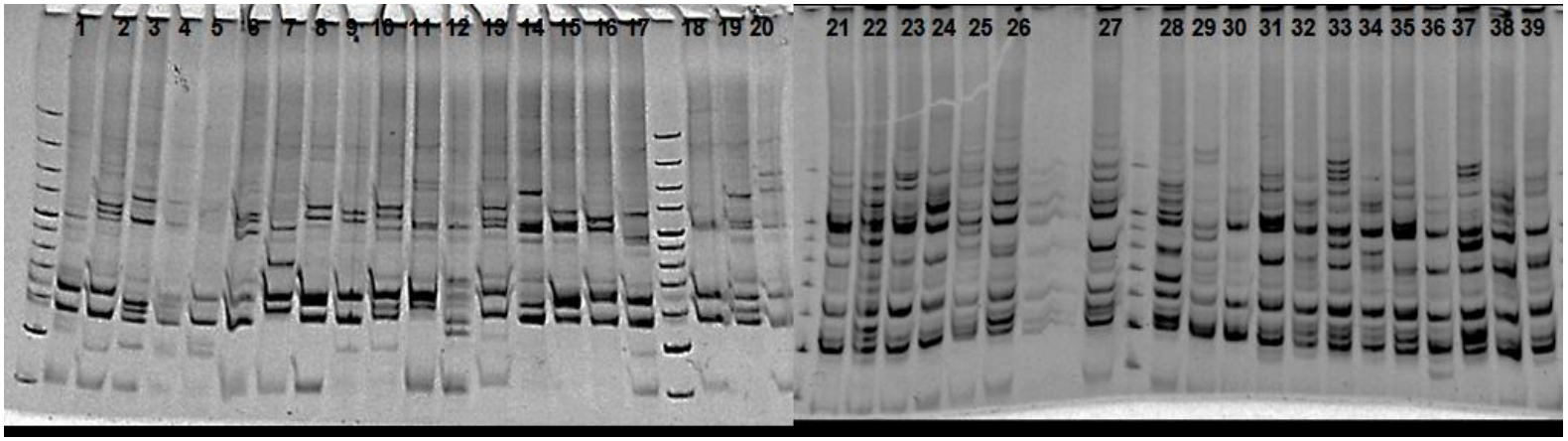


Cebador CCA *Lutjanus argentiventris* y *Lutjanus guttatus*





Cebador AG *Lutjanus argentiventris* y *Lutjanus guttatus*



Cebador ACA *Lutjanus argentiventris* y *Lutjanus guttatus*