



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



IPN-CICIMAR

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**

**Desarrollo de un pie de cría de *Cherax quadricarinatus*  
con elevada variabilidad genética**

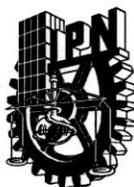
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS  
MARINOS

PRESENTA

Graciela Mora Castrejón

La Paz, B.C.S., 26 de junio de 2019



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S. siendo las 12:00 horas del día 31 del mes de Mayo del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"DESARROLLO DE UN PIE DE CRÍA DE *Cherax quadricarinatus*  
CON ELEVADA VARIABILIDAD GENÉTICA"

Presentada por el alumno:

**MORA**  
Apellido paterno

**CASTREJÓN**  
materno

**GRACIELA**  
nombre(s)

Con registro: 

A	1	7	0	8	9	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Directores de Tesis

\_\_\_\_\_  
**DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA**  
Director de Tesis

\_\_\_\_\_  
**DR. HUMBERTO VILLARREAL COLMENARES**  
2°. Director de Tesis

\_\_\_\_\_  
**DRA. SILVIE DUMAS**

\_\_\_\_\_  
**DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ**

\_\_\_\_\_  
**DR. PEDRO CRUZ HERNÁNDEZ**

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

\_\_\_\_\_  
**DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO**



**I.P.N.**  
**CICIMAR**  
**DIRECCIÓN**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 12 del mes de Junio del año 2019

El (la) que suscribe ING. GRACIELA MORA CASTREJÓN Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A170897 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA Y DR. HUMBERTO VILLARREAL COLMENARES

y cede los derechos del trabajo titulado:

"DESARROLLO DE UN PIE DE CRÍA DE *Cherax quadricarinatus*

CON ELEVADA VARIABILIDAD GENÉTICA"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: grazzy\_91@hotmail.com - gcarmona2007@gmail.com - humberto04@cibnor.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ING. GRACIELA MORA CASTREJÓN

*Nombre y firma del alumno*

## **Agradecimientos**

A FINNOVA clave 175320 y SEP-CONACYT clave 242683, proyectos otorgados al Dr. Humberto Villarreal para llevar a cabo mi trabajo de tesis en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y en BioHelis, el Parque de Innovación Tecnológica.

A la empresa Redclaw de México SPR de RL por darme acceso a sus sistemas de cultivo y la toma de muestra para la evaluación.

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN por la formación académica, apoyos otorgados para la estancia de investigación, y la beca BEIFI otorgada por el Dr. Gustavo Hernández Carmona mediante el proyecto a su cargo.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por las Becas Nacional y Mixta otorgadas con número de registro 618254.

A mis directores de tesis:

El Dr. Humberto Villarreal Colmenares por su asesoría y orientación durante todo el trabajo de tesis. Por siempre hacerme razonar de la mejor manera y su apoyo para poder realizar la estancia. Por motivarme y transmitirme parte de sus conocimientos y experiencia con la especie.

El Dr. Gustavo Hernández Carmona por siempre estar al pendiente de mis avances, por su ayuda y guía durante todo el proceso de mi maestría.

A mi Comité Tutorial:

El Dr. Pedro Cruz Hernández por el curso impartido de genética en acuicultura y por darme acceso al laboratorio de genética acuícola y sus recomendaciones para el análisis de los datos y orientación para mi trabajo de tesis.

La Dra. Silvie Dumas por el curso impartido que me ayudo a comprender mejor la genética, por su orientación y apoyo.

El Dr. Francisco Javier García Rodríguez por el curso impartido relacionado con genética de poblaciones y su orientación durante mi trabajo de tesis.

Al Personal de CIBNOR-BIOHELIS:

Ing. Acu. Mayra Vargas por su ayuda en la realización de las cruzas de reproductores, biometrías de juveniles y durante todo el proceso de reproducción del pie de cría, en la toma de muestras y apoyo incondicional.

Dr. José Naranjo Paramo por estar al pendiente y hacer posible que pudiera venir a La Paz, su orientación en mi trabajo de tesis y ponerme en contexto como es que se ha realizado el cultivo desde sus inicios.

Biol. Patricia Hinojosa Baltazar por su ayuda en laboratorio, por darme acceso a equipos y enseñarme el uso de estos.

Biol. Jesús Aguilar y Víctor Polo Murillo por la realización de cruzas, mantenimiento de reproductores y juveniles, por su apoyo en biometrías y toma de parámetros fisicoquímicos tanto en estanques como en las tinas circulares, en la toma de muestras y en la alimentación de ambos.

A José Andrés Hernández Gurrola por ser mi compañero durante toda la maestría, por su apoyo en el mantenimiento de juveniles y biometrías de estos.

A Adriana Max por su orientación en laboratorio, enseñarme el uso de equipos y técnicas para llevar a cabo el análisis de las muestras.

Al Dr. Manuel Vera Rodríguez por recibirme para la Estancia de Investigación en Universidad de Santiago de Compostela, compartirme de sus conocimientos e incluirme como colaborador en el proyecto de A. montana. Al grupo de investigación ACUIGEN por el aprendizaje en el uso de programas y técnicas genéticas.

A mi familia y seres queridos no les dedico esta tesis, les dedico mi vida...<3

## **Glosario**

**ADN (Ácido desoxirribonucleico):** Molécula compleja donde reside la información genética de los seres vivos. Es una estructura de doble hélice (Modelo de Watson y Crick), formada por dos hebras de nucleótidos, que se mantiene unida por enlaces de hidrógeno entre pares de bases (Timina, Adenina, Citosina y Guanina).

**Alelo:** Cada una de las formas alternativas de un gen dado, concernientes al mismo carácter.

**Análisis de Varianza Molecular (AMOVA):** Método estadístico para definir diferencias genéticas entre grupos o poblaciones, que se basa en el análisis de varianza de las frecuencias genotípicas.

**Cadenas de Markov:** Modelo que es ajustable para modelar una secuencia de variables aleatorias, tales como secuencias de pares de bases de nucleótidos en una cadena de ADN, en la cual la probabilidad que asume el valor de una variable depende del valor de las variables más recientes que la preceden.

**Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC):** Método que se basa en la simulación de un tipo de proceso estocástico para estudiar las propiedades de una distribución de probabilidad que no puede ser estudiada fácilmente por métodos analíticos. Una Cadena de Markov genera una serie de variables aleatorias de manera que la distribución de probabilidad de estados futuros está completamente determinada por el estado actual de la cadena.

**Contenido de información polimórfica (PIC):** Medida de “informatividad” relacionada con la heterocigosidad esperada que se calcula a partir de las frecuencias alélicas.

**Corrección de Bonferroni:** Procedimiento no paramétrico empleado para reducir el error tipo I (rechazar una hipótesis nula verdadera) cuando se realizan múltiples pruebas o comparaciones.

**Cruzamiento:** Fecundación de los gametos femeninos (hembra) de un individuo con los masculinos (macho) procedentes de otro, generalmente de diferente genotipo.

**Cuello de botella:** Proceso en el que una población o especie ha sufrido una drástica disminución en el número de individuos. Como resultado, la variabilidad genética es mucho menor a la original.

**Deriva genética:** Proceso de cambio aleatorio en las frecuencias alélicas en poblaciones pequeñas a través de generaciones.

**Desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg:** Sucede cuando la población se desvía de manera significativa de estas proporciones se habla de desequilibrio HW, y se puede medir mediante el índice de fijación  $F$  (Wright, 1965), el cual se expresa para un *locus* cualquiera como:  $F = (H_E - H_O) / (H_E)$ .

**Díada:** Se usa para referirse a grupos compuestos por dos, como las cruzas, las relaciones de pareja o las relaciones cercanas que existen en estos grupos.

**Diferenciación genética:** Grado de divergencia entre dos poblaciones o especies tomando en cuenta los indicadores de diversidad genética como diversidad alélica, heterocigosidad, etc.

**Distancia genética:** Es una medida de las diferencias entre las frecuencias alélicas en dos poblaciones o especies.

**Efecto Wahlund:** Reducción en la heterocigosidad en relación a lo esperado según el equilibrio de Hardy-Weinberg en una población separada en varias subpoblaciones parcialmente aisladas.

**Endogamia o consanguinidad:** Apareamiento entre organismos relacionados entre sí que ocasiona un aumento de la homocigosidad.

**Equilibrio de Hardy-Weinberg:** Describe los efectos de la reproducción y las leyes de Mendel sobre las frecuencias alélicas y genotípicas de una población. Dice que, en una población infinita, sin efectos de selección, migración, ni mutación y con apareamiento al azar, el equilibrio de Hardy-Weinberg se producirá después de una generación, siempre que las mismas frecuencias génicas se mantengan.

**Estadísticos  $F$  de Wright:** Mide la reducción de heterocigosis entre distintos niveles de una jerarquía poblacional. Para definir la estructuración genética entre poblaciones se utiliza el índice de fijación ( $F_{st}$ ), el cual sirve para indicar el grado en

el que dos o más poblaciones se diferencian entre sí. El coeficiente de consanguinidad o endogamia (FIS) mide el déficit de heterocigotos en la población, indicando si existe endogamia o exogamia. La correlación entre los genes de los individuos y los de la población total es representada por (FIT), que corresponde a la endogamia total de la población.

**Estimación.** Método que utiliza los valores de una muestra observada para obtener información relativa a un parámetro o constante característica de la población que procede la muestra.

**Estimaciones de parentesco:** Usada en cada uno de los grupos usando valores de referencia donde: UR son individuos no relacionados ( $\leq 0.125$ ), HS representa medios hermanos o medianamente relacionados ( $0.125-0.375$ ) y FS son los hermanos completos o fuertemente emparentados ( $>0.375$ ).

**Estructura genética poblacional:** Ocurre cuando en dos o más sitios colectados presentan un grado de diferenciación genética tal que se consideran como subpoblaciones diferentes.

**Frecuencia alélica:** Es la proporción encontrada de un alelo en un locus dado en una muestra de organismos.

**Heterocigoto:** Individuo diploide o poliploide que ha heredado de dos o más alelos diferentes en un determinado locus.

**Homocigoto:** Un individuo que ha heredado el mismo alelo de ambos padres para un determinado locus.

**Heterocigosidad esperada:** Proporción de organismos heterocigotos calculada a partir del teorema del equilibrio de Hardy-Weinberg. Su cálculo implica la obtención de las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas siguiendo un binomio al cuadrado  $(p + q)^2$ , en donde p y q son las frecuencias alélicas y  $2pq$  corresponderá a la frecuencia de heterocigotos.

**Heterocigosidad observada:** Proporción de organismos heterocigotos calculada a partir de los genotipos observados en una muestra poblacional. Es calculado como

el número de individuos heterocigotos para un locus, dividido entre el número total de individuos de la muestra y se utiliza como estimador de la variabilidad genética.

**Índice de fijación FST:** Mide la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones y por tanto la diferenciación genética entre ellas. El estadístico FST puede ser definido como la correlación entre dos alelos seleccionados al azar al interior de las subpoblaciones en relación a los alelos colectados al azar de la población total.

**Índice de fijación o coeficiente de endogamia (Fis):** Reducción en la heterocigosidad total de una población, por lo cual indica el nivel de endogamia en las poblaciones.

**Inferencia Bayesiana:** Método estadístico en el cual no hay una distinción lógica entre los parámetros del modelo y los datos, sino que ambos son variables aleatorias con una distribución de probabilidad conjunta, la cual es especificada por un modelo probabilístico. La estadística bayesiana involucra manipular estas distribuciones para hacer inferencias sobre los parámetros o el modelo de probabilidad dados los datos. El principal objetivo de la inferencia bayesiana es calcular la distribución *a posteriori* de los parámetros, la cual es la distribución condicional de los parámetros dado los datos.

**Loci:** Plural de locus.

**Locus:** La posición que un gen tiene en un cromosoma o dentro de un segmento de ADN genómico. Por convencionalismo, se aplica el término para referirse a genes o marcadores moleculares aun cuando no se conozca su lugar en el genoma.

**Marcador molecular:** Genes, proteínas o fragmentos de ADN no codificante polimórficos, que permiten distinguir entre familias, poblaciones o especies. Se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante.

**Máxima verosimilitud:** Método estadístico empleado para ajustar un modelo estadístico a los datos en donde se busca maximizar su probabilidad en base a

ciertos parámetros, es decir, maximizar la verosimilitud en función de los parámetros para un conjunto de datos fijos.

**Microsatélite:** También son conocidos como SSRS (del inglés *Simple Sequence Repeats*) o STRs (del inglés *Short Tandem Repeats*). Regiones de ADN con secuencias cortas de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem, es decir, la misma secuencia una tras otra; son codominantes y pueden ser amplificados bajo la técnica de PCR.

**Monomorfismo:** Ausencia de diferentes variantes alélicas para un mismo locus en una muestra poblacional. Se dice que un locus es monomórfico cuando solamente tiene un alelo.

**Núcleo genético:** CT:M, M:CT, TC:M y M:TC generados a partir de las cruces entre líneas parentales de los cultivos de Baja California Sur (C), Tamaulipas (T) y Michoacán (M).

**Número de alelos (Na):** Número de alelos que se encuentran presentes en una población.

**Número efectivo de alelos (Ne):** Número de alelos que en igual frecuencia resultarían en la misma homocigosidad que el número de alelos observados.

**Oligonucleótido o Cebador:** Hebra (alrededor de 20 pb) que se alinea (homóloga) para iniciar la replicación del ADN mediante una polimerasa. Se requieren dos (uno para cada hebra de ADN), los cuales flanquearán la región por amplificar.

**Parental:** En genética, se denomina al progenitor o a los progenitores de una prole, esto es, al individuo o a los individuos cuya reproducción, ya sea sexual o asexual, provoca la transmisión de una herencia genética.

**PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction):** Técnica de biología molecular cuyo objetivo es la obtención de un gran número de copias de un fragmento de ADN particular.

**Pie de cría:** Todos los individuos de la F1 y F2 de *C. quadricarinatus*.

**Población:** Grupo de organismos de la misma especie que habitan en un área geográfica restringida y que tienen la capacidad de reproducirse con cualquier otro miembro de dicho grupo.

**Polimorfismo:** Presencia de diferentes variantes alélicas para un mismo locus en una muestra poblacional. Se dice que un locus es polimórfico cuando presenta al menos dos alelos, y específicamente para microsatélites un locus de moderado a elevado polimorfismo puede presentar de 10 a 20 alelos.

**Stock:** Es una unidad aislada reproductiva y genéticamente diferenciada de otras, en donde unos cuantos migrantes por generación son suficientes para evitar la diferenciación genética.

**UPGMA (del inglés *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*):** Método que mide la distancia entre grupos, producto del promedio de todas las distancias entre pares de cada una de las combinaciones. Construye los árboles o dendrogramas mediante sucesivos agrupamientos bajo el criterio del promedio de la distancia de cada par. Se caracteriza porque supone una tasa constante de cambios evolutivos, es decir, supone la existencia de un reloj evolutivo y los árboles son rotados.

**Variabilidad o diversidad genética:** Se refiere a la variación en el material genético de una población o especie, e incluye los genomas de tipo nuclear y mitocondrial. La variabilidad genética nueva puede estar causada por mutaciones y recombinaciones. Los procesos que eliminan variabilidad genética son la selección natural, la deriva genética y cuellos de botella.

## Resumen

El acocil *Cherax quadricarinatus*, conocido como langosta de agua dulce de quejas rojas, es fisiológicamente robusto, con ciclos reproductivos simples, sin estadios larvales libres y alcanza la madurez sexual entre seis y nueve meses. Estas características le otorgan un gran potencial para la acuicultura comercial. El reabastecimiento de reproductores en la industria se realiza directamente de estanques de engorda, lo que propicia la pérdida de variabilidad genética por endogamia. El objetivo fue evaluar la variabilidad genética de un pie de cría de *C. quadricarinatus* en desarrollo, obtenido mediante la cruce entre parentales de diferentes regiones: Baja California Sur en CIBNOR (C), Tamaulipas (T) y Michoacán (M). Se tomaron muestras de pléopodo a los parentales (F0), grupos control, F1 y F2 para la extracción de ADN. Se estandarizaron 12 microsatélites mediante PCR cambiando a una temperatura óptima de alineamiento. Los resultados de variabilidad genética el pie de cría mostraron un total de 80 alelos diferentes, donde número de alelos ( $N_a$ ) fue de 4.42 (CT y M:CT) a 4.83 (TC y M:TC), mientras que el número de alelos efectivos ( $N_e$ ) fue de 2.67 (TC:M) a 3.31 (TC). La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) osciló entre 0.613 (TC:M) a 0.709 (CT), siendo mayor a la esperada ( $H_e$ ) que fue de 0.556 (TC:M) a 0.631 (CT), lo que indica exceso de heterocigotos. La cruce entre parentales de diferentes regiones de cultivo incrementó la variabilidad genética del pie de cría, sin indicios de endogamia. Los valores de  $F_{ST}$  por pares fueron estadísticamente significativos, donde la diferenciación más alta fue de 14% entre los parentales de Baja California Sur y Michoacán, sin la presencia de deriva genética. El análisis de agrupamiento bayesiano reveló la presencia de tres poblaciones diferentes. Las estimaciones de parentesco mostraron que la mayoría de los individuos son no relacionados (UR), mientras que en los grupos del núcleo genético son medios hermanos (HS).

**Palabras clave:** Microsatélites, mejoramiento genético, *Cherax quadricarinatus*, langosta de agua dulce, acuicultura.

## **Abstract**

The crayfish *Cherax quadricarinatus*, known as freshwater lobster of red claw, is physiologically robust, with simple reproductive cycles, without free larval stages and reaches sexual maturity between six and nine months. These characteristics give it great potential for commercial aquaculture. The replenishment of breeding stock in the industry is done directly from grow out ponds, which leads to the loss of genetic variability due to inbreeding. The objective was to evaluate the genetic variability of *Cherax quadricarinatus* nucleus-stock in development, obtained by crossing between parental of different regions: Baja California Sur in CIBNOR (C), Tamaulipas (T) and Michoacán (M). Pléopod samples were taken from the parental (F0), control groups, F1 and F2 for DNA extraction. 12 microsatellites are standardized by PCR, changing to an optimal alignment temperature. The results of the genetic variability in nucleus-stock showed a total of 80 different alleles, where the number of alleles was 4.42 (CT and M:CT) to 4.83 (TC and M:TC), while the number of effective alleles ( $N_e$ ) was 2.67 (TC:M) to 3.31 (TC). The heterozygosity observed ( $H_o$ ) ranged from 0.613 (TC:M) to 0.709 (CT), being higher than the expected ( $H_e$ ) that was 0.556 (TC:M) to 0.631 (CT), which indicates heterozygotes excess. The crossing between parental of different regions increased the genetic variability in nucleus-stock, without signs of inbreeding. Pairwise  $F_{ST}$  values were statistically significant, where the highest differentiation was 14 % between the parental of Baja California Sur and Michoacán, without the presence of genetic drift. Bayesian clustering method revealed the presence of three different populations. The kinship estimates showed most of the individuals are unrelated (UR), whereas in the M parental and the groups of the genetic nucleus are half siblings (HS).

**Keywords:** Microsatellites, genetic improvement, *Cherax quadricarinatus*, Redclaw freshwater crayfish, aquaculture.

## Contenido

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>I</b>
<b>Glosario</b> .....	<b>III</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>X</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>XV</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>4</b>
2.1. Generalidades de la especie.....	4
2.2. Programas de selección genética .....	5
2.2.2 Microsatélites desarrollados para <i>C. quadricarinatus</i> .....	6
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>10</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
6.1. Conformación del pie de cría de <i>C. quadricarinatus</i> .....	12
6.2. Condiciones de cultivo de <i>C. quadricarinatus</i> .....	13
6.3. Extracción de ADN.....	14
6.4. Estandarización de los microsatélites de <i>C. quadricarinatus</i> .....	15
6.5. Análisis de datos de <i>C. quadricarinatus</i> a partir de los loci microsatélites .....	16
6.5.1. Estandarización los microsatélites desarrollados para <i>C.</i> <i>quadricarinatus</i> de los microsatélites .....	16

6.5.2. Análisis la variabilidad genética de los parentales, grupos control, F1 y el núcleo genético (F2) de <i>C. quadricarinatus</i> .....	16
6.5.3. Determinación de estructura genética y diferenciación entre los grupos formados por los parentales, F1 y núcleo genético (F2) de <i>C. quadricarinatus</i> .....	17
6.5.4. Determinación de la relación de parentesco entre los individuos y grupos (parentales, F1 y F2).....	17
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
7.1. Estandarizaron de los microsatélites desarrollados para <i>C. quadricarinatus</i> .....	19
7.2. Análisis la variabilidad genética de los parentales, grupos control, F1 y el núcleo genético (F2) de <i>C. quadricarinatus</i> .....	22
7.3. Determinación de estructura genética y diferenciación entre los grupos formados por los parentales, F1 y núcleo genético (F2) de <i>C. quadricarinatus</i> .....	25
7.4. Estimación de las relaciones de parentesco entre los individuos de los grupos parentales, F1 y núcleo genético (F2) de <i>C. quadricarinatus</i> .....	29
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
8.1. Estandarización los microsatélites desarrollados para <i>C. quadricarinatus</i> .....	31
8.2. Análisis la variabilidad genética de los parentales, grupos control, F1 y el núcleo genético (F2) de <i>C. quadricarinatus</i> .....	32
8.3. Determinación de estructura genética y diferenciación entre los grupos formados por los parentales, F1 y núcleo genético (F2) de <i>C. quadricarinatus</i> .....	34
8.4. Estimación de las relaciones de parentesco entre los individuos de los grupos parentales, F1 y núcleo genético (F2) de <i>C. quadricarinatus</i> .....	35

<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>10. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>39</b>
<b>11. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>48</b>
Anexo 1. Extracción de ADN (Método fenol-cloroformo) .....	48
Anexo 2. Variabilidad genética <i>C. quadricarinatus</i> por locus .....	49
Anexo 3. Frecuencias alélicas <i>C. quadricarinatus</i> por locus.....	54

## Índice de figuras

<b>Figura I.</b> Desarrollo del pie de cría de <i>C. quadricarinatus</i> a partir de las cruzas entre parentales de Baja California Sur (C), Tamaulipas (T) y Michoacán (M). Parentales en color azul (C, T, M). F1 (TC, CT) en color amarillo. F2 (M:CT, CT:M, M:TC, TC:M) cruzas de las tres regiones “núcleo genético” en color verde.....	12
<b>Figura II.</b> Esquema de cruzamiento entre hembra y macho para formar las familias de <i>C. quadricarinatus</i> . Entre paréntesis: el número de familias por grupo. ....	13
<b>Figura III.</b> Loci microsatélites de <i>C. quadricarinatus</i> amplificados por PCR en agarosa al 1%. ....	19
<b>Figura IV.</b> Loci microsatélites de <i>C. quadricarinatus</i> amplificados por PCR a diferentes temperaturas de alineamiento en gel de agarosa al 1%......	20
<b>Figura V.</b> Dendrograma UPGMA del pie de cría de <i>C. quadricarinatus</i> basado en las distancias genéticas de Nei (1972).....	27
<b>Figura VI.</b> Número de poblaciones de <i>C. quadricarinatus</i> inferidas a partir del cálculo de Delta K.....	28
<b>Figura VII.</b> Estructura genética (K= 3) del pie de cría de <i>C. quadricarinatus</i> . A) Se muestran los nueve clústeres conformado por los grupos de parentales (C,T y M), F1 (CT y TC) y Núcleo genético (CT:M, M:CT, TC:M y M:TC). B) Los tres clústeres inferidos a partir del cálculo de Delta K. ....	28

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Condiciones de PCR en cada locus establecidas en muestras de referencia de <i>C. quadricarinatus</i> . .....	21
<b>Tabla 2.</b> Estadística descriptiva de los 12 loci microsatélites en el pie de cría de <i>C. quadricarinatus</i> . .....	22
<b>Tabla 3.</b> Variabilidad genética multilocus de parentales, grupos control y el pie de cría de <i>C. quadricarinatus</i> . .....	23
<b>Tabla 4.</b> Alelos únicos en los grupos de parentales, grupos control y el pie de cría de <i>C. quadricarinatus</i> . .....	24
<b>Tabla 5.</b> Análisis de varianza Molecular (AMOVA) multilocus de <i>C. quadricarinatus</i> .....	25
<b>Tabla 6.</b> Valores de FST entre grupos parentales y los grupos del pie de cría de <i>C. quadricarinatus</i> . .....	26
<b>Tabla 7.</b> Estimaciones de parentesco promedio de individuos por grupo de <i>C. quadricarinatus</i> . .....	29
<b>Tabla 8.</b> Resumen de parentesco de individuos de <i>C. quadricarinatus</i> por grupo.30	

## 1. INTRODUCCIÓN

*Cherax quadricarinatus*, conocida también como Redclaw o langosta de agua dulce de quejas rojas, fue introducida en México por el Gobierno Federal a principios de los 90's, con fines de investigación. En 1998 con apoyo de CIBNOR y la granja de Acuacultivos Santo Domingo en Tamaulipas se introdujo la especie para cultivo. Esta especie tiene características que facilitan su cultivo como ciclos reproductivos simples (puede desovar hasta cinco veces en un año), lo que puede constituir una ventaja competitiva en programas de selección genética (Villarreal & Peláez, 1999; García-Guerrero *et al.*, 2003) y se ha demostrado una alta respuesta a la selección para crecimiento rápido, con ganancias de alrededor de 10% por generación (Jones *et al.*, 2000).

En CIBNOR se ha realizado investigación donde se optimizó el cultivo de *Cherax quadricarinatus*, reduciendo el factor de conversión alimenticia a 1, eliminando el recambio de agua y reduciendo la aeración en un 50%, logrando rendimientos de 5,000 k/ha en ciclos de seis meses, generando las bases para una tecnología de cultivo más eficiente. Los sistemas de cultivo con poco o sin recambio de agua permiten incrementar la bioseguridad del sistema. Adicionalmente, se obtuvo una reducción en los costos de producción haciendo más rentable su cultivo (Naranjo *et al.*, 2000; Naranjo-Páramo, 2009; Núñez-Amao *et al.*, 2018)

Para la sostenibilidad del cultivo a largo plazo es importante realizar un plan detallado para comenzar un programa de mejoramiento selectivo. Este debe contener una descripción de la formación de la población fundadora, el objetivo de la reproducción y también estudiar su comercialización (Gjedrem *et al.*, 2012). Para ello, recientemente se ha evaluado el crecimiento de la especie en cultivo a cielo abierto, demostrando la viabilidad del cultivo mono sexual. También muestra que el enfoque estocástico utilizado para analizar la dinámica de producción para los intervalos de tamaño comercial de 40–60 g, 61–90 g y mayor 90 g, es una herramienta importante para evaluar el impacto de las clases de tamaño en la producción total y los rendimientos comerciales (Naranjo-Páramo *et al.*, 2018). Por otro lado, se estimaron los costos y los factores de riesgo para la producción en

cultivo comercial con enfoque bioeconómico de *Cherax quadricarinatus* en una granja ubicada en Baja California Sur, México. El análisis bioeconómico contribuye significativamente al establecimiento de la viabilidad económica del sistema de producción intensivo de tres fases (Núñez-Amao *et al.*, 2018) .

Se ha demostrado que la mejora genética de la tasa de crecimiento, la supervivencia y la eficiencia de conversión de alimento reducen los requisitos de espacio, agua y alimento, y podrían tener un gran efecto en la producción mundial de acuicultura si se adoptan ampliamente. La mejora genética también reduce los costos de producción ya que se pueden cultivar más animales utilizando los mismos recursos. Por lo tanto, la cría selectiva en acuicultura debe jugar un papel importante para satisfacer la creciente demanda mundial de proteína animal. Para mejorar el desarrollo sostenible de la producción futura de acuicultura es necesario aumentar la cantidad y la eficiencia de los programas de cría selectiva (Gjedrem *et al.*, 2012).

La mejora sostenida requiere un manejo adecuado de los reproductores, ya que prácticas de cruzamiento genético deficientes, incluidos el parentesco entre parejas de reproductores o un número pequeño de éstos, pueden erosionar rápidamente los niveles de variabilidad genética en el stock en cautiverio, representando una amenaza importante para el éxito a largo plazo de cualquier cultivo comercial (Lymbery, 2000; Doyle *et al.*, 2001).

Las estrategias de apareamiento en los programas de conservación de variabilidad genética requieren el conocimiento de la relación de las parejas potenciales. La relación refleja la historia compartida de miembros de la misma familia o la misma población, afectando a todos los caracteres que tienen un componente genético. Los estudios de relación se expresan en términos de probabilidades de que los conjuntos de genes hayan descendido de un único gen ancestral, es decir, la probabilidad de que sean idénticos por descendencia (Csilléry *et al.*, 2006).

La aplicación de estimadores de parentesco puede proporcionar herramientas útiles para el manejo de los reproductores en diferentes escenarios de acuicultura. Para aumentar la precisión sin aumentar el costo del análisis, es crucial la selección de microsatélites altamente polimórficos (Pino-Querido *et al.*, 2010).

Actualmente se utilizan los microsatélites en el análisis de la relación, desde los genotipos hasta las inferencias sobre parentesco. Conocer la identidad por descendencia es crucial para medir la relación y anticipar el progreso futuro para evitar cruzas de individuos consanguíneos (Weir *et al.*, 2006).

En el presente estudio se realizó la estandarización 12 loci microsatélites desarrollados para *C. quadricarinatus* para el el análisis de la variabilidad genética del pie de cría, la estructura genética y relación de parentesco entre los parentales, F1 y F2. Considerando que los cultivos provienen de una misma población de Australia (introducidos hace más de 20 años a México) y que al ser distribuidos a diferentes regiones (con condiciones ambientales y de cultivo distintas), hayan divergido entre sí (conservados alelos diferentes). Se espera que la cruce entre parentales de Baja California Sur (C), Tamaulipas y Michoacán (M) aporte variabilidad genética al pie de cría.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Generalidades de la especie**

*Cherax quadricarinatus* es un acocil nativo del noroeste de Australia donde se cultiva desde 1985 (Masser *et al.*, 1997). También se considera nativa en el Sureste de Nueva Guinea, donde habita en ríos interiores, cuerpos de agua como lagos, presas y en corrientes de zonas costeras bajas (Curtis & Jones, 1995). Es un consumidor omnívoro oportunista, que se alimenta de materia orgánica, tanto de animales, vegetales (frescos o en descomposición) y tolera un amplio intervalo de temperatura que va de 23 a 31 °C (King, 1994).

El color del exoesqueleto es generalmente verdeazulado. Se diferencia de otras especies del mismo género ya que en los machos se presenta una membrana descalcificada de color rojo en la parte externa de la quela, de esta se deriva su nombre común, langosta de quelas rojas (Redclaw). Las diferencias morfológicas entre hembras y machos son fácilmente distinguibles, ya que la quela del macho adulto puede tener un peso 20 gramos mayor que en las hembras. En la langosta, el abdomen contiene una gran proporción del total del músculo disponible, que alcanza un 30% de su peso ( Masser & Rouse, 1997)

Redclaw se considerada como un buen prospecto para la acuicultura comercial por los atributos que presenta. Es fisiológicamente robusta, tiene un ciclo reproductivo simple, sin estadios larvales libres y alcanza la madurez sexual entre seis y nueve meses de edad. Puede pesar entre 50-100 g al final del primer año, y alcanzar 600 g de peso entre los cuatro y cinco años (Villarreal & Peláez, 1999). Su cultivo requiere de agua con niveles de dureza superiores a 150 mg L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, pH entre 7 y 8.5 y una saturación de oxígeno superior a 4 mg L<sup>-1</sup> (Naranjo *et al.*, 2000). Esta capacidad adaptativa la hace un candidato ideal para su cultivo en diversas regiones en México, representando una alternativa para la diversificación de la producción acuícola.

## **2.2. Programas de selección genética**

La implementación de programas de selección genética a una escala más amplia en la acuicultura ha sido lenta. Esto a pesar de los grandes avances que se han demostrado en varias especies mediante la selección de reproductores, donde se han logrado avances significativos en la tasa de crecimiento alcanzado como, por ejemplo, incrementos de 350% en cultivos de tilapia *Oreochromis niloticus* (Eknath *et al.*, 2007), 250% en salmón (Gjedrem, 2000; Quinton *et al.*, 2005; Gjedrem *et al.*, 2012) y 200% en camarón (Gitterle *et al.*, 2005; Hayes *et al.*, 2010).

La capacidad reproductiva, por otro lado, también ha sido estudiada en crustáceos. Sin embargo, menos del 10% de la producción mundial de acuicultura se basa en existencias mejoradas (Gjerde & Rye, 2010).

McPhee *et al.*, (2004) seleccionaron dos líneas de cultivo de Redclaw, una línea para aumentar el peso de la cosecha a los 9 meses y la otra se mantuvo como un control no seleccionado) que se mantuvieron durante cuatro generaciones. Las líneas se subdividieron en cohortes seleccionando el mayor peso de cosecha. La selección aumentó el caparazón y el largo de la cola de las hembras en relación con su peso corporal.

### **2.2.1. Marcadores moleculares**

Desde la aparición de la PCR se han desarrollado una serie de técnicas utilizadas para los estudios de variabilidad genética. Entre estas técnicas se cita el uso de los marcadores genéticos, la cual se basa en la clonación y secuenciación de fragmentos de ADN, mientras que otros, más aleatorios, se basan en la detección de polimorfismos al azar (*finger print markers* o huellas digitales moleculares) (Dodgson *et al.*, 1997).

Los marcadores moleculares más utilizados en genética de poblaciones son los SNP (polimorfismo de base única). Es un tipo de polimorfismo que corresponde a la diferencia en una simple posición nucleotídica, como lo son las sustituciones, deleciones o inserciones de un solo nucleótido. Son marcadores bialélicos (solamente de dos alelos, donde la máxima heterocigosidad esperada para cada SNP es de solamente 50%) siendo por lo tanto menos informativo que las regiones

satélites de ADN (minisatélites y microsátélites), las cuales generalmente presentan múltiples alelos y sus valores de heterocigosis superan el 70%. Para la construcción de mapas genéticos a partir de SNP son requeridos hasta tres veces más marcadores comparativamente que con los microsátélites (Taillon-Miller *et al.*, 1998).

Los microsátélites son segmentos cortos de ADN de uno a seis pares de bases (pb), que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos. Por sus características estos marcadores son considerados como una poderosa herramienta para estudios genéticos, en comparación con otro tipo de marcadores (minisatélites, RFLPs, RAPDs, etc.). Presentan un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, son codominantes, son fáciles de medir y analizar, son repetitivos y automatizables. Estos marcadores se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma y distribuidos uniformemente (Schlötterer & Goldstein, 1999).

El uso de microsátélites ha contribuido a innovar los procesos de determinación de variabilidad genética en varias especies domesticadas como pollos, ganado vacuno, cerdos, cabras, ovejas, langostinos y peces (Kemp *et al.*, 2009). Además, los microsátélites han permitido proveer una amplia cantidad de información referente al polimorfismo para el mapeo genético (Cheng *et al.*, 2009).

### **2.2.2 Microsátélites desarrollados para *C. quadricarinatus***

Baker *et al.*, (2000) caracterizaron siete loci microsátélites desarrollados para Redclaw para evaluar los niveles y patrones de diversidad genética tanto en poblaciones silvestres como cultivadas en Australia, además se probó su amplificación en otras especies de *Cherax* estrechamente relacionadas.

Baker, (2005) evaluó cuatro poblaciones de cultivos australianos y tres de *C. quadricarinatus* de ultramar. Se observaron niveles relativamente altos de variabilidad genética, probablemente debido a la mezcla intencional de cepas de Redclaw de ríos para la producción del primer stock comercial. Las estimaciones de

diferenciación genética entre los organismos en cultivo y las pruebas de asignación indicaron que los cultivos en el extranjero se derivan muy probablemente del primer stock de cultivos comerciales desarrollado en Australia por “*Freshwater Australian Crayfish Traders*”, que luego se difundieron ampliamente a nivel local en Queensland, nacional en Australia e internacionalmente (Humberto Villarreal, comunicación personal, 2018). La asignación de los stocks a sus orígenes silvestres indicó que todos los stocks de los cultivos de *C. quadricarinatus* muestreados poseen alelos que pertenecen al río Flinders, de Queensland.

Baker *et al.*, (2008) señaló que gran divergencia de la especie Redclaw en Australia del Este con la población del Oeste fue evidente en los datos obtenidos. La falla de cuatro loci de microsatélites (desarrollados a partir de un individuo de Australia del Este) para amplificarse en las muestras del Noroeste indicó que los linajes probablemente han sido evolucionando independientemente por un tiempo considerable. Además, el flujo de genes entre las dos formas fue insignificante o ausente. Los individuos muestreados de los 12 sitios constituían poblaciones independientes, que junto con las estimaciones de FST por pares altamente significativas determinaron que el flujo de genes entre los sitios es limitado.

Jones *et al.*, (2000) implementaron un programa experimental de reproducción selectiva para *C. quadricarinatus* en el Centro de Acuicultura y Acuicultura de Agua Dulce (QDPI) en Australia. Los reproductores fueron elegidos de las cinco cuencas principales en la base del Golfo de Carpentaria. De este a oeste, incluyendo stocks de los ríos Mitchell, Gilbert, Flinders, Leichhardt y Gregory. Los stocks de los ríos Flinders y Gilbert se eligieron para desarrollar una línea de cultivo “Walkamin”. La selección familiar subsiguiente combinada con la línea de cultivo “Walkamin” presentó una mejora significativa en la tasa de crecimiento (~ 9.5%) en comparación con los cultivos existentes. Los resultados mostraron que Redclaw responde bien a los programas de selección genética.

Stevenson, (2013) evaluó la línea mejorada “Walkamin” en condiciones de cultivo comercial, ya que los niveles de variación genética en cultivos eran desconocidas, pero se consideraba que probablemente fueran deficientes. Los organismos de

cultivos presentaron una heterocigosidad observada mayor a la esperada. Además, no hubo endogamia en ninguna de las líneas cultivadas. La auditoría de la variabilidad genética demostró que las poblaciones de Redclaw cultivadas exhibieron niveles moderados de diversidad alélica, con todos los loci, excepto el CQU004 que mostró un mínimo de dos alelos en las granjas (Bonnie Glen y Jennings).

He *et al.*, (2012) evaluaron genéticamente tres líneas de cultivo de Redclaw de ubicaciones geográficas diferentes (Xiamen en la provincia de Fujian, Guangzhou en la provincia de Guangdong y Chongming en Shanghai) en China, utilizando 28 loci microsatélites que fueron aislados y caracterizados para analizar los niveles de variabilidad genética (Xie *et al.*, 2010; He, 2012). Los resultados indicaron que las tres poblaciones han retenido cierta diversidad genética en relación con las poblaciones silvestres en Australia, y que los tres cultivos mostraron que habían divergido entre sí. La pérdida de variabilidad genética puede ser debido al aislamiento de las poblaciones, un aumento en la endogamia entre los individuos cultivados y una disminución en la eficiencia biológica (*fitness*) de la población.

Valencia (2014) realizó estimaciones de variabilidad genética en tres generaciones de cultivo (G11, G12 y G13) en CIBNOR el cultivo de Baja California Sur utilizando seis loci microsatélites desarrollados para *C. quadricarinatus* (Baker *et al.*, 2000). Los resultados mostraron una disminución de heterocigosidad observada respecto a la heterocigosidad esperada el cultivo de Baja California, presentando un aumento de endogamia con el paso de las generaciones.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Existe una creciente preocupación sobre la potencial disminución en la talla de cosecha y el rendimiento en la producción de *C. quadricarinatus*, por la práctica común en la industria de reabastecimiento de reproductores directamente de los estanques de engorda. Una reproducción de este tipo daría lugar inadvertidamente a un alto grado de endogamia. A medida que los cultivos se vuelven más y más consanguíneos, la productividad a menudo disminuye (Charlesworth & Willis, 2009).

En términos biológicos, las especies que pueden mantener su diversidad genética tienen una mejor expectativa de respuesta ante cambios en condiciones ambientales, nuevas enfermedades o presiones en el cultivo por ajustes a las demandas del mercado. La diversidad genética de la población es esencial para maximizar el potencial de mejora, por lo que es deseable el desarrollo de un pie de cría con diversos atributos genéticos (Toro & Caballero, 2005; Piñero *et al.*, 2008)

Una de las estrategias que se ha utilizado para incrementar la variabilidad genética de un grupo de organismos cultivados, es la cruce entre líneas genéticamente diferenciadas, lo que permite explotar la heterosis en la progenie de las cruces (Gjedrem, 2010). El pie de cría de pool ampliado puede utilizarse para el inicio de un programa de mejoramiento genético donde se obtengan mejores rendimientos en el cultivo, se proporcione a la especie una mejor capacidad de respuesta a enfermedades y a cambios en las condiciones ambientales.

Para mantener o aumentar la variabilidad genética del pie de cría es necesario llevar a cabo un seguimiento realizando estimaciones de relación en los cultivos para el monitoreo de la diversidad y la trazabilidad del cultivo definiendo las cruces entre parentales no relacionados (Pino-Querido *et al.*, 2010).

#### **4. HIPÓTESIS**

El cruzamiento entre parentales de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* provenientes de cultivos de Baja California Sur, Tamaulipas y Michoacán incrementará los niveles de variabilidad genética del pie de cría.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo General**

Evaluar la variabilidad genética de un pie de cría de *Cherax quadricarinatus* en desarrollo.

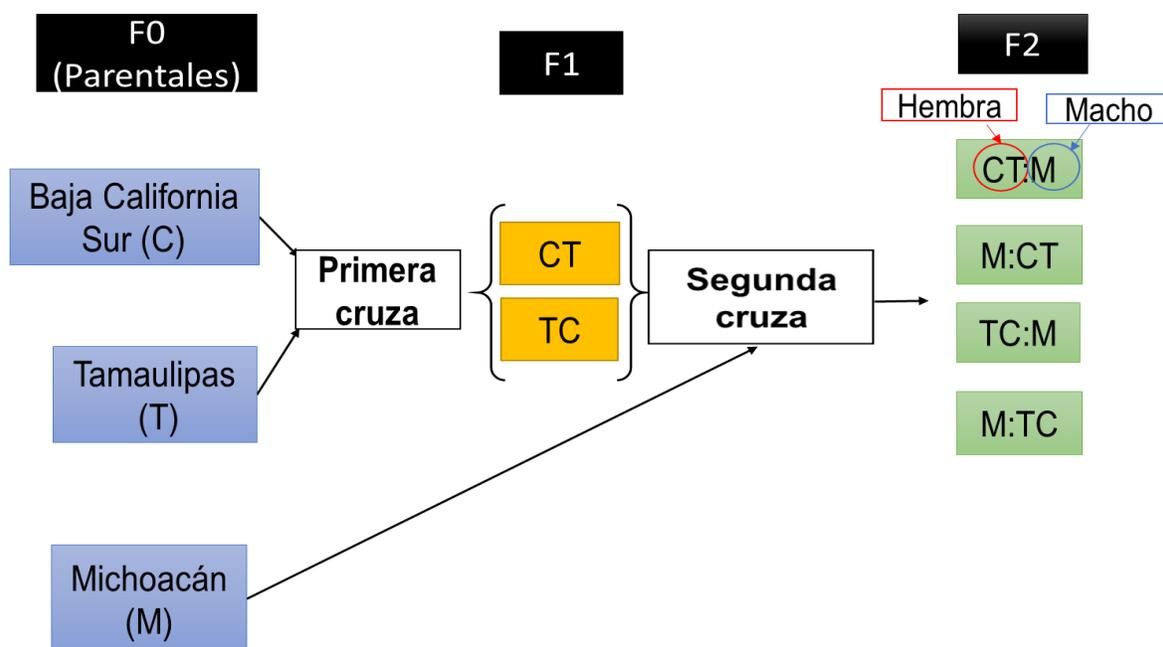
### **5.2. Objetivos específicos**

1. Estandarizar los microsatélites desarrollados para *C. quadricarinatus*.
2. Analizar la variabilidad genética de los parentales, grupos control, F1 y el núcleo genético (F2).
3. Determinar si existe estructura genética y diferenciación entre los grupos formados por los parentales, F1 y núcleo genético (F2).
4. Estimar las relaciones de parentesco entre los individuos de los grupos parentales, F1 y núcleo genético (F2).

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Conformación del pie de cría de *C. quadricarinatus*

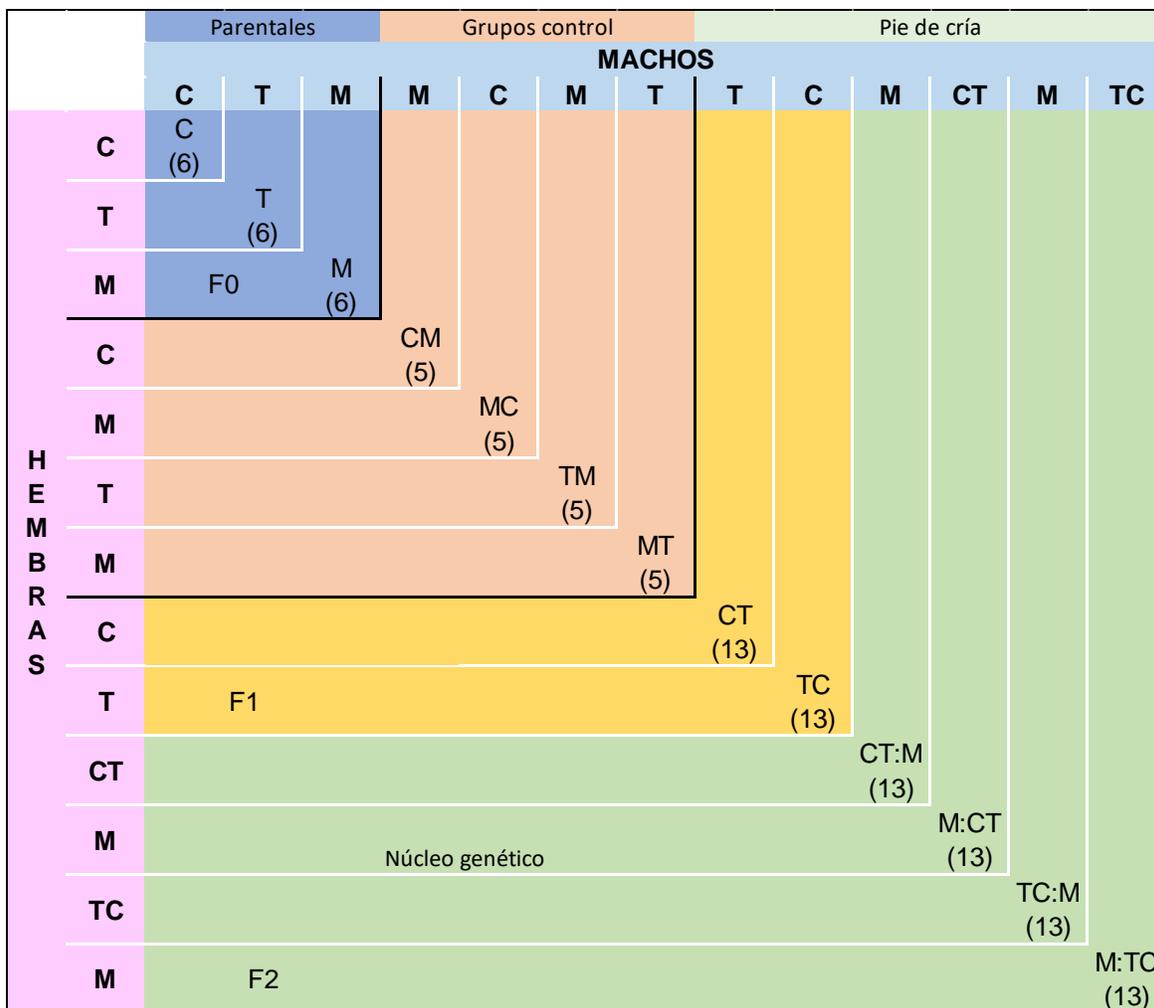
A partir de los resultados presentados por Valencia (2014) se estableció el grupo que presentaba las mejores características para cruzamiento entre parentales procedentes de Baja California Sur en CIBNOR, Tamaulipas (granja El Vergel) y Michoacán. El pie de cría se conformó con una primera cruce entre los parentales Baja California Sur (C) y Tamaulipas (T) dando lugar a la F1 (CT y TC). Para la segunda cruce, los individuos de F1 (CT y TC) fueron cruzados con parentales de Michoacán (M) generando la F2 (CT:M, M:CT, TC:M y M:TC). Los individuos de F2 constituyen el núcleo genético resultado de las cruces entre los parentales de las tres regiones como se muestra Figura I.



**Figura I.** Desarrollo del pie de cría de *C. quadricarinatus* a partir de las cruces entre parentales de Baja California Sur (C), Tamaulipas (T) y Michoacán (M). Parentales en color azul (C, T, M). F1 (TC, CT) en color amarillo. F2 (M:CT, CT:M, M:TC, TC:M) cruces de las tres regiones "núcleo genético" en color verde.

Cada grupo se integró con 13 familias (parejas) de CT (una hembra de C y un macho de T) y 13 familias recíprocas TC (una hembra de T y un macho de C). Para la F2 se realizó la segunda cruce entre las familias de CT y TC con los parentales de M, obteniendo de igual manera 13 familias en cada uno de los grupos (CT:M, M:CT,

TC:M y M:TC). Los grupos de parentales y grupos control fueron cruza adicionales que se utilizaron para comparar la variabilidad genética con los parentales y el pie de cría como se muestra en la Figura II.



**Figura II.** Esquema de cruzamiento entre hembra y macho para formar las familias de *C. quadricarinatus*. Entre paréntesis: el número de familias por grupo.

## 6.2. Condiciones de cultivo de *C. quadricarinatus*

Las cruza se llevaron a cabo en la nave Innova 1b de BioHelis, el Parque de Innovación Tecnológica de CIBNOR. Se cruzaron 1:1 (Hembra: Macho) por tanque con escondrijos de fondo elaborados con tubo PVC de 3 pulgadas, así como racimos de 10 hojas de malla nylon. La nave cuenta con un sistema de aireación independiente, con *blowers* de 10 HP, distribuidos mediante tubería PVC y válvulas

de control de flujo en cada tanque. Los organismos fueron mantenidos a  $28 \pm 1$  °C. Diariamente se realizó un recambio de agua de 15%, se alimentaron con alimento comercial peletizado (Zeigler) de 35% de proteína cruda y 8% de lípidos, se midieron parámetros de calidad de agua (temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad) y se removieron heces y alimento no consumido.

### **6.3. Extracción de ADN**

Se tomaron muestras de tejido pléopodo de parentales, F1, F2 y grupos control (de 4 a 6 individuos por familia). Las muestras se conservaron en alcohol isoamílico al 80% en tubos de 1.5 ml. Se extrajo ADN genómico de las muestras mediante el kit Wizard® (SV 96 Genomic DNA Purification System) pero la concentración fue baja, debido a que los pléopodos están cubiertos de cutícula, dificultando la digestión enzimática. Por ello, se retiró la capa de cutícula al comienzo y se cambió al método de extracción del ADN de fenol-cloroformo para camarón y langosta (Anexo 1) el cual funcionó mejor (Wasko *et al.*, 2003). Sin embargo, se requiere de mucho tiempo para realizar el procedimiento, volviéndose tedioso cuando hay gran cantidad de muestras, por lo que se optó por realizar las extracciones mediante el método universal de sales para obtención de ADN genómico de alta calidad basado en PCR (Aljanabi & Martinez, 1997). Para esto se retira la cutícula del pléopodo dejando solamente el tejido muscular; este se homogeneizó en 400  $\mu$ l de tampón de sales (NaCl 0.4 M, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 y EDTA 2 mM, pH 8,0) durante 10-15 s. Luego se agregaron 40  $\mu$ l de SDS al 20% (2% de concentración final) y 8  $\mu$ l de 20 mg/ml de proteinasa K (400  $\mu$ g/ml de concentración final). Las muestras se incubaron 55–65 °C durante al menos 1 hora o toda la noche, después se agregaron 300  $\mu$ l de NaCl 6 M f muestras se agitaron en vórtex durante 30 s a la velocidad máxima y los tubos se centrifugaron durante 30 min a 10 000 g. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos. Se añadió un volumen igual de isopropanol a cada muestra y se mezcló hasta homogenizar. Las muestras se incubaron a  $-20$  °C durante 1 h y posteriormente se centrifugaron durante 20 min, 4 °C, a 10 000 g. El sedimento se lavó con etanol al 70%, se secó y finalmente se resuspendió en 100  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O estéril. El ADN genómico extraído de las muestras se visualizó en geles de agarosa al 1%, teñidos con gel red y se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop).

#### 6.4. Estandarización de los microsatélites de *C. quadricarinatus*

Para este estudio se utilizaron los microsatélites caracterizados para *C. quadricarinatus* en Australia y China (Baker *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2010; He, 2012). A todos los cebadores directos (*forward*) de los microsatélites para *C. quadricarinatus* se les añadió el cebador universal M13 en el extremo 5' de para permitir el etiquetado fluorescente. Para el etiquetado fluorescente se utilizó de cebador universal M13 marcado para cada uno de los fluorocromos FAM, VIC, NED y PET (Schuelke, 2000).

Para la estandarización se utilizaron ocho individuos (h3C, m84M, m56CT, m25CT, h4M, h70TC, h38CT, m36C) de C, M, CT y TC como muestras de referencia. El ADN genómico se llevó a una concentración de 50 ng/ml con agua desionizada (miliQ), para ser usado como hebra molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las PCR se realizaron en volúmenes de 11 µl con 15–30 ng de ADN genómico, Buffer 1x, 0.2 mM cada dNTP, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.4-0.5 U de polimerasa Go Taq Flexi (Promega ®), 0.4 µM de cebador M13 marcado según el fluorocromo correspondiente, 0.02 µM del cebador directo con cola M13 y 0.4 µM de cebador inverso (*reverse*). Se usó el protocolo de amplificación de PCR descrito en la caracterización de los microsatélites de *C. quadricarinatus* (Baker *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2010; He, 2012). Sin embargo, no se tuvo éxito en la amplificación en la mayoría de los loci, por lo que se probaron distintas temperaturas de alineamiento incluyendo la técnica de *Touch Down* (donde se usaron gradientes de temperaturas de alineamiento) (Tabla 1). El gradiente de temperatura de la técnica consta de 94 °C durante 5 min, 15 ciclos de 94 °C durante 30 s, 65–50 °C durante 30 s (1 °C disminuyendo cada ciclo), 72 °C durante 30 s, seguido por 40 ciclos a 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 30 s, y una extensión final de 72 °C durante 5 min (Paz-García *et al.*, 2017). Una vez terminada la reacción se realizó una electroforesis de agarosa al 1% (80 V por 50 min) utilizando buffer TAE 1X y Gel RED 10,000 X para teñir los ácidos nucleicos. Los geles fueron analizados en un fotodocumentador de luz UV. Los productos de PCR fueron enviados en placas a la Universidad de Arizona (AU) para la electroforesis en el secuenciador ADN ABI

PRISM 3730XL (Applied Bio-systems) utilizando GeneScan™ 500 LIZ™ como estándar de tamaño.

### **6.5. Análisis de datos de *C. quadricarinatus* a partir de los loci microsatélites**

Los genotipos de los individuos se obtuvieron en el programa GENEMAPPER y se exportaron las tablas para realizar los análisis correspondientes en los siguientes programas.

#### **6.5.1. Estandarización los microsatélites desarrollados para *C. quadricarinatus* de los microsatélites**

CERVUS (versión 3.0.1) se utilizó para evaluar cada locus: número de alelos en el locus (K), número de individuos totales analizados por locus (N), heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), contenido de información polimórfica (PIC), la significancia de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) y la frecuencia de alelos nulos. La corrección de Bonferroni se aplicó cuando se realizaron estas múltiples pruebas (Kalinowski *et al.*, 2007).

#### **6.5.2. Análisis la variabilidad genética de los parentales, grupos control, F1 y el núcleo genético (F2) de *C. quadricarinatus***

Genepop (versión 4.0.5.3) se obtuvieron las estimaciones de variabilidad genética como el número de alelos ( $N_a$ ), número de alelos efectivos ( $N_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), índice de endogamia (FIS) (Rousset, 2008).

### **6.5.3. Determinación de estructura genética y diferenciación entre los grupos formados por los parentales, F1 y núcleo genético (F2) de *C. quadricarinatus***

Arlequín (versión 3.5.2.2) Se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA) y estadísticos F (FST, FIS y FIT). Se estimó la diferenciación genética del pie de cría a partir del análisis de FST el cual correlaciona y mide el grado de diferenciación genética de los grupos por diadas ( Weir & Cockerham, 1984; Holsinger & Weir, 2009; Excoffier & Lischer, 2010).

PHYLIP (versión 3.6) se realizó la construcción de dendrogramas UPGMA (Felsenstein, 1993), a partir de la distancia genética de Nei, (1972) entre los grupos (Felsenstein J, 2004).

Structure (versión 2.3.4) Se midió el grado de estructuración de las líneas parentales, F1 y F2. Este programa busca el número de grupos genéticos más probables (K) dentro del conjunto de datos. Para este trabajo se usaron valores de K desde K=1 hasta K=10 (el número total de grupos fue 9). Los parámetros se usaron de la misma manera para progenitores y progenie con los loci independientes y la posibilidad de mezclas (esta última opción permite que un individuo pueda pertenecer a más de un grupo genético). Se generaron resultados para cada K con 50,000 *burn-in* (forma parte del principio de la búsqueda bayesiana que se desecha) y 200000 Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). Para determinar el mejor K se utilizó la metodología de Evanno *et al.*, (2005) que utiliza el valor de delta K para elegir el mejor número de grupos genéticos en el conjunto de datos y propone usar el K para el cual se logra un mayor delta K. Esta metodología se desarrolló en el programa Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012).

### **6.5.4. Determinación de la relación de parentesco entre los individuos y grupos (parentales, F1 y F2)**

SPAGeDi (versión 1.5) se realizó el análisis a nivel individual, estimando el coeficiente de relación (r) Wang, (2002). Una vez elegida las estadísticas se seleccionó la opción de Jackknife sobre loci, donde los estimadores de Jackknife

promedio y los errores estándar de Jackknife (SE) se calcularon para obtener los promedios multilocus. Se pueden utilizar para obtener intervalos de confianza aproximados utilizando la media  $\pm$  2SE. Las estimaciones del coeficiente de endogamia para cada individuo se dan en el formato de columna para calcular un coeficiente de parentesco entre individuos (los coeficientes de endogamia dados se calculan como coeficiente de parentesco entre copias de genes homólogos dentro del individuo) (Hardy & Vekemans, 2002).

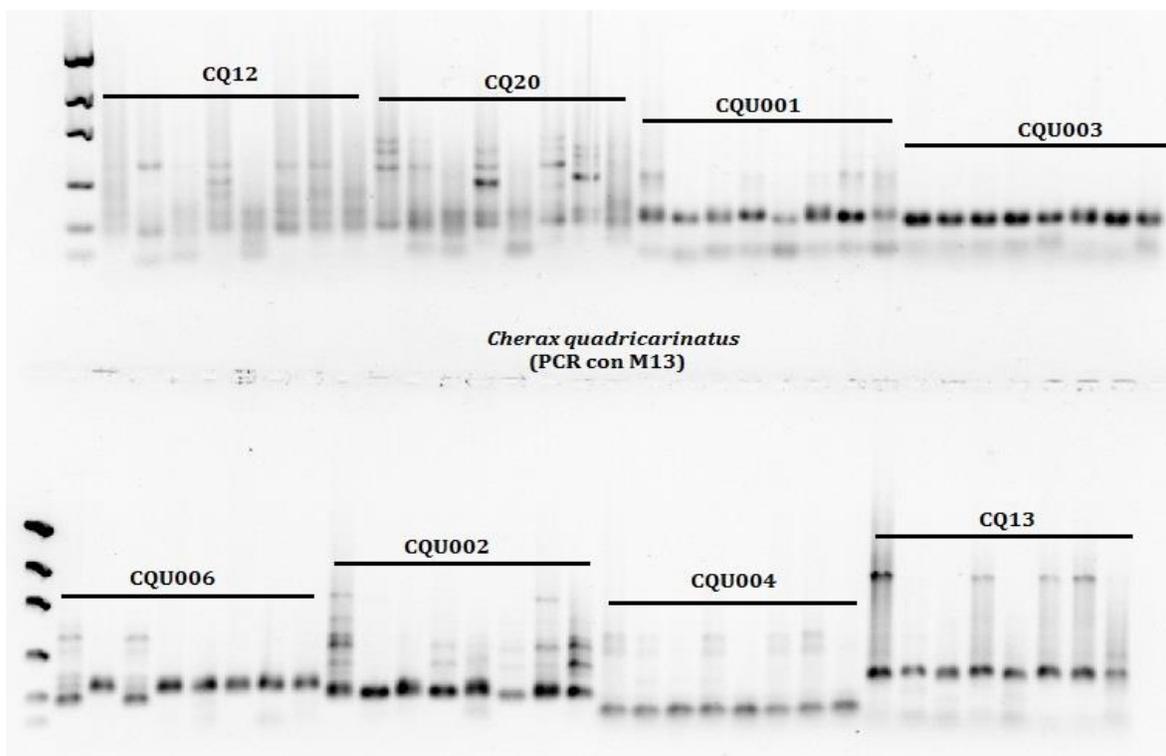
Finalmente utilizando la consola del sistema (C) y con un script detallado (formato pl.) se elaboró la matriz individual, para finalmente obtener las estimaciones de promedios ponderados por grupos (C, T, M, CT, TC, CT:M, M:CT, TC:M Y M:TC) y el resumen de las estimaciones de parentesco de los individuos por grupo.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Estandarizaron de los microsatélites desarrollados para *C. quadricarinatus*

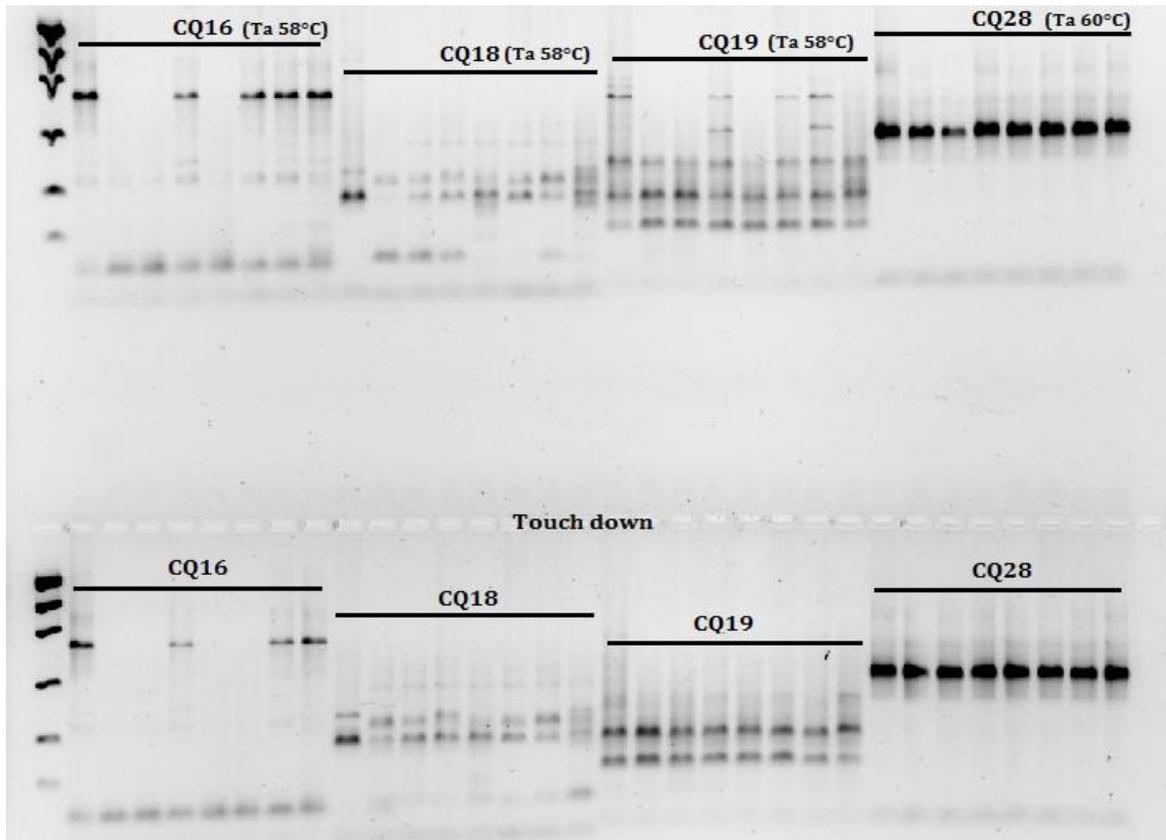
Al comienzo del análisis todos los loci microsatélites se amplificaron a la temperatura de alineamiento descrita por Baker *et al.* (2000), Xie *et al.* (2010) y He (2012). En la gran mayoría de los casos la reacción no se llevó a cabo correctamente, por lo que se optó por evaluar diversas temperaturas con el método de *touch down* (con el fin de que la PCR no fuera tan restrictiva al momento de unión de los cebadores con la hebra molde de ADN).

Los loci Microsatélites CQU.001, CQU.003, CQU.006, amplificaron correctamente en las condiciones señaladas por los autores, mientras que al CQU.002 se le aumentó la temperatura de alineamiento a 57°C para que la PCR fuera más específica, con menor cantidad de picos o *stutters* (Baker *et al.*, 2000). El CQU.004 fue descartado debido a que los cebadores no reconocieron el sitio de unión (Figura III).



**Figura III.** Loci microsatélites de *C. quadricarinatus* amplificados por PCR en agarosa al 1%.

El CQ19 fue descartado, ya que su amplificación fue menor al 80% en las muestras. Los loci microsatélites CQ14 y CQ28 amplificaron en el tamaño en pares de bases (pb) de referencia donde se encontraban los alelos (Figura IV). Sin embargo, no se apreciaba variabilidad al momento de realizar el genotipado en GENEMAPPER, sin una lectura clara en todas las muestras, sin evidencia de herencia mendeliana.



**Figura IV.** Loci microsatélites de *C. quadricarinatus* amplificados por PCR a diferentes temperaturas de alineamiento en gel de agarosa al 1%.

A partir de los ajustes metodológicos, se estandarizaron y genotiparon un total de 12 microsatélites (CQU.001, CQU.002, CQU.003 y CQU.006, CQ2, CQ4, CQ5, CQ9, CQ13, CQ16, CQ17, CQ18) de los cuales cuatro fueron caracterizados por Baker *et al.* (2000) y los ocho microsatélites siguientes por Xie *et al.* (2010) y He (2012). Se establecieron las temperaturas de alineamiento y un fluorocromo específico para cada locus (Tabla 1).

**Tabla 1.** Condiciones de PCR en cada locus establecidas en muestras de referencia de *C. quadricarinatus*.

Locus	Secuencia 5' a 3'	Secuencia M13+flourocromo	Rango alelos	T.A. (°C)
CQU.001	F <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> GCATCATCTGCAAACAAGGATAC R GTGACGGGACCAAGAATATGAAG	FAM	194-206	55
CQU.002	F <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> TGTGTCAGTGTATGCGGTAGCCACG R TGCCGTTCTTCCATAACCTCAGG	NET	178-190	57
CQU.003	F <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> GGGAGAGGGTGGATTTACTACCG R CCATGAGAAATGCTCTGAGACTCG	VIC	177-215	55
CQU.006	F <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> AACTGCCACCAATACTGCAAGC R TTGCTCGGGACACCTTAGAGAGC	NET	218-244	55
CQ2	F <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> TCACCAGGCTTTGAAATAGT R CATTTGCCGTCTTCCATACC	PET	188-232	56
CQ4	F <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> TAGCACCAGAGAGATCAGG R TGGAGCAGGAAAAGTGAG	PET	200-204	56
CQ5	F <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> TAGTAGCGACCAGTGAAGAG R GCGTTGTTTTGACACAGAAG	FAM	196-212	*
CQ9	F <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> CTCCACTATTCTGTTTGCTTTG R GTAGCAATAAGCGAAGAGGC	VIC	175-191	55
CQ13	F <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> TGTGACCCCTTGTCTGTG R GCCCGTCATTCAAGCCAAAG	VIC	255-275	*
CQ16	F <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> GATAAATTTCTTTGCGCGCTG R GTCTTTCCTGAGGATTTGAT	FAM	194-224	58
CQ17	F <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> TCGCAGGCTGAGTTTCTATC R TAGATGTAAATTTGTGCAC	VIC	298-336	56
CQ18	F <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> ATTTCTCCCTGGATGTTAC R TATTCCACTTCTGACGACT	NET	158-164	*

En negritas secuencia M13 Añadida a los cebadores directos (*forward*). \* = Amplificados mediante *Touch down* (Paz-García *et al.*, 2017).

El número de alelos por locus (K) fue de 3-14 en el pie de cría, con una media de alelos por locus de 6.667 y un total de 80 alelos. El número de muestras genotipadas (N) fue de 550 con un 98.39% de éxito de amplificación. La heterocigosidad observada por locus ( $H_o$ ) osciló entre 0.368-0.875, mientras que la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) fue de 0.363-0.835. El locus con el contenido de información polimórfica más bajo fue el CQU.002 (PIC = 0.310), mientras que el más informativo fue el CQ2 (PIC = 0.815). Se presentó desviación al equilibrio Hardy-Weinberg (HW) con un nivel de significancia al 1% solo en el locus CQ2 mientras que para los demás fue del 0.1% y no significativos (NS). La frecuencia de alelos nulos estimada no fue

significativa para ninguno de los loci tras realizar un ajuste secuencial de Bonferroni (Tabla 2).

**Tabla 2.** Estadística descriptiva de los 12 loci microsatélites en el pie de cría de *C. quadricarinatus*.

Locus	K	N	Ho	He	PIC	HW	F(Nulo)
CQU.001	4	545	0.727	0.663	0.589	***	-0.051
CQU.002	5	547	0.378	0.369	0.310	NS	-0.006
CQU.003	6	546	0.502	0.447	0.419	***	-0.081
CQU.006	7	544	0.825	0.694	0.644	***	-0.096
CQ2	12	528	0.875	0.835	0.815	**	-0.027
CQ4	3	545	0.525	0.429	0.337	***	-0.101
CQ5	5	549	0.528	0.537	0.480	NS	0.012
CQ9	6	549	0.368	0.363	0.346	NS	-0.017
CQ13	6	539	0.727	0.790	0.757	***	0.037
CQ16	9	523	0.618	0.684	0.646	***	0.043
CQ17	14	543	0.801	0.778	0.746	NS	-0.017
CQ18	3	536	0.472	0.483	0.406	NS	0.005

Número de alelos en el locus (K), número de individuos totales analizados por locus (N), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), Contenido de información polimórfica (PIC). Se aplicó el ajuste secuencial de Bonferroni para la significancia de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) (NS = no significativo, \* = significativo al 5%, \*\* = significativo al 1%, \*\*\* = significativo al nivel del 0.1%, ND = no realizado) y F (Nulo) = frecuencia de alelos nulos estimada.

## 7.2. Análisis la variabilidad genética de los parentales, grupos control, F1 y el núcleo genético (F2) de *C. quadricarinatus*

Los parentales C fue el grupo con mayor número de alelos promedio multilocus ( $N_a = 5.08$ ), mientras que M fue el grupo parental con menor número de alelos promedio ( $N_a = 3.83$ ). Los grupos del pie de cría el  $N_a$  promedio multilocus osciló entre (4.42 - 4.83). TC, y M:TC presentaron ( $N_a = 4.83$ ), siendo los grupos del pie con el  $N_a$  más alto. Los grupos control mostraron el menor  $N_a$  (3.5 – 3.75) al compararlos con los parentales y el pie de cría. El número total de alelos promedio fue de ( $N_a = 6.42$ ).

TC mostró mayor número de alelos efectivos promedio ( $N_e = 3.31$ ) seguido por C ( $N_e = 3.15$ ). En contraste, los parentales de M presentaron el menor número de alelos efectivos promedio ( $N_e = 2.38$ ), con valores cercanos a M los grupos control.

En el núcleo genético el Ne promedio (2.67 – 2.96) fue menor al comparar con la F1 (3.16 – 3.31).

CT fue el grupo con mayor heterocigosidad observada ( $H_o = 0.709$ ), seguido por CT:M ( $H_o = 0.688$ ). Los valores promedio más altos  $H_o$  fueron en el pie de cría (0.613 – 0.709). C se encuentra dentro de este rango con una heterocigosidad observada ( $H_o = 0.614$ ). En los parentales (T y M) y grupos control la heterocigosidad fue menor, sin embargo, estos valores no representan una baja variabilidad. En todos los grupos la heterocigosidad observada fue mayor a la heterocigosidad esperada (, lo que indica un exceso de heterocigotos (Tabla 3).

El coeficiente de endogamia (FIS) presentó valores significativos para algunos loci como se muestra en Anexos 2. Sin embargo, en el promedio multilocus ningún grupo presentó endogamia, los parentales C (FIS = -0.017) y T (FIS = -0.022) presentaron los valores más cercanos a cero, que es lo que se espera en una población en equilibrio. Todos los valores de FIS fueron negativos lo que refleja el exceso de heterocigotos, en este caso puede ser atribuido al cruzamiento intencional entre las diferentes regiones.

**Tabla 3.** Variabilidad genética multilocus de parentales, grupos control y el pie de cría de *C. quadricarinatus*.

		N	Na	Ne	Ho	He	Fis	
F0 Parentales	C	30	5.08	3.2	0.614	0.604	-0.017	
	T	30	4.33	2.87	0.609	0.596	-0.022	
	M	28	3.83	2.34	0.557	0.514	-0.085	
Grupos control	CM	29	3.67	2.58	0.583	0.516	-0.132	
	MC	30	3.75	2.51	0.562	0.478	-0.180	
	TM	30	3.5	2.63	0.608	0.534	-0.142	
	MT	30	3.67	2.38	0.593	0.516	-0.152	
Pie de cría	F1	CT	26	4.42	3.16	0.709	0.631	-0.127
		TC	26	4.83	3.31	0.637	0.611	-0.044
Pie de cría	F2 Núcleo genético	CT:M	47	4.58	2.96	0.688	0.584	-0.180
		M:CT	45	4.42	2.84	0.614	0.577	-0.064
		TC:M	48	4.58	2.67	0.613	0.556	-0.104
		M:TC	48	4.83	2.79	0.631	0.562	-0.125
		447	6.42	2.99	0.619	0.589	-0.052	

Tamaño de muestra (N), número de alelos (Na), alelos efectivos (Ne), heterocigosidad esperada (He), heterocigosidad observada (Ho) y coeficiente de endogamia (FIS).

Los loci CQU.002 y CQ2 presentaron varios alelos, debido a que solo algunos parentales eran portadores de dichos alelos y estos se transmitieron a grupos específicos. El alelo 188 del locus CQU.002 estaba presente en baja frecuencia en M y TC, aun así, fue heredado al núcleo genético en el grupo M:TC, mientras que el alelo 188 en M no fue transmitido a la siguiente generación.

En el locus CQU.006, el alelo presente en los parentales T fue transmitido a la siguiente generación a los grupos de TM y MT. Lo mismo sucedió con el locus CQ16, donde los alelos de los parentales fueron transmitidos. El locus CQ4 contaba con tres alelos en parentales, sin embargo, uno de ellos no se heredó a las siguientes generaciones (ver gráficas de frecuencias de los alelos por locus de manera detallada en Anexo 3). De manera similar sucedió CQ5 se observó cómo los alelos 196 y 210 no se transmitieron a la siguiente generación, debido a su baja frecuencia.

Los loci CQU.001, CQ13 y CQ18 comparten los mismos alelos para todos los grupos, mientras que los otros nueve loci presentaron 25 alelos únicos (tabla 4). Esto ayudaran a identificar por familia y grupos específicos al momento de realizar nuevas cruza sin necesidad de marcaje con elastómeros o mantenerlos aislados por familias.

**Tabla 4.** Alelos únicos en los grupos de parentales, grupos control y el pie de cría de *C. quadricarinatus*.

	C	T	M	CM	MC	TM	MT	CT	TC	CT:M	M:CT	TC:M	M:TC	Total Alelos por locus
CQU.001														
CQU.002	1	1										1		3
CQU.003			1							1	1			3
CQU.006		1				1	1							3
CQ2											1			1
CQ4			1											1
CQ5			1					1						2
CQ9									1		1			2
CQ13														0
CQ16		2				1	1		1			1		6
CQ17	2								1	1				4
CQ18														
Total	3	4	3	0	0	2	2	1	3	2	3	2	0	25

### 7.3. Determinación de estructura genética y diferenciación entre los grupos formados por los parentales, F1 y núcleo genético (F2) de *C. quadricarinatus*

El valor de P fue estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ; 10000 permutaciones) en FST, con diferencias del 5.64% entre los grupos. Sin embargo, el valor de P no fue significativo entre los individuos dentro de los grupos, ni de los individuos dentro de la población (Tabla 5). Los estadísticos FIS y FIT presentaron valores negativos, que están relacionados con el exceso de heterocigotos, lo cual implica que la falta de estructura y diferenciación genética entre los individuos dentro de los grupos; y de los individuos dentro de la población total (integrada por los nueve grupos supuestos).

**Tabla 5.** Análisis de varianza Molecular (AMOVA) multilocus de *C. quadricarinatus*

Fuente de variación	Varianza	%	Estadístico F	Valor de P
Entre los grupos	0.198	5.64	FST= 0.056	0.000
Entre individuos dentro de los grupos	-0.381	-10.85	FIS=-0.115	1.000
Individuos dentro de la población	3.693	105.21	FIT=-0.052	1.000

Grupos supuestos: C, T, M, CT, TC, CT:M, M:CT, TC:M y M:TC

Los valores FST fueron estadísticamente significativos en todas las diadas como se muestra por encima de la diagonal. La diferenciación genética de FST fue moderada. Las diadas con más diferenciación fueron entre los parentales de C y M con 14 %, esto era de esperarse debido a que los parentales eran procedentes de diferentes regiones de cultivo. Los parentales M y TC con 10.95 %, mientras que los valores más bajos de diferenciación fueron en las diadas de CT:M y M:CT con 1.4 %, y entre TC:M y M:TC con 1.1 % como se muestra en los valores por debajo de la diagonal (Tabla 7).

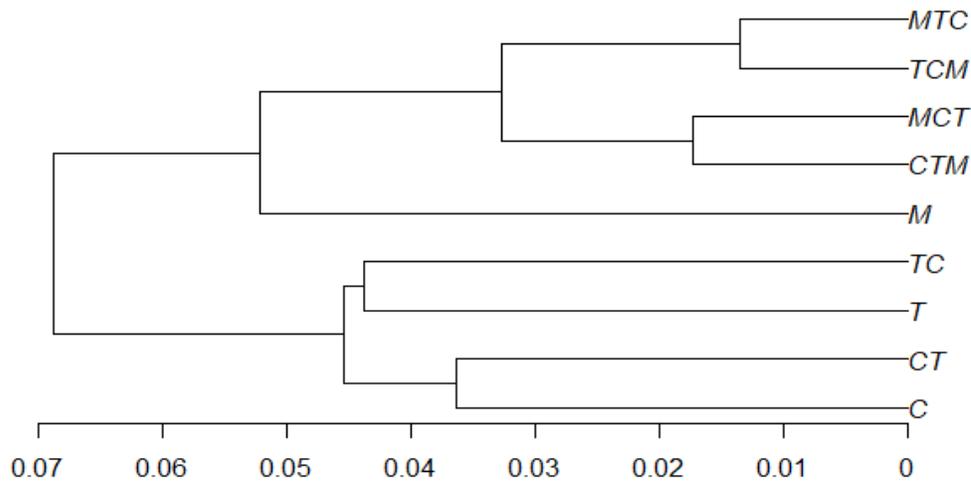
**Tabla 6.** Valores de FST entre grupos parentales y los grupos del pie de cría de *C. quadricarinatus*.

	C	T	M	CT	TC	CT:M	M:CT	TC:M	M:TC
C		+	+	+	+	+	+	+	+
T	0.046		+	+	+	+	+	+	+
M	0.140	0.087		+	+	+	+	+	+
CT	0.027	0.033	0.088		+	+	+	+	+
TC	0.037	0.034	0.109	0.034		+	+	+	+
CT:M	0.080	0.061	0.050	0.046	0.036		+	+	+
M:CT	0.082	0.065	0.072	0.043	0.060	0.014		+	+
TC:M	0.111	0.073	0.058	0.061	0.043	0.033	0.043		+
M:TC	0.105	0.072	0.056	0.063	0.044	0.030	0.044	0.011	

Por encima de la diagonal: + indica nivel de significancia de  $P = 0.05$ . Debajo de la diagonal: Valor FST.

El dendrograma (UPGMA) representa la distancia genética entre los parentales, F1 y F2. Se muestra como todos los grupos se organizaron de la misma manera que se conformó el pie de cría. Los parentales de M, se separaron de C y T, agrupándose con los grupos que conforman el núcleo genético (F2).

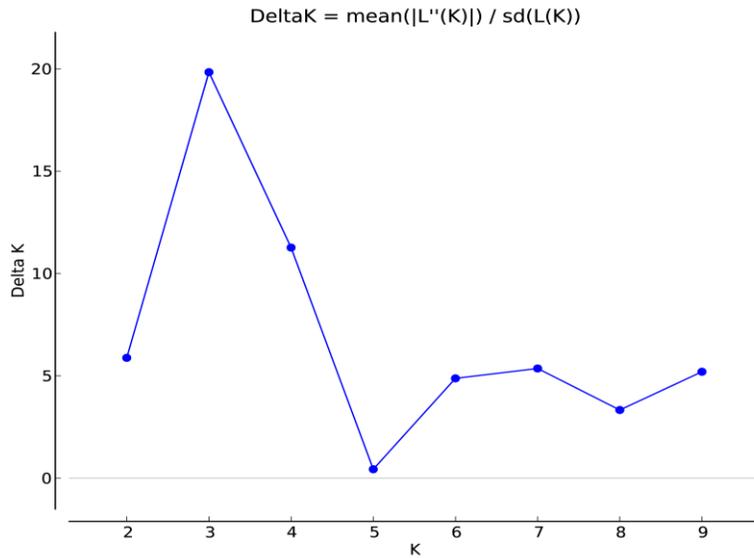
La menor distancia observada en el dendrograma fue en el núcleo genético entre los grupos recíprocos (TC:M y M:TC) y (CT:M y M:CT). Sin embargo, la diferenciación o distancia de M con el núcleo genético fue mayor, que la existente entre C y T con los grupos de la F1. Se observa como CT se agrupó con los parentales C, mientras que TC se agrupó con T (Figura V).



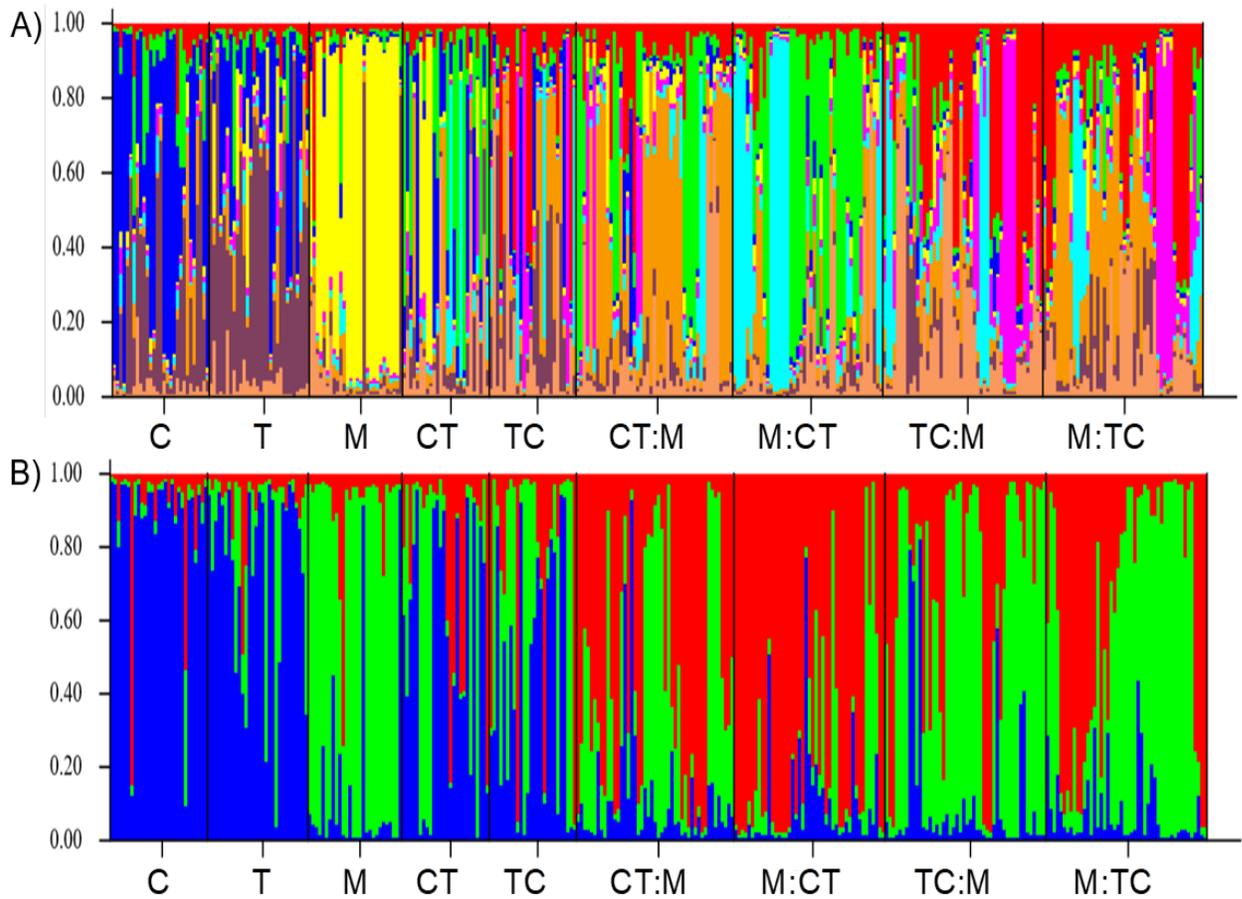
**Figura V.** Dendrograma UPGMA del pie de cría de *C. quadricarinatus* basado en las distancias genéticas de Nei (1972).

El número de poblaciones K inferidas a partir del cálculo de Delta K fue tres, lo que indica que los individuos se agruparon en tres poblaciones (Figura VI).

En el diagramas de barras A se muestran el número de poblaciones K supuestas a partir de los grupos de parentales (C, T y M), F1 (CT y TC) y Núcleo genético (CT:M, M:CT, TC:M y M:TC). Sin embargo, se esperaba que el número de poblaciones inferidas fuera menor a que las dos generaciones (F1 y Núcleo genético) fueron obtenidas a partir de las cruzas entre individuos cultivados en las diferentes regiones. Los parentales M muestran una fuerte estructura diferente al resto de los grupos en los dos diagramas de barras. El diagrama de barras B muestra el número de poblaciones K inferidas a partir del cálculo de Delta K donde los individuos se agruparon en tres poblaciones, lo que demuestra que si existe estructura genética del pie de cría (Figura VII).



**Figura VI.** Número de poblaciones de *C. quadricarinatus* inferidas a partir del cálculo de Delta K.



**Figura VII.** Estructura genética (K= 3) del pie de cría de *C. quadricarinatus*. A) Se muestran los nueve clústeres conformado por los grupos de parentales (C,T y M), F1 (CT y TC) y Núcleo genético (CT:M, M:CT, TC:M y M:TC). B) Los tres clústeres inferidos a partir del cálculo de Delta K.

#### 7.4. Estimación de las relaciones de parentesco entre los individuos de los grupos parentales, F1 y núcleo genético (F2) de *C. quadricarinatus*

De acuerdo con la clasificación (individuos no relacionados ( $UR \leq 0.125$ ), medianamente relacionados o medios hermanos ( $HS = 0.125-0.375$ ) e individuos altamente relacionados o hermanos completos ( $FS \geq 0.375$ )) propuesta por Pino-Querido *et al.*, (2010).

Las estimaciones de parentesco individual fueron obtenidas en una matriz que contiene a los 327 individuo utilizados en este análisis (donde se enfrentó a todos los individuos contra todos). Debido a que es una matriz muy extensa y su fin particular es seleccionar a individuos no relacionados (UR) evitando cruza entre individuos fuertemente emparentados o hermanos completos (FS) mediante la crusa selectiva. Las estimaciones de parentesco presentadas a continuación son promedios ponderados de los individuos que conforman los grupos de parentales, F1 y F2.

Estas estimaciones mostraron que los individuos de M están medianamente emparentados ( $HS = 0.258$ ) presentando el valor más alto. Los grupos del núcleo genético también mostraron individuos medianamente emparentados consigo mismos y en el caso de TC:M y M:TC ( $HS = 0.151$ ) con su grupo recíproco (Tabla 7). C presentó valores negativos en todas las diadas, lo que indica que no hay parentesco o endogamia de C con los demás grupos.

**Tabla 7.** Estimaciones de parentesco promedio de individuos por grupo de *C. quadricarinatus*.

	C	T	M	CT	TC	CT:M	M:CT	TC:M	M:TC
C	-0.002								
T	-0.056	0.077							
M	-0.162	0	0.258						
CT	-0.064	-0.045	-0.06	0.005					
TC	-0.048	-0.024	-0.115	-0.051	0.046				
CT:M	-0.104	-0.021	0.072	-0.01	0.013	0.159			
M:CT	-0.104	-0.035	0.027	-0.009	-0.04	0.119	0.158		
TC:M	-0.12	-0.039	0.052	-0.023	0.029	0.106	0.097	0.181	
M:TC	-0.127	-0.046	0.067	-0.027	0.014	0.122	0.094	0.151	0.173

En color negro: promedio de individuos no relacionadas ( $UR \leq 0.125$ ) por grupo. En color verde: Promedio de grupos de individuos medianamente relacionadas ( $HS = 0.125-0.375$ ).

CT fue el grupo con más individuos no relacionados con 70.77 %, seguido por C con 70.2 %. En contraste, M fue el que presentó más individuos fuertemente emparentados con 39.68 %, en el resto de los grupos, el porcentaje de individuos fuertemente emparentados o hermanos completos fue bajo oscilando entre 4.93 % en C y 21.28 % para TC:M (Tabla 8).

**Tabla 8.** Resumen de parentesco de individuos de *C. quadricarinatus* por grupo.

	Relaciones de parentesco	UR ≤0.125	HS 0.125-0.375	FS ≥0.375	Total
C	No.	285	101	20	406
	%	70.2	24.88	4.93	100
T	No.	250	127	58	435
	%	57.47	29.2	13.33	100
M	No.	127	101	150	378
	%	33.6	26.72	39.68	100
CT	No.	230	62	33	325
	%	70.77	19.08	10.15	100
TC	No.	209	88	28	325
	%	64.31	27.08	8.62	100
CT:M	No.	500	400	181	1081
	%	46.25	37	16.74	100
M:CT	No.	441	367	182	990
	%	44.55	37.07	18.38	100
TC:M	No.	447	441	240	1128
	%	39.63	39.1	21.28	100
M:TC	No.	466	476	186	1128
	%	41.31	42.2	16.49	100

En color negro individuos no relacionadas (UR ≤ 0.125). En color verde individuos medianamente relacionadas (HS = 0.125-0.375). En rojo individuos altamente relacionados o son hermanos completos (FS ≥ 0.375).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Estandarización los microsatélites desarrollados para *C. quadricarinatus*

Para el presente trabajo fueron desechados los loci microsatélites que no amplificaron en el 95% de las muestras (CQ19) y que su lectura no era clara (CQ14 y CQ28). Esta selección evidenció que en algunos loci microsatélites desarrollados para *C. quadricarinatus* no se llevó a cabo la reacción de PCR (el cebador no se unía a la hebra molde de ADN por alguna mutación ocurrida en el sitio de acoplamiento), como ha ocurrido con el CQU.004 en este trabajo (Figura II) y otros anteriormente realizados por Baker *et al.*, (2008). Sin embargo, donde evaluaron la variabilidad de las tres líneas

Una vez completado el proceso de selección, se obtuvo un conjunto de loci microsatélites útiles para evaluar la variabilidad genética del pie de cría y diferenciar los grupos de manera específica, seleccionando los marcadores que muestran la situación actual, pero que también ayudarán a la trazabilidad al momento de decidir cuales individuos se cruzarán. Además, existen algunos loci, como CQ2 y CQ17, que al ser altamente polimórficos son deseables para detectar endogamia en poblaciones de cultivo y realizar estimaciones de parentesco a un menor costo, como lo han mencionado anteriormente otros autores (Pino-Querido *et al.*, 2010)

Se ha cuestionado el uso de microsatélites en lugar de SNPs para inferir paternidad. Trong *et al.* (2013) en tilapia, y Perez-Enriquez & Max-Aguilar (2016) en camarón, entre otros, discuten la sensibilidad de los SNPs sobre los microsatélites. Sin embargo, para cultivos comerciales, donde se busca analizar un gran número de individuos y mantener mayor número de familias para conservar una variabilidad genética elevada, los microsatélites son una herramienta confiable, siempre y cuando se tenga un número adecuado de altamente polimórficos que ayuden a diferenciar las familias (Pardo *et al.*, 2006).

En este trabajo, seis microsatélites (CQU.001, CQU.006, CQ2, CQ13, CQ16, CQ17) son altamente informativos y seis (CQU.002, CQU.003, CQ4, CQ5, CQ9 y CQ18) son medianamente informativos (Tabla 2), según lo reportado por Botstein *et al.*,

(1980 p. 321). En el pie de cría los valores de PIC oscilaron entre 0.310-0.815, siendo valores más altos que los reportados para estos mismos loci por He *et al.* (2012) con un PIC de 0.117-0.804 en los tres cultivo evaluados en China.

En este trabajo el locus CQ2 presentó desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg (HW). Normalmente, esto se presenta cuando hay un alto número de alelos, de los cuales, algunos se encuentran en baja frecuencia y en solo en algunas de las familias dentro de los grupos. Por otro lado, Baker, (2005) indicó que en las estimaciones una gran proporción de alelos nulos están presentes en las poblaciones analizadas de *C. quadricarinatus*. Baker *et al.* (2008) reportaron que en las poblaciones silvestres de Australia hay desviaciones en el equilibrio HW, resultado de la presencia de alelos nulos para la mayoría de los loci

## **8.2. Análisis la variabilidad genética de los parentales, grupos control, F1 y el núcleo genético (F2) de *C. quadricarinatus***

El análisis realizado en el presente trabajo mostró niveles altos de variabilidad genética. El número total de alelos fue de 80 y varió de 46 (M) a 61 (C), con 25 alelos únicos presentes en los diferentes grupos. El Na promedio de 3.83 (M) a 5.08 (C). Estos valores indican que a pesar de que han estado por más de 20 años aislados los parentales de Baja California Sur, se ha mantenido la diversidad alélica, que podría atribuírsele a que han mantenido un alto número de individuos y a las cruzas controlada 1:1 (hembra y macho) y en estanques cielo abierto. Por el contrario, los parentales de Michoacán no se tienen registros de apareamientos controlados, ni del número de cruzas realizadas por generación.

En el pie de cría el Na promedio fue de 4.42 (CT y M:CT), 4.58 (CT:M y TC:M) y 4.83 (TC y M:TC) al comparar con otros cultivos la diversidad alélica fue similar a las granjas de Australia (cruzas entre poblaciones silvestres) reportado por Stevenson (2013), donde el número promedio de alelos por locus vario entre 2.5 (Proa) y 7.5 (Stevo). Mientras que Na fue mayor comparado con los valores presentados por He *et al.*, (2012) en las tres líneas de cultivo en China que poseían un Na promedio de 3.25 (Xiamen), 2.96 (Guangzhou) y 3.18 (Chongming); y

Valencia (2014) que evaluó tres generaciones en el cultivo de Baja California sur con un  $N_a$  promedio de 2.4 (G11), 2.6 (G12) y 2.8 (G13).

En el pie de cría, los valores de heterocigosidad observada fueron altos oscilando entre 0.612 (TC:M) y 0.709 (CT). Presentado mayor heterocigosidad observada que en algunas las granjas de Australia ( $H_o$ : 0.32 - 0.78; Stevenson, 2013) y valores de heterocigosidad observada muy similares a los reportados por en los tres cultivos de China ( $H_o$ : 0.6475 - 0.6793,  $H_e$ : 0.5353 - 0.567; He *et al.*, 2012), con  $H_e$  ligeramente más bajos que los valores observados. En general, cuanto mayor es la heterocigosidad, menor es la incidencia esperada de apareamientos de individuos relacionados (Frankham, 1996).

El promedio multilocus para el coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) indica que ninguno de los grupos presentó endogamia, los valores mostrados indican un exceso de heterocigotos. El exceso de heterocigotos, podría en este caso ser atribuida a la presencia de una selección sobredominante o la ocurrencia de migraciones (en este caso la cruce intencional entre los individuos de las diferentes regiones) en la población estudiada (Nei, 1987).

Estudios anteriores en el cultivo de Valencia (2014) reportó pérdidas de variabilidad genética por endogamia en cultivo de Baja California Sur. Sin embargo, los resultados del presente trabajo muestran que la línea de cultivo de Baja California Sur (C) no presenta pérdidas significativas de variabilidad genética en el tiempo, sino que posee un mayor número de alelos y de heterocigosidad, comparada con las otras poblaciones evaluadas. Diversos factores pueden haber influido en los resultados obtenidos por Valencia (2014) como la presencia de alelos nulos, errores en el genotipado y problemas en la amplificación de los loci (Dakin & Avise, 2004) Un déficit de heterocigotos, podría deberse a cuatro factores principalmente; en primer lugar, que el locus esté bajo selección; en segundo lugar, a la presencia de alelos nulos en esa población, dando una falsa lectura de un exceso de homocigotos; en tercer lugar a altos niveles de endogamia en la población, producto de apareamiento entre individuos emparentados y, en cuarto lugar, se atribuiría a la presencia de una cierta subestructuración reproductiva de la población (efecto

Wahlund) (Nei, 1987). Otra razón podría ser que el número de muestras hayan sido limitados o no ser representativos de la población, el bajo número de loci microsatélites utilizados, o el polimorfismo limitado.

### **8.3. Determinación de estructura genética y diferenciación entre los grupos formados por los parentales, F1 y núcleo genético (F2) de *C. quadricarinatus***

En el pie de cría se observó una diferenciación moderada en las matrices de FST osciló entre 0.011 - 0.14. La estimación más alta de divergencia fue entre los parentales C y M con 14%, mostrando una diferenciación mayor a los tres cultivos evaluados por He *et al.*, (2012) en China, donde valores fueron de 0.002 - 0.124. La estimación más alta de divergencia fue evidente entre los cultivos de Xiamen y Guangzhou. Valencia (2014) encontró una ligera diferenciación mediante las estimaciones de FST entre la generación G11 y G12 de 0.04124. Sin embargo, en el núcleo genético la diferenciación es menor a los parentales, debido a las cruza, lo cual disminuyó la estructura que existía en los cultivos de las diferentes regiones de las que provenían.

En el dendrograma (Figura V) evidenció que entre los parentales M y el núcleo genético la distancia es menor, de debido a que todos los individuos de la F1 se cruzaron con los parentales de Michoacán. Comparativamente, en las granjas de Australia (Bonjie, Walkamin, Bonnie Glen, Aquaverde y Proa) son más cercanas por el diseño inicial del esquema de acoplamiento circular (para evitar el apareamiento de granjas relacionadas en la primera generación) (Stevenson, 2013), pero disminuyendo la alta diferenciación de las poblaciones silvestres, haciéndolas más homogéneas. En el pie de cría la estrategia fue similar, ya que no se busca tener un grado alto de diferenciación, sino aportar la variabilidad contenida en las diferentes regiones para evitar futuros problemas de endogamia.

CT se agrupó en el mismo conglomerado con C, mientras que TC se agrupó con T. Es importante señalar que en los grupos CT, las familias se integraron con hembras de Baja California Sur y machos de Tamaulipas para formar el grupo CT; y viceversa

para TC. Recordando que los loci microsatélites son codominantes, CT tendrían la misma probabilidad de agruparse con Tamaulipas. Sin embargo, existe una relación que favorece a que los alelos de la hembra se hereden con mayor frecuencia sobre los machos. De manera similar sucedió en los tres cultivos evaluados en China presentado por He *et al.*, (2012), donde las hembras de Guangzhou (GZ F) se agruparon separadas de los machos, por lo que las hembras parecían ser una línea más distante.

Por otro lado, las pruebas de asignación realizadas por métodos Bayesianos con el programa STRUCTURE mostraron la existencia de tres subpoblaciones (Baja California Sur, Tamaulipas y Michoacán). Dando evidencia clara que el cultivo en Michoacán presentó mayor diferenciación, posiblemente debido a que el cultivo comenzó un número pequeño de reproductores y que no se haya mantenido un tamaño de población adecuada lo que provocara la diferenciación de los cultivos de las otras regiones (Figura VII). Por otro lado, los parentales de Baja California Sur y Tamaulipas demuestran estar más relacionadas, debido a que provienen de un mismo origen (Australia) y concuerda con la forma de agruparse en el dendrograma.

#### **8.4. Estimación de las relaciones de parentesco entre los individuos de los grupos parentales, F1 y núcleo genético (F2) de *C. quadricarinatus***

La aplicación de métodos por pares para estimar la relación existente de reproductores en acuicultura, donde el manejo es más complicado que para el ganado u otras especies terrestres, particularmente en aquellas especies con desove en masa (Sriphairoj *et al.*, 2007; Gjedrem & Baranski, 2010). La inferencia de paternidad es el método recomendado para identificar relaciones familiares, debido a su mayor potencial para la reconstrucción de pedigrí mediante el uso de enfoques excluyentes o de máxima verosimilitud (Jones & Ardren, 2003; Taggart, 2007).

En el caso de *Cherax quadricarinatus*, en el presente trabajo, los individuos de M están medianamente emparentados (HS = 0.258) presentando el valor más alto de

las diadas con los promedios ponderados. Los grupos del núcleo genético también mostraron individuos medianamente emparentados consigo mismos y en el caso de TC:M y M:TC ( $HS = 0.151$ ) con su grupo recíproco (Tabla 7), esto era de esperarse debido a que en el núcleo genético fueron tomadas cuatro muestras por familia dando individuos con hermanos completos y medios hermanos.

Además, existe una matriz individual de machos contra hembras para realizar cruza específicas, hembras de langosta de agua dulce no corresponden a familias emparentadas ( $r \leq 0.125$ ). En la progenie se presentan valores de hermanos completos solo cuando los individuos pertenecen a la misma familia, lo cual corrobora la fiabilidad de utilizar estos estimadores en el programa de mejoramiento genético mediante la reproducción selectiva.

Por otro lado, C presentó valores negativos en todas las diadas, lo que indica que no hay parentesco o endogamia de C con los demás grupos, por lo que se considera que el programa de cruza para incrementar el acervo genético fue exitoso. La relación molecular puede proporcionar información útil acerca de las relaciones desconocidas entre los fundadores para prevenir cruces innatos (Pino-Querido *et al.*, 2010). La detección de parientes de primer orden entre los criadores (parentales) es esencial para evitar su distribución en las mismas unidades experimentales (Foster & Vincent, 2004).

Estos estimadores se han aplicado en otros programas de selección como en rodaballo (*Scophthalmus maximus*). Utilizaron un gran conjunto de familias de hermanos completos de rodaballo caracterizados mediante 11 microsatélites, donde evaluaron las propiedades estadísticas y los rendimientos de estimadores de parentesco más relevantes para determinar la eficacia de su aplicación en diferentes escenarios de acuicultura (Lynch & Ritland, 1999; Wang, 2002; Pardo *et al.*, 2006). Los datos familiares se obtuvieron de un programa de mejoramiento, donde se disponía de información detallada sobre el pedigrí. A través de la selección de padres con fenotipos favorables, como un alto crecimiento o un aumento de la resistencia a la enfermedad, las variantes (genes) subyacentes a estos rasgos serán heredadas por la progenie (Bouza *et al.*, 2012).

En este estudio, el componente genético de la progenie por diseño pertenece a un sistema de apareamiento monógamo. Esto es necesario para mejorar las posibilidades de éxito de ampliar el acervo (pool) genético para la especie en cautiverio (López *et al.*, 2012). Los resultados son consistentes con la estrategia aplicada en otros programas de generación de un núcleo de pool ampliado y de mejoramiento genético, como el programa llevado a cabo en Australia (Stevenson, 2013), que busca reducir la relación entre granjas intercambiando reproductores. El grupo de 12 microsatélites utilizados en el presente trabajo demostró ser útil para resolver el parentesco en los parentales en cautiverio e investigar las futuras relaciones entre la progenie.

Esta clasificación puede servir como una referencia razonable para los acuicultores, a fin de elegir los cruces específicos entre reproductores en cada tanque. Por otro lado, la información molecular permite incrementar la calidad del manejo de cruzas ya que la selección de parentales puede ser más precisa en el núcleo de un programa de mejoramiento genético, al buscar individuos con valores de  $r \leq 0$ , lo que aseguraría un alto porcentaje de diadas no relacionadas (UR). Estas medidas pueden incluso mejorarse aumentando el poder del análisis. En acuicultura, debido a su costo, ha sido poco frecuente que se utilicen más de 10 loci en estudios para estimar la relación entre grupos (Sekino *et al.*, 2004; Gheyas *et al.*, 2009). Esto puede cambiar con el aumento de información genómica de las especies de importancia comercial, surgen la selección de loci microsatélites con alto polimorfismo que permitan reducir el costo asociado al análisis, mejorando la precisión de selección (Pino-Querido *et al.*, 2010).

Cuando se llevó a cabo el proceso de incremento de variabilidad del núcleo genético, a la par de este trabajo se evaluó el crecimiento, reproducción, respuesta fisiológica y sobrevivencia. Con esta información se puede determinar si existe heredabilidad asociada a los grupos o familias. La matriz por diadas muestra cuales son las cruzas más convenientes, en el núcleo, dependiendo de su categoría de parentesco, la cual debe ser preferentemente entre individuos UR con elevada variabilidad.

## 9. CONCLUSIONES

1. El uso de microsatélites estandarizados es altamente recomendable para realizar análisis de variabilidad genética, diferenciación y estructura poblacional debido a su alto grado de polimorfismo, comparado con otros marcadores moleculares.
2. La cruce entre parentales de Baja California Sur, Tamaulipas y Michoacán aportó la variabilidad genética del pie de cría. C posee un mayor número de alelos, pero una heterocigosidad más baja que el pie de cría, debido a las cruces realizadas.
3. Los índices de endogamia presentaron valores negativos, indicativo de un exceso de heterocigotos en los parentales, F1 y núcleo genético. Por ello se concluye que no existe endogamia en el pie de cría.
4. Los alelos únicos ayudarán a distinguir entre individuos de manera rápida y más económica, sustituyendo el marcaje con elastómeros. Acompañado con las estimaciones de parentesco, se podrá dar seguimiento y rastreabilidad al cultivo al poder seleccionar los individuos idóneos, antes de realizar las cruces.
5. Existe diferenciación entre los parentales M con C y T. Mientras que C y T son más cercanos, pero hay diferencias significativas al comparar todos los grupos.
6. El pie de cría posee la suficiente variabilidad genética para justificar el comienzo de un programa de cría selectiva y de mejoramiento genético dirigido a caracteres deseables en el cultivo.
7. Las estimaciones de parentesco son una herramienta necesaria para planificar las futuras cruces entre individuos relacionados dentro del pie de cría.

## **10. RECOMENDACIONES**

1. Mantener un tamaño significativo de familias dentro del pie de cría para conservar la variabilidad genética.
2. Realizar cruces entre reproductores no relacionados y seguir realizando estimaciones de parentesco para evitar una futura endogamia en el pie de cría.
3. Comparar la variabilidad genética de los grupos con caracteres de crecimiento, reproducción y resistencia.
4. Iniciar un programa de cría selectiva seleccionando un panel de microsatélites altamente polimórfico (utilizados en este trabajo) para realizar estimaciones de relación entre los individuos a cruzar.

## 11. LITERATURA CITADA

- Aljanabi, S. & I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692–4693.
- Baker, N. 2005. Levels and Patterns of Genetic Diversity in Wild Populations and Cultured Stocks of *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) (Decapoda: Parastacidae). 137.
- Baker, N., M. De Bruyn & P.B. Mather. 2008. Patterns of molecular diversity in wild stocks of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) from northern Australia and Papua New Guinea: Impacts of Plio-Pleistocene landscape evolution. *Freshwater Biology*.
- Baker, N., K. Byrne, S. Moore & P. Mather. 2000a. Characterization of microsatellite loci in the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Molecular Ecology* 9: 494–495.
- Baker, N., K. Byrne, S. Moore & P. Mather. 2000b. Characterization of microsatellite loci in the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Molecular Ecology* 9: 494–495.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick & R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics* 32: 314–31.
- Charlesworth, D. & J.H. Willis. 2009. The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics* 10: 783–796.
- Csilléry, K., T. Johnson, D. Beraldi, T.H. Clutton-Brock, D. Coltman, B. Hansson, G. Spong & J. Pemberton. 2006. Published Articles Ahead of Print. *Genetics*.
- Curtis, M.C. & C.M. Jones. 1995. Observations on Monosex Culture of Redclaw Crayfish *Cherax quadricarinatus* von Martens (Decapoda: Parastacidae) in Earthen Ponds. *Journal of the World Aquaculture Society* 26: 154–159.
- Dakin, E.E. & J.C. Avise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis.

*Heredity* 93: 504.

Dodgson, J., H. Cheng & R. Okimoto. 1997. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Science* 76: 1108–1114.

Doyle, R.M., R. Perez-Enriquez, M. Takagi & N. Taniguchi. 2001. Selective recovery of founder genetic diversity in aquacultural broodstocks and captive, endangered fish populations. *Genetica* 111: 291–304.

Earl, D.A. & B.M. vonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359–361.

Eknath, A.E., H.B. Bentsen, R.W. Ponzoni, M. Rye, N.H. Nguyen, J. Thodesen & B. Gjerde. 2007. Genetic improvement of farmed tilapias: Composition and genetic parameters of a synthetic base population of *Oreochromis niloticus* for selective breeding. *Aquaculture* 273: 1–14.

Evanno, G., S. Regnaut & J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.

Excoffier, L. & H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.

Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.5 c.

Felsenstein J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. <http://www.evolution.gs.washington.edu/phylip.html>.

Foster, S.J. & A.C.J. Vincent. 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *Journal of Fish Biology* 65: 1–61.

Frankham, R. 1996. Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife/La Relación Entre la Variación Genética y el Tamaño Poblacional en Vida Silvestre. *Conservation Biology* 10: 1500–1508.

- García-Guerrero, M., M.E. Hendrickx & H. Villarreal. 2003. Description of the Embryonic Development of *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868)(Decapoda, Parastacidae), Based on the Staging Method. *Crustaceana* 269–280.
- Gheyas, A.A., J.A. Woolliams, J.B. Taggart, M.A. Sattar, T.K. Das, B.J. McAndrew & D.J. Penman. 2009. Heritability estimation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) harvest traits using microsatellite based parentage assignment. *Aquaculture* 294: 187–193.
- Gitterle, T., M. Rye, R. Salte, J. Cock, H. Johansen, C. Lozano, J. Arturo Suárez & B. Gjerde. 2005. Genetic (co)variation in harvest body weight and survival in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* under standard commercial conditions. *Aquaculture* 243: 83–92.
- Gjedrem, T. 2000. Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquaculture Research* 31: 25–33.
- Gjedrem, T. 2010. The first family-based breeding program in aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 2: 2–15.
- Gjedrem, T. & M. Baranski. 2010. Selective breeding in aquaculture: an introduction. Springer Science & Business Media.
- Gjedrem, T., N. Robinson & M. Rye. 2012. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. *Aquaculture* 350–353: 117–129.
- Gjerde, B. & M. Rye. 2010. Design of breeding programmes in aquaculture species : Possibilities and constraints and. *Aquaculture Research* 192: 181–192.
- Hardy, O.J. & X. Vekemans. 2002. spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618–620.
- Hayes, B.J., J. Pryce, A.J. Chamberlain, P.J. Bowman & M.E. Goddard. 2010. Genetic Architecture of Complex Traits and Accuracy of Genomic Prediction: Coat Colour, Milk-Fat Percentage, and Type in Holstein Cattle as Contrasting

- Model Traits M. Georges [ed.],. *PLoS Genetics* 6: e1001139.
- He, L. 2012. Isolation and Characterization of Polymorphic Microsatellite Loci in the Redclaw Crayfish, *Cherax Quadricarinatus*. *Journal of Aquaculture Research & Development* 04: 231–234.
- He, L., Y.-N. Xie, W. Lu, Y. Wang, L.-L. Chen, P.B. Mather, Y.-L. Zhao, Y.-P. Wang & Q. Wang. 2012a. Genetic diversity in three redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*, von Martens) lines developed in culture in China. *Aquaculture Research* 43: 75–83.
- He, L., Y.N. Xie, W. Lu, Y. Wang, L.L. Chen, P.B. Mather, Y.L. Zhao, Y.P. Wang & Q. Wang. 2012b. Genetic diversity in three redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*, von Martens) lines developed in culture in China. *Aquaculture Research* 43: 75–83.
- Holsinger, K.E. & B.S. Weir. 2009. Genetics in geographically structured populations: Defining, estimating and interpreting FST. *Nature Reviews Genetics* 10: 639–650.
- Jones, A.G. & W.R. Ardren. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12: 2511–2523.
- Kalinowski, S.T., M.L. Taper & T.C. Marshall. 2007. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099–1106.
- Kemp, S.J., O. Hishida, J. Wambugu, A. Rink, A.J. Teale, M.L. Longeri, R.Z. Ma, Y. Da, H.A. Lewin, W. Barendse & A.J. Teale. 2009. A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers. *Animal Genetics* 26: 299–306.
- López, A., B.G. Pardo, M. Planas, P. Quintas, P. Martínez & C. Bouza. 2012. A microsatellite panel for mating system analysis and broodstock management of captive long-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Aquaculture* 356–357: 153–157.
- Lymbery, A.J. 2000. Genetic improvement in the Australian aquaculture industry. *Aquaculture Research* 31: 145–149.

- Lynch, M. & K. Ritland. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 152: 1753–1766.
- Masser, M., D. Rouse & S. Center. 1997. Australian red claw crayfish. *Southern Regional Aquaculture Center* 244: 1–8.
- McPhee, C.P., C.. Jones & S.A. Shanks. 2004. Selection for increased weight at 9 months in redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture* 237: 131–140.
- Michael P. Masser & David B. Rouse. 1997. Australian Red Claw Crayfish. *Southern Regional Aquaculture Center* 244: 8.
- Naranjo-Páramo, J. 2009. Optimización del cultivo de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*, mediante el ajuste de los niveles dde recambio de agua, aireación y alimentación. CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS-INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, LA PAZ.
- Naranjo-Páramo, J., A. Hernández-Llamas, M. Vargas-Mendieta, L. Mercier & H. Villarreal. 2018. Dynamics of commercial size interval populations of female redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) reared in gravel-lined ponds: A stochastic approach. *Aquaculture* 484: 82–89.
- Naranjo, J., H.C. Villarreal & J.E. Cortés. 2000. Efecto del nivel de aireación en el desarrollo de *Cherax quadricarinatus*, en estanques recubiertos con plásticos. VILLARREAL, C., CORTÉS E. y J. NARAN-JO (Eds.). *Evaluación del potencial de bi-cultivo agrícola/acuícola como una estrategia de eficiencia productiva, fase 1*: 114–130.
- Nei, M. 1972. Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist* 106: 283–292.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia university press.
- Núñez-Amao, L., J. Naranjo-Páramo, A. Hernández-Llamas, M. Vargas-Mendieta & H. Villarreal. 2018. Estimating production costs of preadult redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, reared in a commercial nursery system: A stochastic bioeconomic approach. *Journal of the World Aquaculture Society* 1–14.

- Pardo, B.G., M. Hermida, C. Fernández, C. Bouza, M. Pérez, A. Llavona, L. Sánchez & P. Martínez. 2006. A set of highly polymorphic microsatellites useful for kinship and population analysis in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture research* 37: 1578–1582.
- Paz-García, D.A., A. Munguía-Vega, T. Plomozo-Lugo & A.H. Weaver. 2017. Characterization of 32 microsatellite loci for the Pacific red snapper, *Lutjanus peru*, through next generation sequencing. *Molecular Biology Reports* 44: 251–256.
- Perez-Enriquez, R. & A. Max-Aguilar. 2016. Pedigree traceability in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using genetic markers: A comparison between microsatellites and SNPs. *Ciencias Marinas* 42: 227–235.
- Piñero, D., J. Caballero-Mellado & D. Cabrera-Toledo. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *Capital natural de México I* : C: 437–494.
- Pino-Querido, A., M. Hermida, M. Vilariño, C. Bouza & P. Martínez. 2010. Statistical properties and performance of pairwise relatedness estimators using turbot (*Scophthalmus maximus* L.) family data. *Aquaculture Research* 41: 528–534.
- Quinton, C.D., I. McMillan & B.D. Glebe. 2005. Development of an Atlantic salmon (*Salmo salar*) genetic improvement program: Genetic parameters of harvest body weight and carcass quality traits estimated with animal models. *Aquaculture* 247: 211–217.
- R.King, C. 1994. Growth and survival of redclaw crayfish hatchlings (*Cherax quadricarinatus* von Martens) in relation to temperature, with comments on the relative suitability of *Cherax quadricarinatus* and *Cherax destructor* for culture in Queensland. *Aquaculture* 122: 75–80.
- Rousset, F. 2008. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103–106.
- Schlötterer, C. & D.B. Goldstein. 1999. Microsatellites: evolution and applications.

Oxford University Press.

- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments A poor man ' s approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics . *PRism* 18: 1–2.
- Sekino, M., T. Sugaya, M. Hara & N. Taniguchi. 2004. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 233: 163–172.
- Sriphairoj, K., W. Kamonrat & U. Na-Nakorn. 2007. Genetic aspect in broodstock management of the critically endangered Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas* in Thailand. *Aquaculture* 264: 36–46.
- Stevenson, J. 2013. Redclaw Selective Breeding Project.
- Taggart, J.B. 2007. FAP: An exclusion-based parental assignment program with enhanced predictive functions: Program note. *Molecular Ecology Notes* 7: 412–415.
- Taillon-Miller, P., Z. Gu, Q. Li, L. Hillier & P.Y. Kwok. 1998. Overlapping genomic sequences: a treasure trove of single-nucleotide polymorphisms. *Genome research* 8: 748–54.
- Toro, M.A. & A. Caballero. 2005. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 360: 1367–78.
- Trọng, T.Q., H.A. Mulder, J.A.M. van Arendonk & H. Komen. 2013. Heritability and genotype by environment interaction estimates for harvest weight, growth rate, and shape of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) grown in river cage and VAC in Vietnam. *Aquaculture* 384: 119–127.
- Valencia Valdez, R. 2014. Estimaciones temporales de variabilidad genética a partir de microsatélites en *Cherax quadricarinatus* cultivado en el Noroeste de México.
- Villarreal, H. & J. Peláez. 1999. Biología y cultivo de langosta de agua dulce, *Cherax*

quadricarinatus. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste and Acuacultivos Santo Domingo, La Paz, BCS, México.*

Wang, J. 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160: 1203–1215.

Wasko, A.P., C. Martins, C. Oliveira & F. Foresti. 2003. Non-destructive genetic sampling in sh. An improved method for DNA extraction from sh ns and scales. *Pharmacia* 165: 161–165.

Weir, B.S., A.D. Anderson & A.B. Hepler. 2006. Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Reviews Genetics* 7: 771–780.

Xie, Y., L. He, J. Sun, L. Chen, Y. Zhao, Y. Wang & Q. Wang. 2010. Isolation and characterization of fifteen microsatellite loci from the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Aquatic Living Resources* 23: 231–234.

## **ANEXOS**

### **Anexo 1. Extracción de ADN (Método fenol-cloroformo)**

Para la extracción de ADN, se eliminó el etanol a los pléopodos preservados y se enjuagó con agua destilada. La extracción consiste en añadir 700 µl de Solución de Lisis TNES-UREA (Tris-HCl 10 mM a pH 7.5; NaCl 1.5 M; EDTA 10 mM, pH 7.5; SDS 0.5 %; Urea 4M) y Proteinasa K (12.3 mg/ml); incubando durante 18 h a 37°C.

Se agregaron 700 µl de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1), se agitó suavemente en el horno de hibridación o manualmente por 10 min.

Se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min, se pasó el sobrenadante a tubos nuevos, se volvió a agregar 700 µl de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1), se agitó suavemente en el horno de hibridación o manualmente durante 10 minutos, se centrifugó a 8,000 rpm por 10 min.

Se agregaron 700 µl de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1), se agitó suavemente en el horno de hibridación o manualmente por 10 minutos y se centrifugó a 8,000 rpm por 10 min.

Se pasó el sobrenadante a tubos nuevos y se agregaron 50 µl de Acetato de Sodio, posteriormente se adicionaron 800 µl de Alcohol Etílico Absoluto enfriado a -20°C, los tubos se invirtieron un par de veces y se pusieron a incubar a -20°C durante toda la noche.

Se centrifugó por 10 minutos a 8,000 rpm o 14, 000 (si no se observó precipitado).

El sobrenadante se desechó por decantación tratando de no perder el botón de ADN, se agregaron 70 µl de etanol al 70% y se centrifugó por 10 min a 8,000 RPM (si se observó precipitado) 12 o 14,000 RPM (si no se observó precipitado).

Se desechó de nuevo el sobrenadante por decantación para posteriormente secar destapando los tubos en la campana de extracción por 30 minutos o hasta que el botón se volviera transparente, finalmente se agregó agua estéril libre de nucleasas (miliQ) y se incubó a -20°C.

**Anexo 2. Variabilidad genética *C. quadricarinatus* por locus**

	<b>n</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>Fis</b>
<b>CQU.001</b>						
C	30	3	1.69	0.267	0.410	0.353
T	30	3	2.9	0.767	0.656	-0.172
M	28	3	2.4	0.679	0.584	-0.165
CM	29	2	2.03	1	0.509	-1
MC	30	2	2.03	1	0.509	-1
TM	30	2	2.03	1	0.509	-1
MT	30	3	2.49	0.667	0.599	-0.114
CT	26	4	3.1	0.731	0.678	-0.080
TC	26	3	2.61	0.538	0.618	0.130
CTM	47	4	3.12	0.848	0.679	-0.251
MCT	45	4	3.09	0.667	0.677	0.015
TCM	48	3	2.99	0.625	0.666	0.062
MTC	48	3	2.94	0.854	0.660	-0.299
<b>CQU.002</b>						
C	30	3	2.02	0.533	0.505	-0.058
T	30	3	1.73	0.467	0.422	-0.108
M	28	2	1.39	0.259	0.283	0.085
CM	29	2	1.66	0.536	0.399	-0.350
MC	30	2	1.79	0.300	0.440	0.322
TM	30	2	1.44	0.367	0.305	-0.208
MT	30	2	1.53	0.433	0.345	-0.261
CT	26	2	1.72	0.346	0.419	0.176
TC	26	3	1.49	0.308	0.329	0.065
CT:M	47	2	1.62	0.426	0.384	-0.108
M:CT	45	2	1.7	0.432	0.411	-0.050
TC:M	48	2	1.26	0.146	0.205	0.291
M:TC	48	3	1.75	0.479	0.429	-0.119
<b>CQU.003</b>						
C	30	4	2.13	0.690	0.532	-0.304
T	30	3	1.89	0.433	0.472	0.084

M	28	4	1.53	0.393	0.345	-0.142
CM	29	3	1.33	0.207	0.251	0.178
MC	30	3	1.11	0.100	0.098	-0.024
TM	30	2	1.53	0.433	0.345	-0.261
MT	30	4	1.78	0.533	0.438	-0.223
CT	26	4	2.46	0.800	0.594	-0.356
TC	26	5	2.6	0.731	0.616	-0.190
CT:M	47	4	1.46	0.298	0.317	0.060
M:CT	45	5	1.54	0.356	0.349	-0.018
TC:M	48	4	2.35	0.750	0.574	-0.311
M:TC	48	4	2.08	0.702	0.520	-0.355
<b>CQU.006</b>						
C	30	6	4.28	0.862	0.767	-0.126
T	30	5	3.26	0.857	0.694	-0.240
M	28	4	2.71	0.857	0.631	-0.367
CM	29	5	3.61	0.741	0.723	-0.025
MC	30	5	3.74	0.733	0.733	-0.001
TM	30	4	2.74	0.700	0.636	-0.103
MT	30	5	3.25	0.933	0.693	-0.356
CT	26	6	2.99	0.808	0.666	-0.218
TC	26	6	3.89	0.769	0.744	-0.035
CT:M	47	6	3.82	1.000	0.738	-0.360
M:CT	45	4	3.47	0.844	0.712	-0.189
TC:M	48	5	2.43	0.894	0.588	-0.528
M:TC	48	6	2.71	0.750	0.631	-0.191
<b>CQ2</b>						
C	30	10	7.52	0.786	0.868	0.096
T	30	7	5.03	0.692	0.802	0.139
M	28	8	4.71	0.857	0.789	-0.089
CM	29	6	4.69	1.000	0.787	-0.277
MC	30	7	5.45	1.000	0.817	-0.229
TM	30	7	5.53	0.933	0.820	-0.141
MT	30	5	4.11	0.967	0.757	-0.283
CT	26	7	5.31	0.760	0.812	0.066
M:T	26	9	7.33	0.923	0.864	-0.070
CT:M	47	9	5.78	0.872	0.827	-0.055
M:CT	45	8	4.84	0.977	0.794	-0.234
TC:M	48	8	4.81	0.958	0.792	-0.213
M:TC	48	10	7.19	1.000	0.861	-0.163

<b>CQ4</b>						
C	30	2	1.86	0.500	0.463	-0.082
T	30	2	1.74	0.600	0.427	-0.415
M	28	3	1.8	0.571	0.444	-0.293
CM	29	2	1.45	0.379	0.313	-0.217
MC	30	2	1.74	0.467	0.427	-0.094
TM	30	2	1.92	0.633	0.481	-0.325
MT	30	2	1.31	0.200	0.235	0.151
CT	26	2	1.96	0.640	0.490	-0.315
TC	26	2	1.84	0.520	0.458	-0.139
CT:M	47	2	2.02	1.000	0.505	-1.000
M:CT	45	2	2.02	0.956	0.506	-0.909
TC:M	48	2	1.42	0.354	0.295	-0.205
M:TC	48	2	1.37	0.277	0.271	-0.020
<b>CQ5</b>						
C	30	3	1.89	0.400	0.471	0.152
T	30	3	1.61	0.414	0.381	-0.089
M	28	3	2.36	0.571	0.577	0.010
CM	29	3	1.99	0.310	0.499	0.382
MC	30	3	1.37	0.300	0.270	-0.115
TM	30	3	2.57	0.533	0.612	0.130
MT	30	3	1.58	0.333	0.369	0.098
CT	26	4	1.87	0.538	0.466	-0.159
TC	26	3	2.34	0.692	0.572	-0.215
CT:M	47	3	2.55	0.702	0.608	-0.156
M:CT	45	3	1.92	0.444	0.480	0.075
TC:M	48	3	2.85	0.750	0.649	-0.157
M:TC	48	3	2.18	0.583	0.541	-0.079
<b>CQ9</b>						
C	30	4	2.84	0.733	0.648	-0.134
T	30	5	2.65	0.667	0.623	-0.072
M	28	3	1.34	0.286	0.254	-0.128
CM	29	3	1.48	0.379	0.324	-0.176
MC	30	2	1.14	0.133	0.127	-0.055
TM	30	3	1.42	0.333	0.294	-0.135
MT	30	2	1.44	0.367	0.305	-0.208
CT	26	4	2.55	0.808	0.609	-0.336
TC	26	4	1.51	0.346	0.338	-0.025

CT:M	47	3	1.22	0.191	0.178	-0.075
M:CT	45	5	1.29	0.200	0.228	0.122
TC:M	48	4	1.27	0.229	0.213	-0.075
M:TC	48	5	1.3	0.250	0.230	-0.087
<b>CQ13</b>						
C	30	6	2.88	0.600	0.653	0.083
T	30	5	3.17	0.793	0.685	-0.161
M	28	6	3.41	0.846	0.707	-0.201
CM	29	5	4.13	0.630	0.758	0.172
MC	30	5	2.8	0.633	0.643	0.015
TM	30	5	3.47	0.667	0.712	0.065
MT	30	5	3.3	0.800	0.698	-0.149
CT	26	5	4.36	0.840	0.771	-0.091
TC	26	5	3.44	0.846	0.710	-0.197
CT:M	47	5	4.68	0.787	0.786	-0.001
M:CT	45	5	4.48	0.622	0.777	0.201
TC:M	48	5	3.51	0.667	0.715	0.068
M:TC	48	6	3.01	0.681	0.668	-0.019
<b>CQ16</b>						
C	30	6	4.11	0.786	0.757	-0.038
T	30	5	4.52	0.583	0.779	0.255
M	28	4	1.72	0.423	0.418	-0.013
CM	29	3	1.98	0.500	0.494	-0.012
MC	30	4	1.65	0.448	0.394	-0.141
TM	30	5	2.63	0.533	0.620	0.142
MT	30	5	2.68	0.586	0.627	0.066
CT	26	6	5.11	0.880	0.805	-0.095
TC	26	6	4.64	0.840	0.785	-0.071
CT:M	47	6	3.14	0.739	0.682	-0.085
M:CT	45	6	3.71	0.512	0.731	0.302
TC:M	48	7	3.02	0.667	0.669	0.003
M:TC	48	5	2.63	0.447	0.620	0.281
<b>CQ17</b>						
C	30	12	5.59	0.900	0.822	-0.097
T	30	8	4.16	0.733	0.760	0.036
M	28	4	2.49	0.500	0.598	0.166
CM	29	7	5.1	0.931	0.805	-0.160
MC	30	8	5.47	0.933	0.818	-0.144

TM	30	5	4.83	0.900	0.793	-0.137
MT	30	6	3.36	0.900	0.703	-0.287
CT	26	6	4.51	0.800	0.779	-0.028
TC	26	9	6.14	0.808	0.838	0.037
CT:M	47	8	3.72	0.674	0.732	0.080
M:CT	45	6	3.95	0.857	0.747	-0.149
TC:M	48	9	3.86	0.766	0.741	-0.034
M:TC	48	8	4.12	0.938	0.758	-0.241
<b>CQ18</b>						
C	30	2	1.55	0.310	0.354	0.125
T	30	3	1.82	0.300	0.450	0.338
M	28	3	2.18	0.444	0.542	0.183
CM	29	3	1.49	0.379	0.327	-0.162
MC	30	2	1.86	0.700	0.463	-0.526
TM	30	2	1.39	0.267	0.283	0.057
MT	30	2	1.74	0.400	0.427	0.065
CT	26	3	1.93	0.560	0.483	-0.163
TC	26	3	1.84	0.320	0.456	0.303
CT:M	47	3	2.35	0.717	0.575	-0.252
M:CT	45	3	2.07	0.500	0.517	0.032
TC:M	48	3	2.31	0.553	0.567	0.025
M:TC	48	3	2.25	0.617	0.556	-0.112

### Anexo 3. Frecuencias alélicas *C. quadricarinatus* por locus

