

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica

**BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

**ESTUDIO GENÉTICO DE POBLACIONES DEL MOSQUITO *ANOPHELES
ALBIMANUS* MEDIANTE SECUENCIAS MICROSATELITES**

CAROLINA SCHOUA


Trabajo de graduación presentado para optar al grado
académico de Licenciatura en Bioquímica

Guatemala

2,000


ESTUDIO GENÉTICO DE POBLACIONES DEL MOSQUITO *ANOPHELES*
ALBIMANUS MEDIANTE SECUENCIAS MICROSATELITES

Vo. Bo.

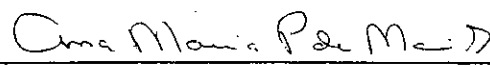
(f)  _____

Dr. Alvaro Molina C.
Asesor

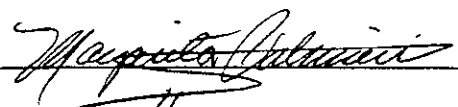
Tribunal:

(f)  _____

Dr. Alvaro Molina C.

(f)  _____

Licenciada Ana María de Mérida

(f)  _____

Licenciada Margarita Palmieri

Fecha de Aprobación: 16 de Junio de 2,000.

RESUMEN

El presente trabajo consiste en un estudio de genética de poblaciones del mosquito *Anopheles albimanus* en el que se compararon poblaciones de las regiones norte, sur y este de Guatemala. Se usaron tres marcadores diferentes de secuencias microsatélites, 1-90, 2-14 y 6-41, a fin de comparar las poblaciones y determinar si existe flujo genético o si hay distanciamiento genético entre ellas.

La metodología del estudio consistió básicamente en reconstituir el ADN de los mosquitos colectados con anterioridad; luego se amplificaron las secuencias microsatélites por medio de PCR, se corrieron los productos en geles de secuenciación y se leyeron el tamaño y composición de alelos para cada individuo de las poblaciones trabajadas. Los datos fueron analizados al utilizar un programa estadístico para genética de poblaciones.

Primero se estudiaron las tres suposiciones necesarias para poder analizar los datos con los tres microsatélites juntos; que son la presencia de alelos nulos, la independencia de cada locus y la ausencia de selección natural sobre los marcadores. No se detectaron alelos nulos para los microsatélites 1-90 y 6-41. En el análisis de ligamiento se asumió independencia entre los locus y también se asumió neutralidad selectiva para los marcadores porque el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg realizado por poblaciones mostró que la mayoría estaban en equilibrio para los microsatélites 1-90 y 6-41.

Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg en tres niveles, por poblaciones, por regiones y para la población total de *Anopheles albimanus*. Este análisis indicó que existen fuerzas como flujo de genes y deriva genética entre las regiones norte, sur y este de Guatemala.

Se realizó un análisis de varianza AMOVA del que se concluyó que hay flujo genético entre poblaciones adyacentes o cercanas y que si bien hay migración de individuos entre regiones aún existen diferencias que se mantienen por barreras que no permiten la completa homogeneización de la población total.

Con el índice F_{ST} de Wright se encontró una diferenciación genética moderada entre las regiones norte, sur y este de Guatemala, la cual se atribuyó a la deriva genética y a la distancia geográfica entre poblaciones.

Al realizar el análisis de Mantel, se encontró que el flujo de genes entre las poblaciones de *Anopheles albimanus* disminuye a medida que aumenta la distancia geográfica que las separa. Se concluyó que la distancia geográfica funciona como barrera que disminuye el flujo de genes entre poblaciones.

En relación con los estudios anteriores de genética de poblaciones realizados con *Anopheles albimanus*, los resultados obtenidos en el presente estudio con marcadores microsatélites son similares al estudio realizado por Mérida et. al 1999 con ADN Mitocondrial.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo del Plasmodium spp. en el humano. Fase asexual.	4
2	Ciclo del Plasmodium spp. en el mosquito. Fase sexual.	6
3	Patogénesis de la malaria.	8
4	Regiones de riesgo en Guatemala	9
5	Metamorfosis completa del mosquito Anopheles	11
6	Descripción general del método de isoenzimas	20
7	Descripción general de la técnica para el estudio de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica.	22
8	Descripción general de la técnica para el estudio de los polimorfismos en el ácido desoxirribonucleico arbitrariamente amplificado.	24
9	Descripción general de la técnica para el estudio de microsatélites.	25
10	Sitios de colecta de <i>Anopheles albimanus</i> .	31
11	Electroforesis en agarosa, optimización de PCR, prueba 3, microsatélite 1-90, diferentes diluciones de la muestra, individuos de varias poblaciones.	43
12	Electroforesis en agarosa, optimización de PCR, prueba 3, microsatélite 2-14, individuos de la población Ruperto 4/10/95.	44
13	Electroforesis en agarosa, optimización de PCR, prueba 4, microsatélite 6-41, población Champona 11/3/96	44
14	Gel de secuenciación de la población Puente Blanco, microsatélite 1-90	46
15	Gel de secuenciación de la población Tallado, microsatélite 6-41	47
16	Gel de secuenciación de la población El Motor, microsatélite 2-14	48

Figura		Página
17	Gel de secuenciación de varias poblaciones, microsatélite 1-90	49
18	Gel de secuenciación de varias poblaciones, microsatélite 2-14	50
19	Gel de secuenciación de varias poblaciones, microsatélite 6-41	51
20	Dendrograma realizado a partir de un cluster analisis formulado con los valores $1-[F_{ST}/(1-F_{ST})]$ con el programa SPSS, versión 4.0	80

LISTA DE GRAFICAS

Grafica		Página
1	Frecuencia de alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90	57
2	Comparación de las frecuencias alélicas de las poblaciones del norte, microsatélite 1-90	58
3	Comparación de las frecuencias alélicas de las poblaciones del sur, microsatélite 1-90	59
4	Comparación de las frecuencias alélicas de las poblaciones del este, microsatélite 1-90	59
5	Comparación de las frecuencias alélicas obtenidas para las regiones norte, sur y este, microsatélite 1-90	60
6	Frecuencia de alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14	63
7	Comparación de las frecuencias alélicas de las poblaciones del norte, microsatélite 2-14	64
8	Comparación de las frecuencias alélicas de las poblaciones del sur, microsatélite 2-14	64
9	Comparación de las frecuencias alélicas de las poblaciones del este, microsatélite 2-14	65
10	Comparación de las frecuencias alélicas obtenidas para las regiones norte, sur y este, microsatélite 2-14	65
11	Frecuencia de alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41	69
12	Comparación de las frecuencias alélicas de las poblaciones del norte, microsatélite 6-41	70
13	Comparación de las frecuencias alélicas de las poblaciones del sur, microsatélite 6-41	71
14	Comparación de las frecuencias alélicas de las poblaciones del este, microsatélite 6-41	71
15	Comparación de las frecuencias alélicas obtenidas para las regiones norte, sur y este, microsatélite 6-41	71

Grafica		Página
16	Análisis de Mantel, correlación entre distancia geográfica (en Km) y distancia genética según $F_{st}/(1-F_{st})$ entre las poblaciones estudiadas	81
17	Análisis de Mantel, correlación entre \ln (distancia geográfica (en Km)) y distancia genética según $F_{st}/(1-F_{st})$ entre las poblaciones estudiadas	82

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Métodos utilizados para identificar la variación genética en poblaciones naturales y fenotipos asociados con los alelos que se detecta en cada método.	19
2	Región de cada sitio de colecta, fecha de colección y número de individuos trabajados	32
3	Programa para PCR utilizado	35
4	Iniciadores usados para la reacción de PCR	40
5	Optimización de PCR, primer prueba, programa AMC	41
6	Optimización de PCR, segunda prueba, programa BLACK0	42
7	Optimización de PCR, tercer prueba, programa BLACK	42
8	Optimización para el microsatélite 6-41, cuarta prueba	44
9	Tamaño de las secuencias amplificadas en pares de bases determinado con electroforesis en agarosa.	45
10	Región de cada sitio de colecta, fecha de colección, número de individuos que amplificaron con PCR y número de individuos a los que se les determinó composición y tamaño de alelos a través de electroforesis en geles de secuenciación por microsatélite trabajado.	53
11	Alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90	55
12	Frecuencias de alelos obtenidos con el microsatélite 1-90	56
13	Alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14	61
14	Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14	62
15	Alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41	67
16	Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41	68
17	Estructura de grupos para el ingreso de datos	72
18	Análisis de ligamiento de locus por parejas para las poblaciones del este	72

Cuadro		Página
38	Composición alélica de la población Lauro 7/6/95	98
39	Composición alélica de la población Nahua 13/3/96	98
40	Composición alélica de la población Puente Blanco 21/2/96	99
41	Composición alélica de la población Ruperto 4/10/95	101
42	Composición alélica de la población Ruperto 27/3/96	104
43	Composición alélica de la población San Luis Peten, 12/3/96	104
44	Composición alélica de la población San Luis Buenaventura 12/3/96	106
45	Composición alélica de la población Tallado 7/2/95	107
46	Análisis de varianza AMOVA, microsatélite 1-90	109
47	Análisis de varianza AMOVA, microsatélite 2-14	109
48	Análisis de varianza AMOVA, microsatélite 6-41	109
49	Índices de fijación F de Wright, microsatélite 1-90	110
50	Índices de fijación F de Wright, microsatélite 2-14	110
51	Índices de fijación F de Wright, microsatélite 6-41	110
52	Distancia en Km entre parejas de las localidades de las localidades de las poblaciones estudiadas	111

I. INTRODUCCIÓN

La República de Guatemala por su ubicación en la zona tórrida del trópico ofrece condiciones ecológicas óptimas para la transmisión de la malaria en 74% de su extensión territorial, exponiendo a miles de habitantes al riesgo de contraer esta enfermedad mientras no sea totalmente erradicada. Se sabe que la malaria ha azotado este país desde hace varios siglos y que ha ocupado el primer lugar entre las causas de morbilidad y el segundo entre las de mortalidad, especialmente entre los infantes, que ha causando un elevado número de defunciones e incapacidad física entre los habitantes de las áreas rurales y por ende graves daños socio-económicos en este país, cuyos recursos provienen en su mayor parte de la producción agropecuaria (Godoy y García, 1980).

En Guatemala, el principal vector de la malaria es el mosquito *Anopheles albimanus*, la transmisión del parásito causante de la malaria y la persistencia de la misma dependen en gran parte del vector, por lo tanto es necesario estudiar al mosquito con el objeto de conocer y comprender su importancia en la epidemiología de la enfermedad.

La genética de poblaciones permite estudiar variación genética dentro de una población y entre poblaciones de una misma especie de vector, esto es importante para comprender mejor la transmisión de las enfermedades, la epidemiología y el control de la enfermedad; de este modo los estudios de genética de poblaciones brindan la oportunidad de desarrollar estrategias de control más efectivas (Black and Tabachnick, 1995).

El presente trabajo consiste en un estudio de genética de poblaciones del mosquito *Anopheles albimanus* para comparar poblaciones de las regiones norte, sur y este de Guatemala. En este contexto ya se han hecho dos estudios; en el primero se utilizaron espaciadores intergenicos de ADN ribosomal como marcador genético para comparar

poblaciones de la costa atlántica y pacífica del país, se encontraron variaciones entre las poblaciones por lo que se propuso la existencia de barreras geográficas que no permiten el flujo de genes entre las costas, estando aisladas reproductivamente y por consiguiente, con diferentes patrones genéticos. En el segundo estudio se trabajó con ADN mitocondrial, se compararon nuevamente las poblaciones pero esta vez los resultados no mostraron variación; para explicar esta contradicción se planteó una serie de hipótesis que podrían ser respaldadas utilizando para ello un marcador molecular que sea independiente como genes nucleares de secuencias únicas o secuencias microsátélites. De acuerdo con esta línea de investigación, se realizó la presente tesis en la cual se estudiaron las poblaciones de mosquitos *Anopheles albimanus* de las regiones norte, sur y este del país utilizando para ello tres marcadores diferentes de secuencias microsátélites a fin de comparar las poblaciones y de determinar si existe flujo genético o si hay distanciamiento reproductivo. Se trabajó con las mismas poblaciones de mosquitos colectadas para las investigaciones anteriores y se detectó que existe una diferenciación genética moderada entre las regiones; aunque todas las poblaciones están relacionadas en cierto grado. Se encontró que el flujo de genes entre las poblaciones de *Anopheles albimanus* disminuye a medida que aumenta la distancia geográfica que las separa. En relación con los estudios anteriores, los resultados del presente estudio se asemejan mas al estudio realizado por Mérida et. al 1999 con ADN Mitocondrial.

II. ANTECEDENTES

A. Malaria

La Malaria es una infección transmitida por mosquitos y causada por protozoos del género *Plasmodium*. Los seres humanos son comúnmente infectados por cuatro especies del parásito, *Plasmodium falciparum*, *P. Ovale*, *P. vivax* y *P. Malariae* (Katz, et.al.1982). El vector de la malaria es la hembra del mosquito anofelino (García and Bruckner, 1993).

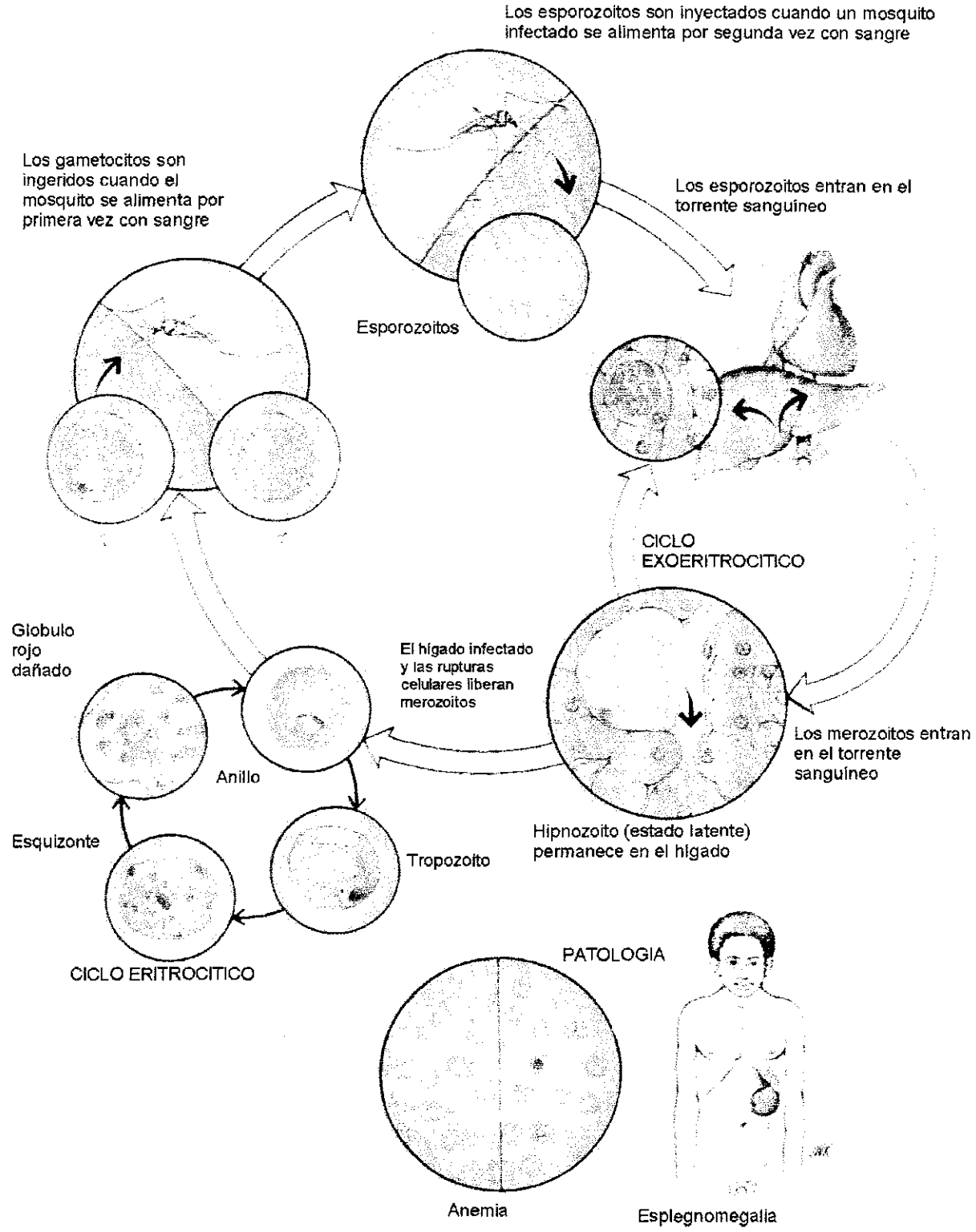
1. Ciclos de vida y morfología del parásito

La biología de las cuatro especies de *Plasmodium* es similar y consiste en dos estadios discretos, el sexual y el asexual. La fase asexual en el hombre se desarrolla primero en el hígado y luego en los eritrocitos circulantes, la fase sexual se desarrolla en el mosquito (Katz, et.al.1982).

Cuando un mosquito anopheles hembra que está infectado pica a un ser humano inyecta fluidos salivares en la herida. Estos fluidos contienen esporozoitos, que son formas pequeñas y móviles del parásito que inician la infección. Después de una hora, estos son acarreados por el torrente sanguíneo y alcanzan las células parenquimales del hígado. Una vez dentro de las células hepáticas, el parásito sufre división asexual (esquizogonia exoeritrocítica) generando miles de parásitos (Katz, et.al.1982).

Cuando los merozoitos son liberados desde hígado invaden los glóbulos rojos e inician la fase de infección eritrocítica. Una vez dentro de la célula, el parásito comienza a crecer, primero formando el trofozoito con forma de anillo y luego agrandándose hasta llenar la célula. El organismo sufre división asexual y se vuelve un esquizonte compuesto de merozoitos. Los parásitos se alimentan con la hemoglobina que se encuentra dentro de los eritrocitos y producen un pigmento característico llamado hemazoina. El ciclo eritrocítico se completa cuando el glóbulo rojo se rompe y libera a los merozoitos, los cuales proceden a invadir a otros eritrocitos. Este ciclo es periódico (Katz, et.al.1982).

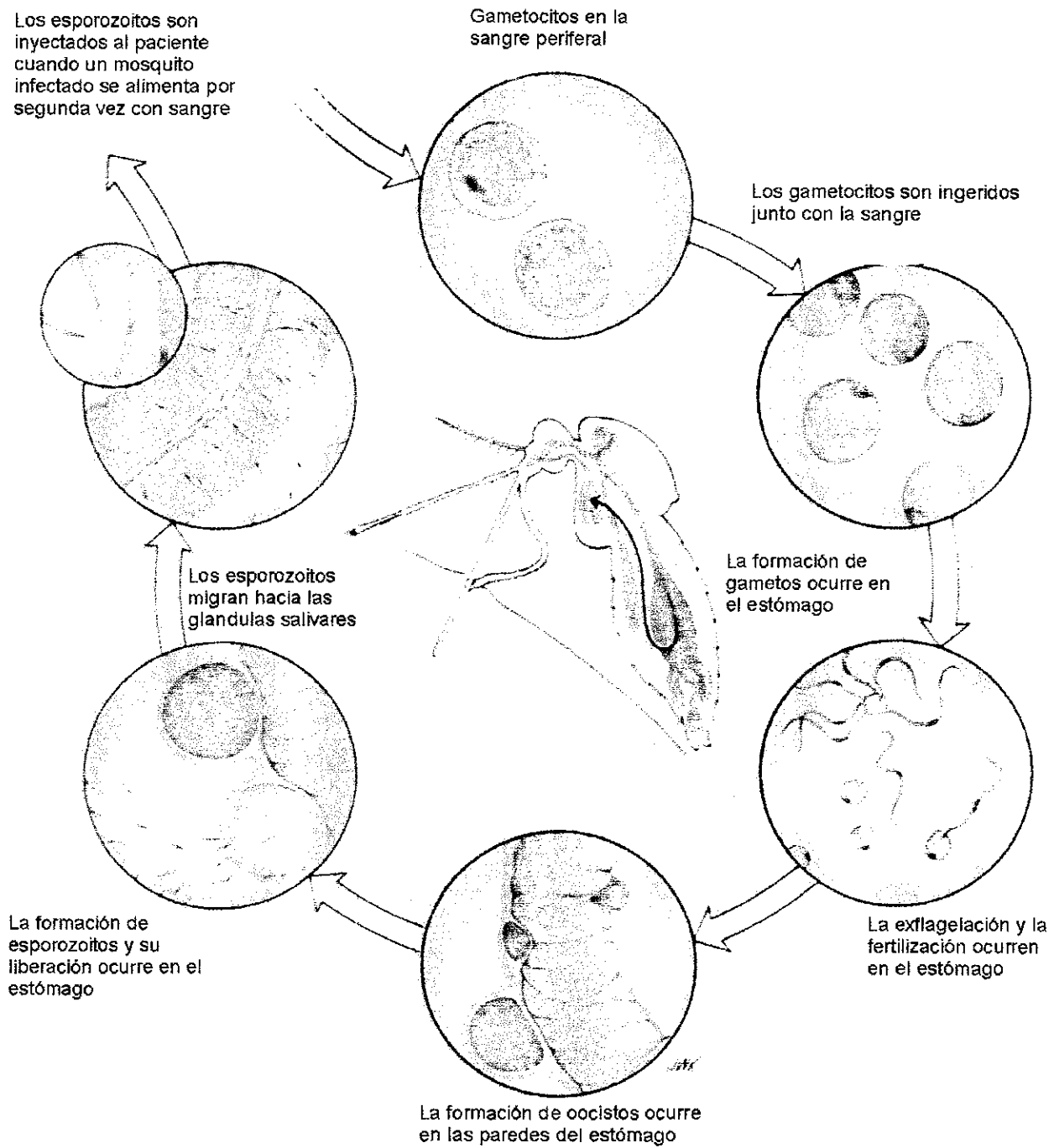
Figura 1
Ciclo del Plasmodium spp. en el humano
Fase asexual
(Katz, et.al.1982)



No todos los merozoitos se desarrollan asexualmente. Algunos se diferencian y se convierten en las formas sexuales que son los macrogametocitos (hembra) y los microgametocitos (macho), estos pueden completar su desarrollo solamente en el interior del mosquito vector apropiado (Katz, et.al.1982).

Cuando los gametocitos entran en el mosquito durante la alimentación con sangre, las células macho inician la exflagelación, un proceso rápido que produce hasta ocho microgametos que eventualmente fertilizan a los macrogametos. Los cigotos resultantes se elongan y penetran la pared del intestino del mosquito hasta depositarse debajo de la membrana de base, donde forman oocistos luego de 24 horas desde la ingestión de la sangre. Finalmente se desarrollan los esporozoitos, con una producción de miles de estos que ahora son haploides. Los esporozoitos maduran en 10-14 días, escapan del oocisto e invaden las glándulas salivares del mosquito. Cuando el mosquito pica a un humano, un nuevo ciclo comienza (Katz, et.al.1982).

Figura 2
Ciclo del Plasmodium spp. en el mosquito
Fase sexual
(Katz, et.al.1982)



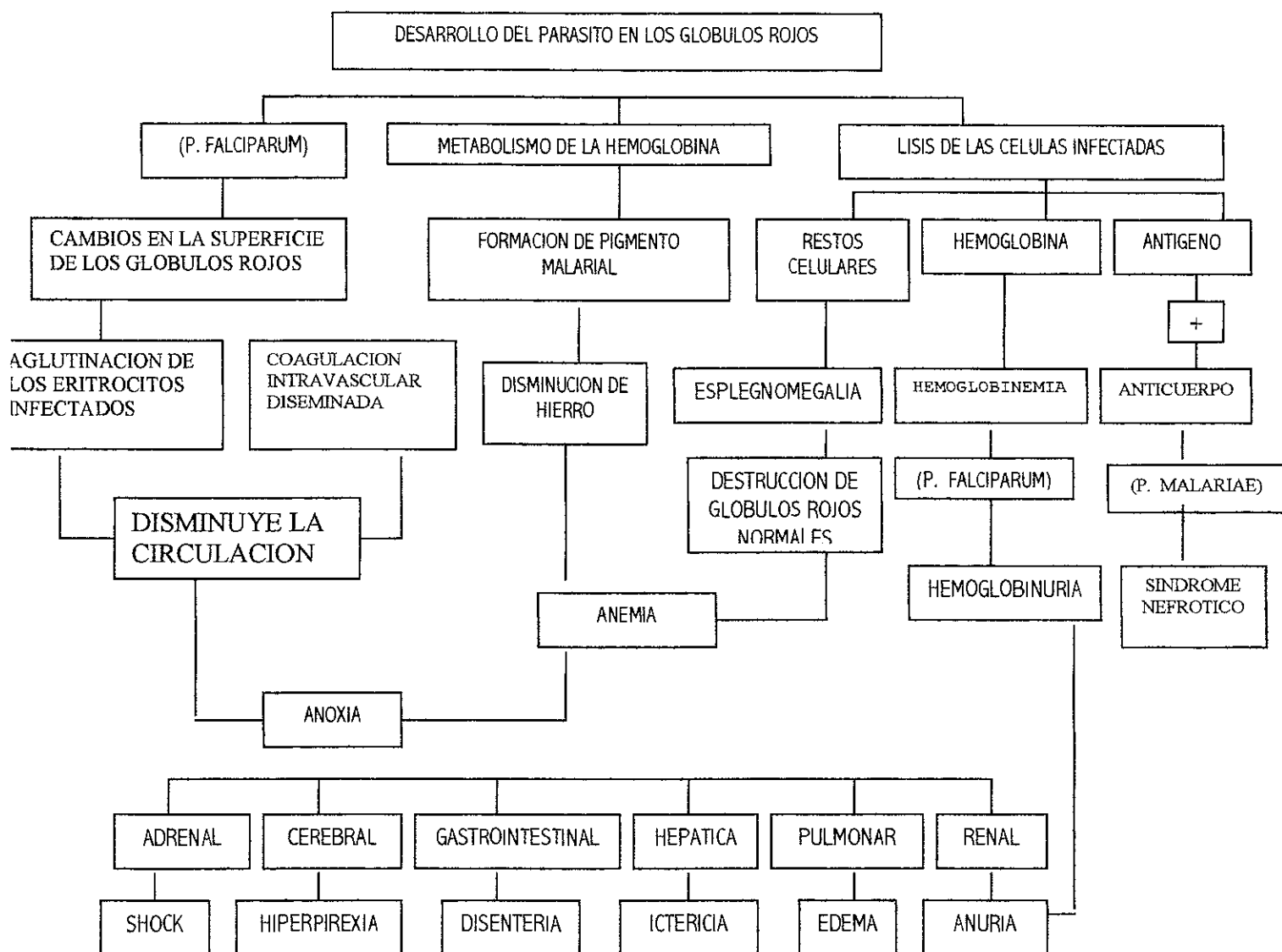
2. Descripción de la enfermedad

Desde que el mosquito pica a la persona hasta aproximadamente una semana después, el paciente se mantiene asintomático. Durante este tiempo, los organismos están bajo un periodo de multiplicación en el hígado (ciclo preeritrocítico). Cuando los merozoítos del hígado invaden a los glóbulos rojos, mucha progenie se desarrolla; comenzando el proceso de periodicidad. Una vez que el ciclo es sincronizado, la ruptura simultánea de un gran número de glóbulos rojos y la liberación de desechos metabólicos sub productos en el torrente sanguíneo precipita los síntomas de la malaria (García and Bruckner, 1993).

Los síntomas clínicos de la malaria incluyen anemia, esplenomegalia y el paroxysmo clásico, con su período frío, fiebres y sudores (García and Bruckner, 1993).

La anemia observada en las infecciones malarias puede ser causada por un número de mecanismos, como la lisis directa de los glóbulos rojos en función del ciclo de vida del parásito, remoción esplénica de eritrocitos infectados y no infectados (cubiertos de complejos inmunes), lisis auto inmune de eritrocitos infectados y cubiertos y de eritrocitos no infectados, disminución de la incorporación de hierro en forma de grupo hemo, mayor fragilidad de los glóbulos rojos y disminución de la producción de los eritrocitos debido a la supresión de la médula ósea (García and Bruckner, 1993).

Figura 3
Patogénesis de la malaria
(Garcia and Bruckner, 1993)



3. Epidemiología

La malaria es una de las enfermedades transmitidas por vectores artrópodos de mayor incidencia en el mundo. En los últimos años, la situación del paludismo en América Latina se ha agravado; la población en riesgo fue estimada en 248 millones de personas lo que equivale a cerca del 32% de la población total de la región; de estas personas, aproximadamente 36 millones viven en áreas de riesgo intermedio, mientras que 42 millones habitan en regiones de alto riesgo (PAHO, 1996).

A pesar de los esfuerzos para controlar la enfermedad, la situación ha empeorado en los últimos años. En el año de 1995 se reportó un total de 1.30 millones de casos de malaria en América; esta cifra representa un incremento del 14.6% en relación con el año anterior. De

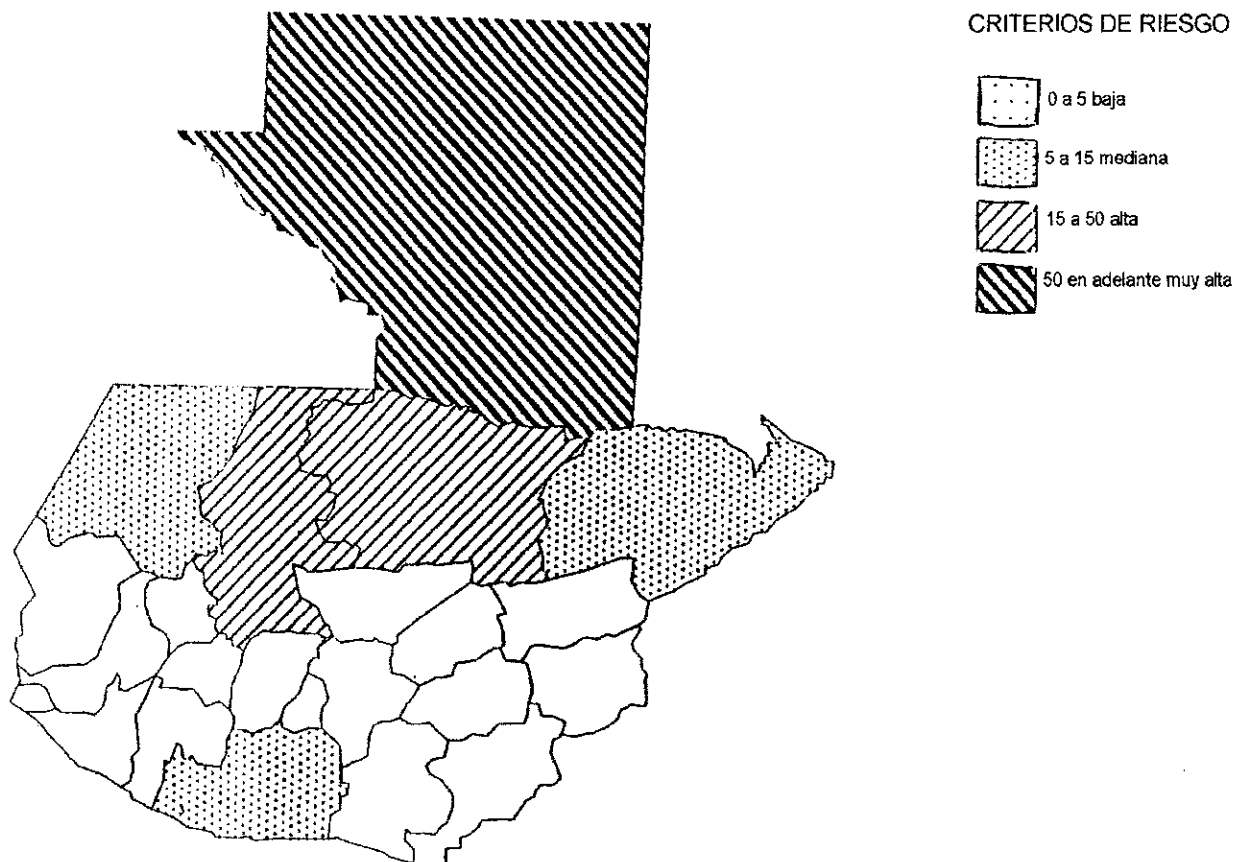
la misma manera, las tasas de mortalidad aumentaron de 145.9 por 100,000 habitantes en 1994, a 168.16 por 100,000 habitantes en 1995. Tan sólo en las regiones de alto riesgo, esta tasa aumentó de 481.6 a 523.3 por 100,000 habitantes (PAHO, 1996).

La República de Guatemala, por su ubicación en la zona tórrida del trópico ofrece condiciones ecológicas óptimas para la transmisión de la malaria en un 74% de su extensión territorial, exponiendo a 2,345,894 habitantes al riesgo de contraer esta enfermedad mientras no sea totalmente erradicada (Godoy y García, 1980).

En Guatemala la malaria continúa siendo un serio problema de salud pública y figura como una de las cinco enfermedades transmisibles de más alta morbilidad (OPS-OMS, 1994). La población bajo riesgo de contraer malaria en Guatemala es de 4.2 millones de personas. En 1995 se reportó un total de 24,178 casos de paludismo; esta cifra representa el 14.13% de los casos observados en Mesoamérica (PAHO, 1996).

La tendencia de la enfermedad en general muestra un aumento progresivo, especialmente en la zona norte del país donde se observa mayor pobreza. Entre los factores que han influido en la situación actual están la falta de insumos críticos, un presupuesto insuficiente y desactualizado, la mala administración y estado de crisis institucional, la falta de organización gerencial, disponibilidad y actualización de normas y perfiles ocupacionales, así como la falta de participación de los servicios de salud (OPS-OMS, 1994). Las regiones de riesgo en Guatemala son los departamentos de Alta Verapaz, El Petén, Huehuetenango, Escuintla, San Marcos e Izabal y el Ixcán (OPS-OMS, 1994).

Figura 4
Regiones de riesgo en Guatemala
(OPS-OMS, 1994)



Las regiones de riesgo en Guatemala tienen un área de 370,141 km², y en ellas habitan 2.46 millones de personas. Tan sólo en estas regiones se reportaron 23,029 casos, del total de 24,178 casos positivos en este país en 1995. La región de más alto riesgo es El Petén; en este departamento ocurrió el 33.47% de los casos reportados en Guatemala. En la región del Ixcán y en Alta Verapaz se dieron el 20.33 % y el 15.68 % de los casos respectivamente; por consiguiente la región de mayor riesgo es el norte del país (PAHO, 1996; OPS-OMS, 1994).

4. El mosquito Anopheles como vector de la malaria

El vector es un ser que por sus hábitos de vida, es capaz de llevar el agente infectante desde la fuente de infección hasta el huésped susceptible, siendo por lo tanto un transmisor activo de la enfermedad (Aguilar, 1997).

El mosquito vector del paludismo pertenece a la familia Culicidae y a la sub familia Anophelinae. Se conocen en el mundo acerca de 2,500 especies de mosquitos, de los cuales aproximadamente 300 son Anopheles; sin embargo la mayor parte de estas especies anofelínicas no están íntimamente relacionadas con el hombre y únicamente las hembras de unas 60 especies son reconocidas como vectores de la malaria (Godoy y García, 1980).

En Guatemala se han identificado varias especies de anofelinos, pero únicamente se reconocen como vectores el *Anopheles albimanus* (principal), el *A. Pseudopunctipennis* y el *A. Darlingi*. El *A. Punctimacula* y el *A. Apicimacula* son vectores potenciales. El *A. Albimanus* es el vector de mas amplia distribución en Guatemala, ya que se encuentra siempre presente en altitudes de 0 a 1000 metros sobre el nivel del mar. El *A.pseudopunctipennis* puede encontrarse hasta 1,500 metros sobre el nivel del mar y es frecuentemente hallado en el nor-poniente del país (Huehuetenango, Quiché). El *A. Darlingi* se había mencionado desde hace mucho tiempo como una de las especies de Guatemala pero no fue sino hasta 1971 que se comprobó su presencia en Dolores, Sayaxché y la Libertad, municipios de El Petén en relación con brotes epidémicos de malaria. El *A. Vestitipennis* se encuentra habitualmente en Alta Verapaz y aunque se presume epidemiológicamente que sea vector, aun no ha sido posible comprobarlo (Godoy y García, 1980).

Las colecciones de agua en donde se encuentran larvas de anofelinos constituyen el criaderos de los mismos; generalmente son aguas reposadas claras, de poca profundidad y sombreadas; pueden ser temporales o permanentes, naturales o artificiales (Godoy y García, 1980).

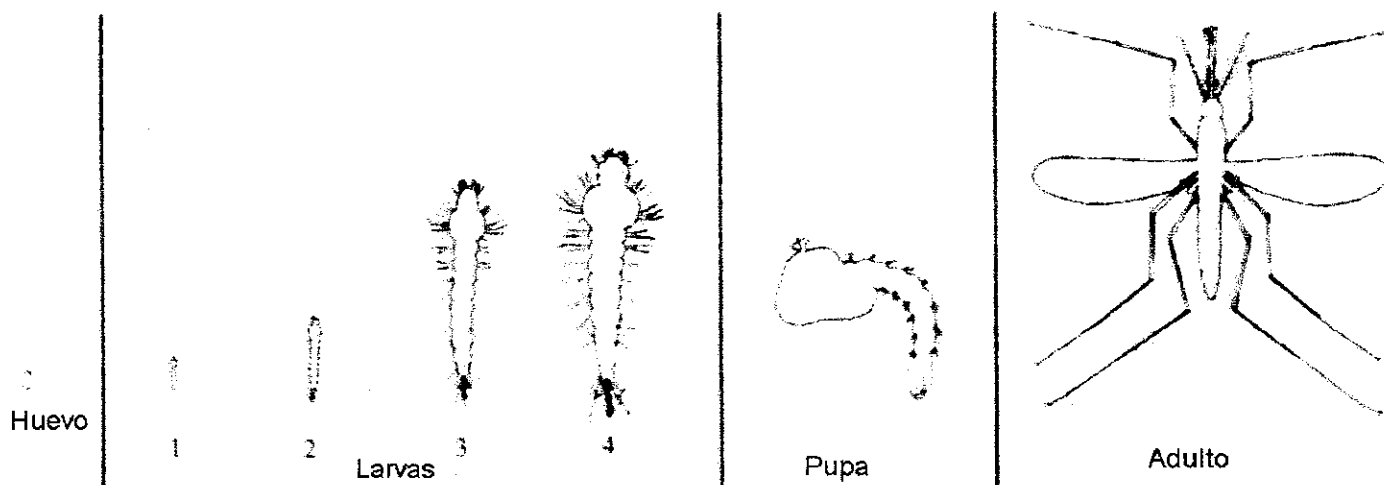
La fuente de la cual los anofelinos obtienen la sangre para alimentarse es el huésped. El lugar donde los anofeles se encuentran reposando durante el día constituyen los lugares de reposo (Godoy y García, 1980).

Los anofelinos pueden alimentarse indistintamente de sangre humana (antropofagia) o de animales (zoofagia); parece ser que la última es su elección. Los lugares de reposo durante el día pueden ser dentro de las habitaciones de la gente (endofilia), o en establos (refugios de animales) o en cuevas, troncos, etc. (refugios naturales). Esta muy bien definido que los mosquitos para alimentarse de sangre humana entran a los domicilios; algunos reposan antes de picar y lo hacen directamente, pero un su mayoría, una vez alimentados (ingurgitados) buscan alguna superficie cercana para reposar (Godoy y García, 1980).

Con respecto al huésped humano se puede decir que ninguna persona esta libre de contraer malaria. No existe ninguna inmunidad específica y lo que algunos conocen como tal no es

más que cierto grado de tolerancia que tienen las personas que viven permanentemente en áreas maláricas y generalmente después de haber tenido muchas infecciones (Godoy y García, 1980).

Figura 5
Metamorfosis completa del mosquito Anopheles.
(Katz, et.al.1982)



El mosquito anopheles presenta metamorfosis completa en su desarrollo con estadios inmaduros que son acuáticos, éstos comienzan como huevos en la superficie del agua y se desarrollan pasando por cuatro estadios de larva y un solo estadio de pupa hasta llegar a un adulto alado sexualmente maduro (Katz, et.al.1982).

5. Control de la enfermedad

La administración o aplicación de agentes tóxicos para reducir la población de insectos vectores incluye drogas que previenen y curan enfermedades, insecticidas usados para reducir poblaciones de vectores y sustancias inorgánicas que son tóxicas, ya sea para el hospedero o para el parásito. Básicamente, estas sustancias químicas interfieren con la fisiología normal del organismo blanco. El efecto es a un nivel celular y puede interferir con la síntesis de ácidos nucleicos, estructura de la membrana, funciones mitocondriales y otras (Marquardt, 1996).

La inducción de inmunidad natural o artificial hacia el patógeno se desarrolla a través del contacto con el parásito, o puede ser inducida artificialmente a través de la vacunación. En la mayoría de circunstancias, cuando se da la enfermedad, el hospedero se ve dañado; si sobrevive, usualmente será inmune por un período de tiempo, a menudo de por vida. La inmunidad puede ser usada para proteger al individuo y a la población de un agente infeccioso. Las poblaciones están protegidas cuando un cierto porcentaje de los hospederos han sido inmunizados; sin embargo, en algunos casos como el de la malaria, más del 99% de la población debe tener inmunidad para prevenir la transmisión de la enfermedad. Otras opciones son la reducción de la población de hospederos y de la población de vectores

(Marquardt, 1996).

Otro método para controlar las enfermedades transmitidas por vectores es cambiar físicamente el ambiente para hacer desfavorable la supervivencia del parásito o del vector. En cuanto a vectores, la reducción de la fuente es un método de manejo. La reducción de la fuente consiste en un cambio físico en el ambiente que dificulta la supervivencia o reproducción del vector, por ejemplo, al reducir la basura doméstica se reduce la población de moscas (Marquardt, 1996).

También deben evitarse áreas o actividades de alto riesgo, esto involucra cambiar el comportamiento del hospedero para que la probabilidad de contacto con el vector sea reducida (Marquardt, 1996).

La cuarentena se usa para individuos con infecciones especialmente virulentas que pueden ser transmitidas a otros, también es muy común el uso de barreras físicas, como los mosquiteros, para evitar contacto con el parásito o con el vector (Marquardt, 1996).

El método de control biológico se define como el uso de parásitos y predadores para controlar vectores de agentes infecciosos. Este incluye el uso de virus, bacterias, protozoos, otros artrópodos predadores y peces contra las poblaciones de vectores tales como mosquitos, mosca tse tse y otros (Marquardt, 1996).

El control genético consiste en inducir un cambio genético ya sea en el hospedero o en el vector, por métodos naturales y artificiales. Hasta ahora sólo se ha alcanzado un éxito muy modesto en inducir cambios en vectores para controlar enfermedades. Un ejemplo de control genético es la técnica del macho estéril (Marquardt, 1996).

Debido a que todos los animales y los humanos, viven en una nube de agentes infecciosos, un modo de reducir la incidencia de las enfermedades es separar a los individuos jóvenes ya que usualmente estos son susceptibles a casi todo tipo de parásitos y pueden sucumbir si son expuestos a muchos agentes a la vez. Sin embargo, si la exposición es limitada en el número y especie de organismos infecciosos, los individuos jóvenes tienen la oportunidad de desarrollar inmunidad (Marquardt, 1996).

B. Genética de insectos

Los genomas eucariotas son complejos y consisten en secuencias únicas, mediana y altamente repetitivas. El tamaño varía de acuerdo con los organismos, con un rango de 0.2 a 2.0 pg de ácido desoxirribonucleico (ADN) y en algunos casos es flexible, exhibiendo variación en tamaño dentro de la misma especie; además existen diferencias en la frecuencia de los diferentes tipos de secuencias (Knudson, et. al., 1996).

1. Genes y secuencias únicas

Los genes son unidades de herencia en los cromosomas, consisten en una secuencia de nucleótidos en la molécula de ADN que desarrolla una función específica, como codificar para una molécula de ácido ribonucleico (ARN) que luego será utilizada para sintetizar un polipéptido (Curtis and Barnes, 1989).

La mayoría de la información genética está contenida en ADN de secuencia única. Algunas veces está presente en copias múltiples en células o tejidos específicos de los insectos; esto sucede por dos motivos, si las células son poliploides o a través de la amplificación genética. La amplificación genética parece ser el mecanismo por el cual se producen grandes cantidades de material genético en un período relativamente corto de

tiempo (Hoy, 1994).

Algunos genes de vectores han sido clonados, caracterizados y secuenciados. Los genes de interés particular son aquellos involucrados en la competencia del vector, búsqueda de hospedero, en genes expresados o inducidos por alimentarse de sangre y en genes expresados en las glándulas salivares ya que éstos podrían ser sujeto de modificación para el control genético de vectores (Knudson, et. al., 1996).

2. Secuencias medianamente repetitivas

Las secuencias de ADN moderadamente repetitivas consisten en secuencias que se repiten desde una docena hasta cientos de veces y a menudo ocurren dispersas dentro de ciertas regiones de secuencias únicas o en largos bloques. Por ejemplo, el ADN repetitivo en genomas de mosquito comprende entre el 20 y 84% y es probablemente responsable de la mayoría de las variaciones en el tamaño del genoma. Esta información es necesaria para entender el posible rol del ADN repetitivo en la organización estructural de cromosomas así como para desarrollar sondas útiles para mapeo de genes (Knudson, et. al., 1996).

El ADN medianamente repetitivo incluye genes que codifican para ARN ribosomal, ARN de transferencia, histonas, elementos móviles y familias de multigenes como actinas, genes de cutícula, genes de shock térmico, genes de suero de larva, genes de seda y genes de proteínas de la yema. Una solución alternativa para producir grandes cantidades de producto genético en poco tiempo y en forma coordinada es duplicar el gen (Hoy, 1994).

Los microsátélites o secuencias repetitivas simples (conocidas por las siglas "SSR" del término en inglés "simple sequence repeats") de ADN consisten en copias repetidas consecutivas de una secuencia corta de nucleótidos. Estas se encuentran ampliamente dispersas en la mayoría del genoma en muchos eucariotas y pueden ocurrir tan frecuentemente como una vez cada 10kbases; usualmente se localizan fuera del marco de lectura libre (Knudson, et. al., 1996).

En las secuencias microsátélites ocurre gran polimorfismo, lo cual permite su uso para estudiar las relaciones existentes entre individuos dentro de una misma población y entre poblaciones diferentes, también para mapeo genómico y estudios de ligamiento. El largo de los polimorfismos puede originarse de un entrecruzamiento desigual, intercambio desigual de cromátidas gemelas, o traslapes de bandas durante replicación o reparación de ADN. La función de las secuencias microsátélites no se conoce aún (Knudson, et. al., 1996).

Las secuencias minisátélites, también conocidas como número variable de repeticiones consecutivas (o "VNTR" por el término en inglés "Variable Number of Tandem Repeats") son regiones hipervariables más complejas de ADN, y se encuentran dispersas en numerosos sitios del genoma. Exhiben polimorfismo debido a un número variable de repeticiones consecutivas de una secuencia corta, de 10 a 15 pares de bases. Las secuencias minisátélites proveen información del tipo huella digital de los organismos (Knudson, et. al., 1996).

Los elementos móviles consisten en secuencias de ADN capaces de moverse de un lugar a otro dentro del genoma al retener una copia en la localización original, consecuentemente, aparecen en diversos sitios dentro de las bandas. La proporción del genoma que consiste en elementos móviles varía en las diferentes especies pero se encuentran en un promedio del 10%. Existen dos tipos principales de elementos móviles, los transposones que se mueven de ADN hacia ADN y los retrotransposones que se mueven desde un ARN intermediario.

Este tipo de secuencias son de mucho interés porque pueden usarse para insertar genes extraños dentro de un organismo en experimentos de mutagenesis, o para diseminar un gen a través de una población de vectores (Knudson, et. al., 1996).

El ácido desoxirribonucleico ribosomal (rADN) consiste en repeticiones consecutivas y está presente de 100 a 1000 copias en la mayoría de vectores. Una repetición de rADN consiste en un espaciador intergénico, seguido por la región transcrita, la cual es postranscripcionalmente procesada para formar las subunidades ribosomales de rRNA. La variación genética de rADN ha sido estudiada para determinar variación dentro y entre las poblaciones de mosquitos (Knudson, et al., 1996).

3. Secuencias altamente repetitivas

El ADN altamente repetitivo está usualmente presente de miles a millones de copias y en largas repeticiones consecutivas de secuencias relativamente simples. También se las conoce como secuencias satélites (Knudson, et. al., 1996).

La función de estas secuencias no se conoce bien pero se ha asociado con la heterocromatina en los centrómeros y en los telómeros y se cree que podría ser importante en el empareamiento de cromosomas (Hoy, 1994).

C. Genética de poblaciones

La genética de poblaciones es el estudio de la variación genética en poblaciones naturales y de los factores que influyen en esta variación. Conocer la variación genética en poblaciones de vectores es fundamental para comprender el papel del vector en la epidemiología de la enfermedad. Los factores que modelan la variación genética en las especies de vectores también imprimen variación en la capacidad del vector y su competencia (Tabachnick and Black, 1996).

1. Poblaciones naturales

Población natural se define como un grupo adaptado y adaptable de organismos de la misma especie que ocupan un área natural de tamaño suficiente para que la reproducción y supervivencia de la especie sea capaz de mantener a la población por muchas generaciones y de permitir comportamientos normales de dispersión y migración (Huffaker and Rabb, 1984).

La regulación de la población puede resultar de un solo factor o de una combinación de factores actuando en conjunto o secuencialmente. Las condiciones físicas como el aire y el agua producen influencia directa e indirecta sobre los organismos. El sol, el suelo, el clima y las condiciones meteorológicas pueden determinar el éxito o fracaso de los individuos de una población. Estos factores son necesarios e influyen en la velocidad de cambio de todos los demás factores, por consiguiente determinan las características inmediatas del ambiente del organismo, los factores esenciales de alimento y sitio en el cual vivir. Al mismo tiempo estos influyen la velocidad de cambio de la población, al actuar directamente sobre la natalidad, mortalidad y migración e indirectamente modifican otros factores ambientales (Huffaker and Rabb, 1984).

Los mecanismos reguladores por definición resultan de una retroalimentación negativa en respuesta a cambios en la densidad de la población. Un factor dependiente de la densidad se

define como cualquier factor cuyos efectos adversos en la población aumentan a medida que la densidad de la población crece y disminuyen a medida que la densidad de la población decrece, creando una retroalimentación que tiende a regular la densidad de la población (Huffaker and Rabb, 1984).

La regulación del crecimiento de una población en términos de densidad surge simplemente del hecho de que a medida que aumenta el tamaño de la población automáticamente se consumen u ocupan completamente los recursos necesarios, se saturan los lugares donde vivir, se atraen y generan (como resultado de su propio incremento en densidad) elementos en el ambiente o en la misma población que son negativos para ellos como productos de desecho, predadores, parásitos, enfermedades, interferencias mutuas o deterioro en calidad de la especie (Huffaker and Rabb, 1984).

Los factores reguladores dependientes de la densidad, actúan colectivamente o por sí solos y tienden a causar que la densidad de la población regrese a un nivel característico. A medida que una población se desplaza de su equilibrio teórico de densidad, los factores reguladores ganan fuerza (Huffaker and Rabb, 1984).

Este concepto general de regulación de la población también se aplica al caso específico en el cual una población es controlada por sus enemigos naturales. A medida que la población crece se incrementa la competencia por los lugares para esconderse o las posibilidades de escape y el riesgo de captura aumenta. El predador encuentra más alimento porque es más fácil de capturar y entonces se reproduce mucho más, y esta población incrementada del predador luego pone mayor presión en la población original (Huffaker and Rabb, 1984).

2. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Los factores responsables de la estructura genética de una población, pueden ser descritos por el "Equilibrio Castle-Hardy-Weinberg", más conocido como equilibrio de Hardy-Weinberg. Esta ley establece que una población está en equilibrio genético, en ausencia de selección, reproducción no aleatoria y migración, y que permanece constante de una generación a otra (Beaty and Marquardt, 1996; Curtis and Barnes, 1989; Mettler et al., 1988; Hartl, 1988; Hartl and Clark, 1989).

El planteamiento de Hardy-Weinberg resume los factores responsables de los cambios en las frecuencias génicas de cualquier población: reproducción no aleatoria, tamaño de la población, migración, mutaciones, selección natural, flujo de genes y barreras biológicas. Se pueden examinar las frecuencias de genotipos para determinar si una población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Este equilibrio puede verse como una hipótesis nula acerca de los factores antes descritos. Si cualquiera de ellos afecta significativamente las frecuencias, la población no estará en equilibrio (Beaty and Marquardt, 1996).

Para determinar si una población está en equilibrio de Hardy Weinberg, se toma una muestra de cierto número de individuos y se estiman las frecuencias alélicas y genotípicas. Los números observados y los esperados se comparan usando una prueba no paramétrica tal como el χ^2 . Cuando se analizan varios locus diferentes se obtiene una descripción mas exacta de la población (Beaty and Marquardt, 1996).

Cuando se analiza si una población está en equilibrio se asume que la muestra de individuos proviene de una población con cruzamiento aleatorio o panmítica. Si la muestra es de hecho una mezcla de dos poblaciones genéticamente diferentes, la población puede no encontrarse en equilibrio de Hardy-Weinberg (Beaty and Marquardt, 1996).

Si se observa una heterocigocidad reducida, ésto puede ocurrir debido al efecto de Wahlund, que consiste en la toma de muestras de más de una población simultáneamente. La magnitud de este efecto depende de la magnitud de las diferencias genéticas entre las poblaciones. En la medida en que más se diferencian las frecuencias de los genes, mayor será la disminución de la heterocigocidad observada con respecto a la esperada (Beaty and Marquardt, 1996).

a. Factores que influyen la variación genética

El factor de reproducción no aleatoria, permite determinar la supervivencia o la pérdida de un alelo específico, porque hay selección o porque la población es pequeña (Beaty and Marquardt, 1996; Curtis and Barnes, 1989; Mettler et al., 1988; Hartl, 1988; Hartl and Clark, 1989).

Cuando los genotipos dentro de una población no se cruzan al azar, sucede lo que se conoce en inglés como "assortative mating" o "cruce sesgado". Los individuos con genotipos similares o idénticos se cruzan de preferencia en orden positivo. Alternativamente, los individuos con genotipos diferentes de preferencia se cruzan en orden negativo. El cruce de orden positivo es más común. El efecto general del cruce de orden positivo dentro de una población es la reducción en el número de heterocigotos en cada generación, hasta llegar un punto en el que el número de individuos heterocigotos alcanza el cero (Beaty and Marquardt, 1996).

El término endogamia se refiere al cruce entre parientes y tiene un efecto similar al cruce de orden positivo. Cuando los parientes se cruzan, puesto que comparten características y alelos similares, suceden alelos con mayor frecuencia que si se cruzaran las parejas escogidas en la población al azar. Este fenómeno puede ser forzado en una población por capacidades limitadas de dispersión o por recursos limitados. En contraste con el cruce de orden positivo, esto ocurre sin importar el genotipo, pero el resultado también es un aumento en la homocigocidad. Debido a que los parientes pueden ser una muestra pequeña en comparación a la población en general, el cruce entre parientes también puede ser visto como un cruce entre poblaciones pequeñas. La proporción en la cual la homocigocidad se eleva es una función del grado de parentesco entre las parejas que se cruzan (Beaty and Marquardt, 1996).

El equilibrio de Hardy-Weinberg asume una población infinita o de tamaño muy grande y constante. Las poblaciones pequeñas pueden ocasionar cambios tanto en las frecuencias alélicas como en las genotípicas. Mientras el tamaño de la población se reduce, la frecuencia de genes para la siguiente generación aumenta debido a la deriva genética (Beaty and Marquardt, 1996).

La deriva genética es el cambio al azar en las frecuencias alélicas de una población pequeña debido a probabilidad, que conduce a una pérdida de variación genética en la población (Beaty and Marquardt, 1996; Curtis and Barnes, 1989; Mettler et al., 1988; Hartl, 1988; Hartl and Clark, 1989). La deriva genética afecta la heterocigocidad observada de la población, reduciéndola debido al tamaño de la misma. Cuando ésto sucede, se dice que ciertos alelos se han "fijado" en la población debido a que en ausencia de migración no habrá más fluctuaciones en la frecuencia de dicho alelo (Beaty and Marquardt, 1996).

Cuando una población aislada emerge de un número limitado de individuos, usualmente hay un cambio en las frecuencias de los genes. Muchas especies de vectores probablemente ocurren debido a fluctuaciones estacionales tales como calor, congelamiento, sequía o esfuerzos humanos orientados al control de los mismos y la

población se vuelve más pequeña. En esta situación, la probabilidad al azar y la deriva genética tienen consecuencias muy significantes en las frecuencias de genes de la nueva población aislada (Beatty and Marquardt, 1996).

Los efectos del tamaño reducido de la población junto con la deriva genética representan un importante componente para entender la variación genética en poblaciones naturales de vectores artrópodos. En contraste con el cruce de orden positivo, el cual afecta únicamente a un locus en particular, el tamaño reducido de la población y la deriva genética afectan al genoma completo, incluyendo aquellos aspectos importantes para la capacidad vectorial y la competencia (Beatty and Marquardt, 1996).

La migración, que es la introducción de nuevos genes a una población vecina, provoca un aumento de la variabilidad genética (Beatty and Marquardt, 1996; Curtis and Barnes, 1989; Mettler et al., 1988; Hartl, 1988; Hartl and Clark, 1989).

Cuando dos poblaciones se diferencian en sus frecuencias de genes e intercambian migrantes, las frecuencias de genes en cada población va a cambiar dependiendo de la proporción de los individuos que migran. Si el intercambio de migrantes es continuo, eventualmente se espera que las dos poblaciones alcancen frecuencias similares de genes. El intercambio de individuos con capacidad de cruce entre poblaciones se conoce como flujo de genes. El flujo de genes causa que las poblaciones se vuelvan genéticamente similares (Beatty and Marquardt, 1996).

La proporción de migrantes relativa al total de la población se llama razón de migración y se denota m . La razón de migración determina que tan rápido la migración va a causar que las poblaciones se vuelvan genéticamente similares. El valor de m es un parámetro importante para las enfermedades transmitidas por vectores artrópodos porque estima el potencial de diseminación del patógeno a través del vector de una población a otra (Beatty and Marquardt, 1996).

La transferencia de genes entre grupos es posible siempre, pero aumenta su probabilidad a medida que las poblaciones están más íntimamente relacionadas, espacial y geográficamente. El flujo de genes es alto entre poblaciones adyacentes de la misma especie. Cuando las frecuencias de genes son similares, el flujo de genes entre las poblaciones no altera mucho las frecuencias preexistentes o induce nuevos alelos. Si las poblaciones cubren áreas muy amplias, la migración podría no afectar a toda la población del mismo modo, y podría establecerse un gradiente fenotípico para algún carácter particular. Los gradientes fenotípicos son establecidos por el flujo de genes entre las poblaciones bajo presiones de selección diferenciales (Mettler et al., 1988).

Al espacio donde habita una población, se le llama territorio. En general, las especies no tienen territorios idénticos ni estos territorios están muy apartados entre sí, sino suelen ser adyacentes aunque divididos por una barrera geográfica de naturaleza diversa, como una cordillera o un desierto. Existen distintos tipos de barreras biológicas; éstas difieren una de otra en cuanto a su capacidad de ser penetradas, es decir, de prevenir cualquier tipo de intercambio de grupos o poblaciones, y en cuanto a su efecto sobre cada organismo. Los tipos de barreras de reproducción son: geográficas, genéticas y ecológicas. Las barreras geográficas incluyen cordilleras, montañas, ríos y desiertos. Las barreras genéticas son el resultado de mutaciones que pudieron causar esterilidad tras un período prolongado de aislamiento geográfico y las barreras ecológicas se dan entre dos grupos de organismos que viven en la misma área geográfica pero ocupan diferente hábitat o lugar donde se encuentra una especie (Villemet et al., 1992).

Las poblaciones que están separadas por barreras geográficas son más independientes que

las poblaciones adyacentes; el flujo de genes entre ellas está restringido por barreras geográficas, y la selección diferencial puede conducir a la adaptación local. Los alelos pueden fijarse o estar presentes en frecuencias muy diferentes en las poblaciones. El flujo de genes entre poblaciones aisladas por barreras geográficas es por definición un evento raro, pero cuando ocurre es muy significativo, los complejos de genes pueden romperse, las frecuencias de alelos se ven alteradas, y dependiendo de la cantidad de migración, las diferencias genéticas entre las poblaciones se reduce; esta última es especialmente importante cuando se establece un contacto completo luego de remover una barrera natural (Mettler et al., 1988).

Las mutaciones afectan la frecuencia genética y consisten en cambios hereditarios en el ADN que ocurren en un locus o posición del gen en el cromosoma donde se encuentra o reside una característica específica (Beatty and Marquardt, 1996; Curtis and Barnes, 1989; Mettler et al., 1988; Hartl, 1988; Hartl and Clark, 1989).

La mutación de alelos en formas variadas es una fuente de material genético nuevo. El efecto sobre la variación genética depende de la velocidad de mutación (μ). No se estima que las mutaciones por si solas sean suficientes como para jugar un papel de mayor importancia en la genética de poblaciones. En las secuencias repetitivas la mutación es mayor, debido a que estas secuencias no codifican para un producto genético y por consiguiente, no están bajo presión selectiva (Beatty and Marquardt, 1996).

El factor de selección natural se refiere a que algunos genotipos están mejor adaptados a su ambiente que otros gracias a su mayor habilidad para sobrevivir y reproducirse en este ambiente. La selección natural es el proceso por el cual los genotipos con mejor adaptación se reproducen y proliferan más que los genotipos menos adaptados. Debido a la selección natural, los alelos favorables que promueven adaptaciones, serán sobre expresados en las generaciones siguientes, las cuales triunfan. A medida que estos alelos favorables aumentan su frecuencia dentro de la población, más de los genotipos mejor adaptados que se forman. Como resultado, los tipos y frecuencias de alelos en la población gradualmente cambia hasta promover mejor adaptación al ambiente (Hartl and Clark, 1989).

Se considera que los marcadores de secuencias repetitivas son neutrales en cuanto al impacto de la selección natural, y la variación de sus frecuencias de genes es mayormente causada por migración, mutación, tamaño de la población y deriva genética (Beatty and Marquardt, 1996).

3. Variación genética

Como se mencionó anteriormente la variación hereditaria en poblaciones es el producto de varias fuerzas: mutaciones, migración de individuos entre poblaciones, recombinación genética, replicación intracelular y movimiento de elementos móviles de ADN. Estas fuerzas, junto con la selección natural, forman el patrón de variación. El origen, mantenimiento y forma de los patrones de variación en poblaciones son la esencia de la evolución (Mettler et al., 1988).

La variación es sólo una forma de expresar que las diferencias existen entre individuos. Los caracteres por los cuales los individuos difieren usualmente caen dentro de dos categorías, rasgos cuantitativos y mendelianos. Los rasgos mendelianos son caracterizados por fenotipos discretos que no se traslapan, mientras que los rasgos cuantitativos exhiben una distribución continua. Cuando una o más formas de rasgos mendelianos están presentes en una población con altas frecuencias, la población es polimórfica. Los genes

obviamente difieren en su modo de acción y en sus efectos en el fenotipo. Deben ser estos diferentes modos de acción los que dan origen a la distinción entre rasgos mendelianos y cuantitativos. Algunos investigadores han especulado que los genes de rasgos cuantitativos son reguladores y que los genes de rasgos mendelianos son estructurales (Mettler et al., 1988).

Dentro de una población, la variación es generalmente definida en términos de diferencias individuales a partir del promedio de la población para rasgos cuantitativos, y en términos de frecuencias de fenotipos mutantes o genes mutantes en el caso de rasgos mendelianos. La variación entre poblaciones separadas geográficamente se expresa usualmente como diferencias entre las medias de rasgos cuantitativos, y como diferencias en frecuencias de genes o genotipos para rasgos mendelianos (Mettler et al., 1988).

Cualquiera sea la cantidad de variación genética que pueda existir, se ha encontrado que es suficiente (en los genes que se han estudiado) como para establecer que en la mayoría de las poblaciones, no existen dos individuos con el mismo genotipo para todos sus genes (exceptuando gemelos idénticos u otros nacimientos idénticos y múltiples) (Hartl, 1988).

a. Métodos utilizados para su estudio

Mucha de la genética de poblaciones fue inicialmente teórica debido a que sólo los mutantes morfológicos estaban disponibles, y éstos a menudo son segregados como marcadores recesivos. Los estudios empíricos requerían de técnicas que permitieran la identificación de ambos alelos en un individuo. En el cuadro a continuación se presenta una lista de los métodos disponibles para identificar variación genética en poblaciones naturales y de la información genotípica que estos proveen (Tabachnick and Black, 1996).

Cuadro 1

Métodos utilizados para identificar la variación genética en poblaciones naturales y fenotipos asociados con los alelos que se detectan en cada método
(Tabachnick and Black, 1996; Dowling, et.al., 1996)

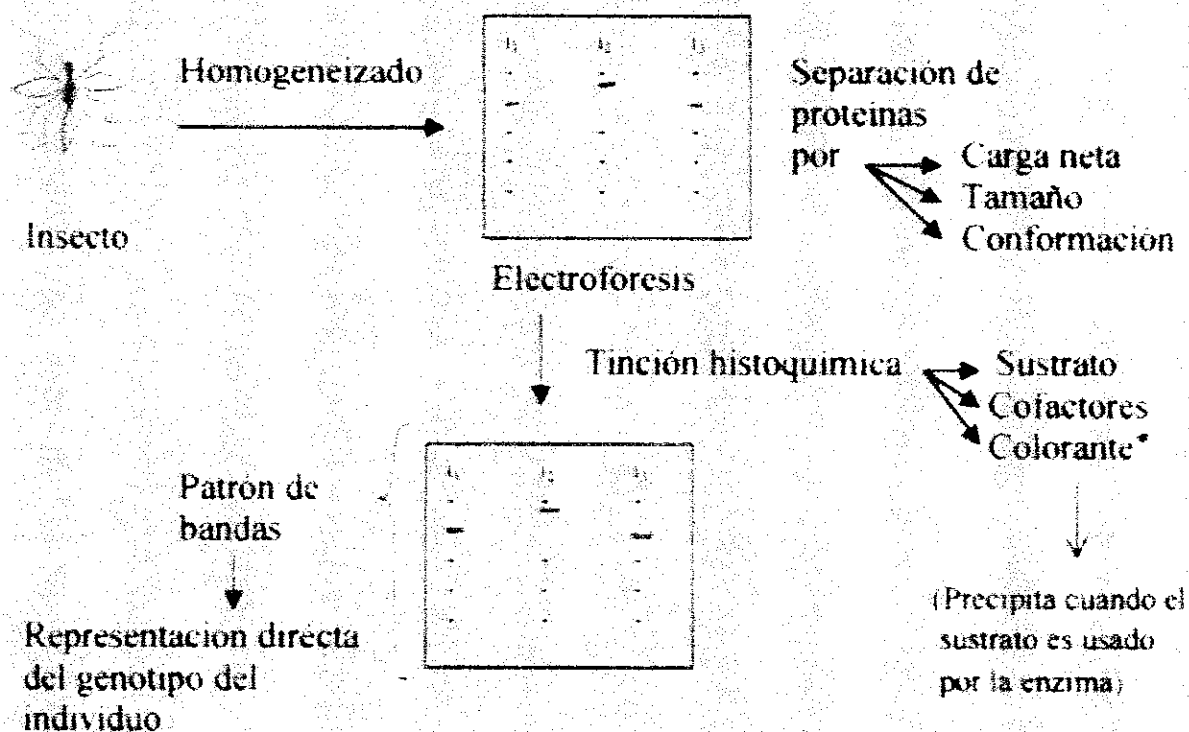
Métodos	Información genotípica
Mutantes morfológicos	Recesiva
Inversiones cromosómicas	Codominante
Isoenzimas (aloenzimas)	Codominante
Marcadores de ADN:	
Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)	Codominante
ADN amplificado arbitrariamente (RAPD-PCR, AP-PCR)	Dominante
Polimorfismo en el largo de secuencias simples (SSLPs)	Codominante
Microsatélites	Codominante
Otros	
Secuenciación de nucleótidos	Codominante

Cuando ambos alelos se detectan por un método en particular, se dice que segregan como codominantes.

Los análisis de las variantes estructurales en los cromosomas, principalmente las inversiones cromosómicas, han sido muy utilizados para realizar estudios de varias especies de *Anopheles*, pero hasta ahora la mayoría de datos existentes de genética de poblaciones han sido adquiridos a través del uso de electroforesis de isoenzimas (Tabachnick and Black, 1996).

Las variantes de una enzima específica se llaman isoenzimas, y los variantes alélicos en el locus de una enzima individual se llaman aloenzimas. En la electroforesis de isoenzimas, se prepara un homogenizado de un insecto individual y los componentes de éste se separan en un soporte como acrilamida, acetato de celulosa o geles de almidón. Cuando las proteínas se aplican sobre estos soportes y se someten a un campo eléctrico, migran diferencialmente de acuerdo con su tamaño, conformación y carga eléctrica neta; la cual es dependiente del contenido de aminoácidos. Las enzimas con diferente número de grupos básicos o ácidos migran diferente en el campo eléctrico. Una vez que la electroforesis ha corrido, el gel contiene todas las proteínas del individuo separadas por su carga y tamaño. Las enzimas de interés pueden ser visualizadas en el gel usando la actividad de tinción histoquímica. Este tinte contiene al sustrato y a los cofactores para la enzima en particular, junto con un colorante que precipita cuando el sustrato es utilizado por la enzima. El colorante precipita en la región del gel que contiene a la enzima de interés. El patrón de aloenzimas en un gel es una representación directa del genotipo del individuo (Tabachnick and Black, 1996).

Figura 6
Descripción general del método de isoenzimas
(Tabachnick and Black, 1996)



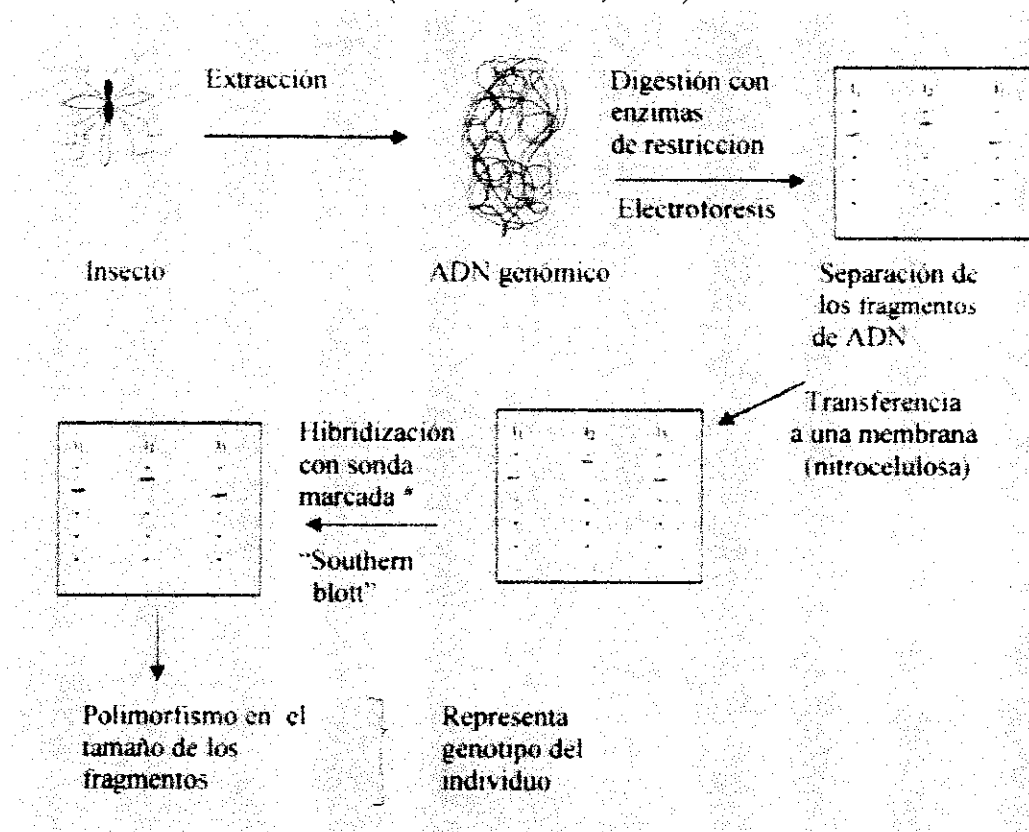
codominantes o marcadores mendelianos (Knudson, et. al., 1996).

Los análisis de "RFLP" están limitados porque sólo pueden estudiar una porción del genoma que contiene los sitios de restricción que se examinan. Cuando se requiere la comparación entre dos individuos íntimamente relacionados, los "RFLP" podrían no proveer suficientes marcadores que sean discriminativos. Otra desventaja del uso de "RFLP" con insectos es que sólo puede extraerse cantidades limitadas de ADN de cada individuo (0.5 a 3g) y para la hibridización se requiere la mayoría del ADN genómico, comparado con los 5 ng o menos requeridos para los análisis de polimorfismo basados en "PCR". Además, el tiempo necesario para completar un experimento y el hecho de que se utilizan sondas marcadas radiactivamente para ganar sensibilidad en la detección también son desventajas, especialmente cuando se requieren múltiples ensayos de un solo individuo (Knudson, et. al., 1996).

Algunos marcadores de "RFLP" con longitud pequeña pueden convertirse en ensayos basados en "PCR" cuando las secuencias externas de "ADN" pertinentes a los dos sitios de restricción son conocidas. El ADN genómico es usado como un molde para la amplificación con "PCR" que usa oligonucleótidos iniciadores que delimitan a la región "RFLP". Luego de la electroforesis y el aislamiento de la banda, el ADN purificado puede cortarse usando endonucleasas de restricción y luego se analiza por electroforesis en gel (Knudson, et. al., 1996).

Figura 7

Descripción general de la técnica para el estudio de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (Knudson, et. al., 1996)



El desarrollo relativamente reciente en la detección de polimorfismos de ADN involucra el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar regiones arbitrarias del genoma usa un iniciador único. Esta técnica conocida como "RAPD-PCR", utiliza un inicial de 10 bases para producir una colección (propia del genotipo) de fragmentos amplificados de ADN. Altera una sola base en el iniciador, puede obtenerse un patrón completamente diferente de ADN amplificado. Se reportó un incrementado número de polimorfismos a través del uso de múltiples iniciadores de 10 bases en una sola reacción (Knudson, et. al., 1996).

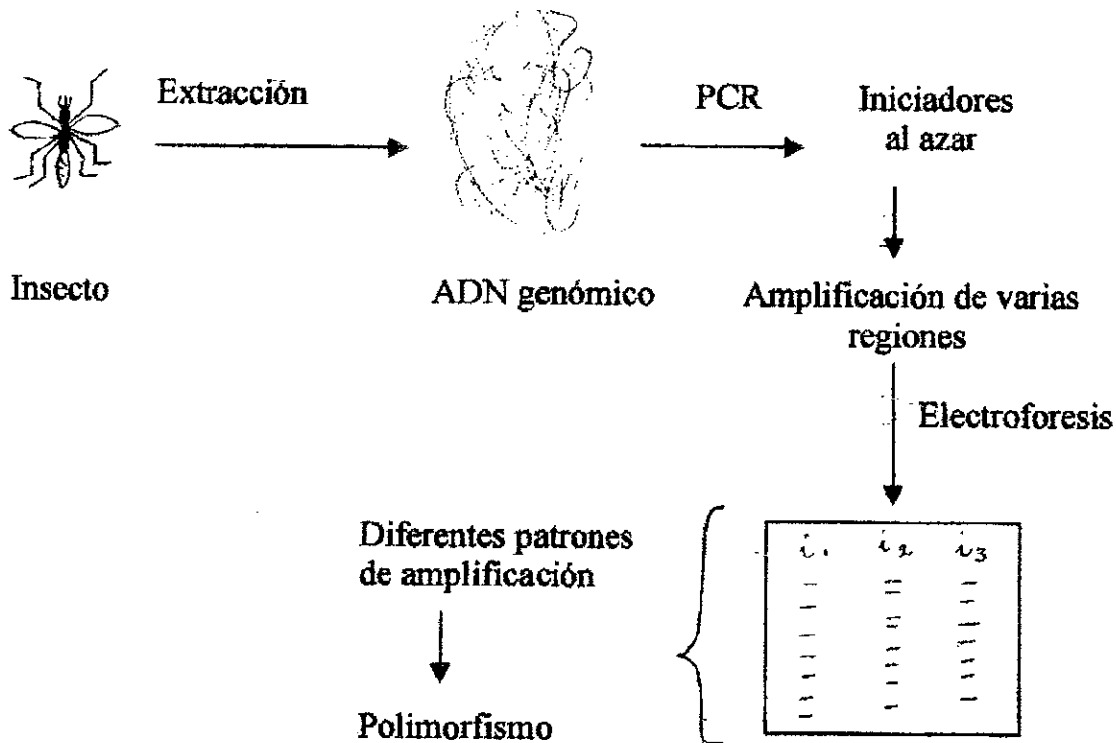
El polimorfismo de ADN detectado por "RAPD-PCR" probablemente surge por varias causas. Una mutación, inserción o deleción que resulta en la creación o destrucción de un sitio en donde se hibridiza la secuencia iniciadora puede causar polimorfismos. Además pueden surgir por una inserción entre dos sitios de iniciación, alejándolos demasiado como para una amplificación exitosa, pérdida de la banda, o por una inserción o deleción entre dos sitios de iniciación, lo cual altera el largo del fragmento amplificado sin afectar la amplificación (Knudson, et. al., 1996).

Los marcadores de "RAPD" son casi siempre marcadores dominantes. Los individuos heterocigotos con una sola copia de la secuencia amplificable son indistinguibles de un homocigoto con dos copias. Puesto que los marcadores de "RAPD" se generan al azar, pueden representar ya sea secuencias únicas o repetitivas (Knudson, et. al., 1996).

Los marcadores de "RAPD" han sido usados para varias aplicaciones. Se encontró que revela variabilidad genética en diversas especies en las cuales otros métodos como el análisis de aloenzimas no resultaron. También pueden usarse para identificar "RFLPs" tradicionales (Knudson, et. al., 1996).

El uso de "RAPD-PCR" tiene muchas ventajas para detectar polimorfismos de ADN sobre otras pruebas moleculares. No se requiere información acerca de la secuencia de nucleótidos del ADN blanco para una amplificación exitosa, y sólo un iniciador al azar es necesario para la reacción. El proceso requiere pequeñas cantidades de ADN, lo cual permite que las muestras se dividan y se usen en otros experimentos. El "RAPD-PCR" puede elaborarse de inicio a fin en menos de 24 horas sin el uso de materiales radioactivos o hibridizaciones; pero el patrón de bandas que se obtiene es sensible a las condiciones del experimento por consiguiente las condiciones reproducibles son un requisito para obtener resultados consistentes (Knudson, et. al., 1996).

Figura 8
 Descripción general de la técnica para el estudio de los polimorfismos en el ácido
 desoxirribonucleico arbitrariamente amplificado
 (Knudson, et. al., 1996)



i. Microsatélites

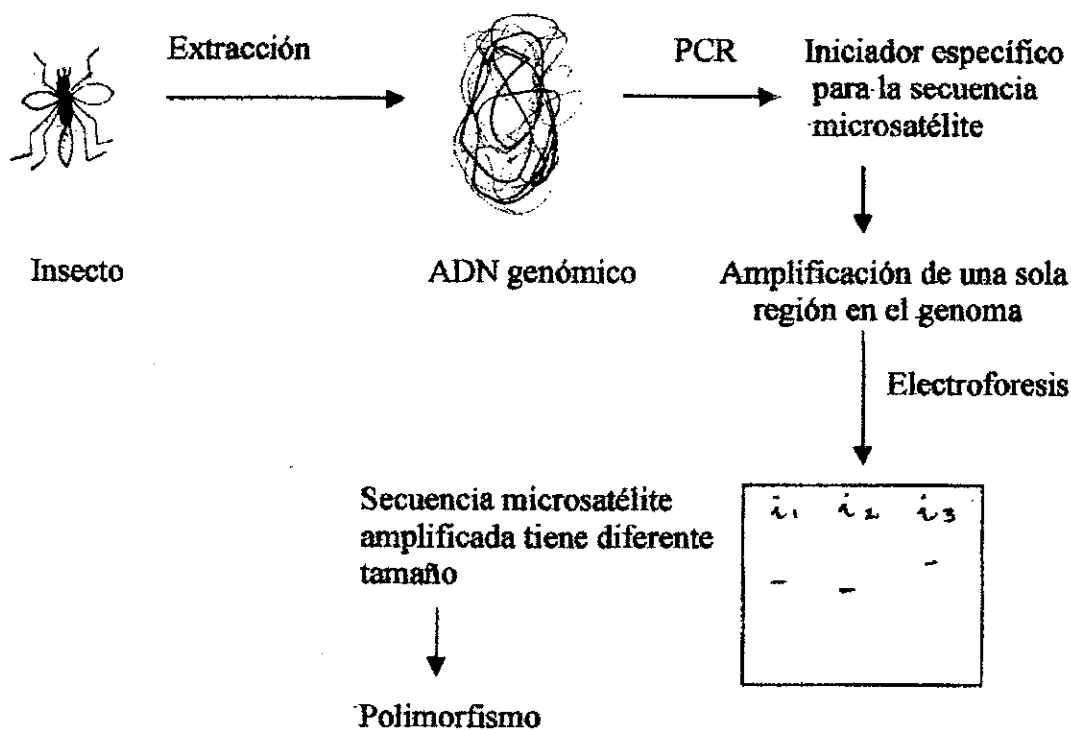
Las secuencias simples repetitivas conocidas como "SSR" por las siglas del término en inglés "Simple Sequence Repeats" o microsatélites, como $(dG-dT)_n$ han mostrado ser excelentes marcadores porque son muy polimórficos, están ampliamente distribuidos en el genoma y son codominantes. La identificación de secuencias microsatélites de librerías genómicas se facilita al probar con sondas sintéticas marcadas complementarias a las secuencias microsatélites blanco. Los clones positivos son secuenciados y si se sabe la secuencia única que delimita al microsatélite se puede diseñar iniciadores para realizar ensayos basados en "PCR". Estos ensayos permiten la rápida detección de microsatélites en las poblaciones a partir de pequeñas cantidades de ADN molde sin la necesidad de hibridización (Knudson, et. al., 1996).

En la mayoría de los casos, la interpretación de los microsatélites se realiza como alelos codominantes. Los productos de PCR se corren en la electroforesis adyacentes a secuencias conocidas de modo que el tamaño preciso de cada producto pueda ser determinado. En la mayoría de los casos, hay una considerable sombra debajo de la banda principal en el gel que se cree es debido a un fenómeno conocido en inglés como "replication slippage" durante la reacción de PCR, las mutaciones somáticas podrían ser otra alternativa. Los fenotipos deben leerse cuidadosamente para identificar a los

individuos heterocigotos y homocigotos; el patrón típico para un homocigoto es una banda dominante y dos sub bandas con dos pares de bases de separación, un heterocigoto presentará dos bandas similares en intensidad seguidas de dos sub-bandas. Los alelos se reportan por medio de su tamaño absoluto relativo a los marcadores de tamaño que fueron cargados en el gel (Dowling, et.al., 1996).

Se cree que el polimorfismo en las secuencias microsatélites fue generado por mutaciones que involucraron la ganancia o pérdida de una unidad repetitiva. Se ha estimado que los microsatélites mutan a una velocidad de 10^3 y 10^5 mutaciones por gameto, sin embargo los mecanismos por los cuales los microsatélites mutan no se conocen con precisión. Se han propuesto dos mecanismos, que pueden actuar simultáneamente. El primero se conoce como entrecruzamiento desigual durante meiosis y el segundo se conoce como replicación con traslape de bandas. De estos dos, se cree que el segundo es predominante y se especula que ocurre principalmente durante la síntesis de la banda retrasada o en inglés "lagging". Los datos empíricos de varios estudios también muestran que existen repeticiones irregulares, las cuales consisten en unidades repetitivas que están interrumpidas por mutaciones puntuales (Murray, 1996).

Figura 9
Descripción general de la técnica para el estudio de microsatélites
(Knudson, et. al., 1996)



b. Medición de la variación genética entre poblaciones

- i. Suposiciones necesarias para realizar el análisis de datos con marcadores microsatélites

Antes de realizar el análisis de datos para determinar subestructuras de poblaciones

es esencial estudiar la variación genética encontrada en los microsatélites para asegurarse de que las suposiciones básicas bajo las cuales se basa la teoría no son violadas. Se necesita probar tres suposiciones principales. Primero debe analizarse la neutralidad selectiva de cada locus. Luego debe identificarse la presencia de “alelos nulos” (alelos que no se detectan por medio del análisis con PCR). Finalmente, antes de que se puedan combinar los datos de varios locus, debe probarse la independencia de cada locus (Murray, 1996).

La suposición de neutralidad selectiva de los microsatélites es la base de la mayoría del análisis de estos datos. Todos los análisis subsecuentes de datos se basan en la interacción de las fuerzas de deriva genética, mutación y/o migración. Una selección muy fuerte puede sobrepasar estas fuerzas. La selección en un locus puede estabilizar las frecuencias de alelos en toda las subpoblaciones y por consiguiente llevar a una sobreestimación de la subestructura genética de la población o de la distancia genética. Las diferencias en presiones selectivas entre regiones pueden causar la fijación de alelos en diferentes subpoblaciones y causar la sobreestimación de estos parámetros. Los efectos de selección pueden confundir los resultados y cualquier locus que esta bajo presión selectiva debe excluirse del análisis. A pesar de que se cree que la mayoría de microsatélites son neutrales, es probable la unión de estos marcadores a un locus bajo selección (Murray, 1996).

La comparación de las frecuencias observadas de genotipos con respecto a las esperadas de las predicciones del equilibrio de Hardy-Weinberg puede detectar la presencia de selección. Esta comparación no es tan estricta en los locus microsatélites debido a los efectos combinados del tamaño de la muestra y al gran número de alelos (Murray, 1996).

Las desviaciones de los valores esperados con el equilibrio de Hardy Weinberg pueden ser por una variedad de causas. Si hay un exceso de heterocigotos, esto puede indicar la presencia de selección sobredominante o la ocurrencia de exogamia. Alternativamente, si se detecta un exceso de homocigotos esto puede ser por cuatro factores. Primero, el locus está bajo selección. Segundo, pueden estar presentes “alelos nulos” los cuales llevan a una observación falsa de exceso de homocigotos. Tercero, el fenómeno de endogamia puede ser común en la población. Cuarto, la presencia de subestructura en la población puede llevar a un efecto de Wahlunds (Murray, 1996).

Al examinar la herencia de los alelos se puede identificar alelos nulos. Los alelos nulos usualmente son causados por una mutación en el sitio de unión del iniciador que lleve a un alelo que no será amplificado. Se puede realizar un análisis tradicional de ligamiento para asegurarse de que los diferentes locus no están ligados (Murray, 1996).

El análisis de un gran número de locus aumentará el poder de detectar una subestructura en la población debido a que cada locus provee información independiente de la población que depende de la cantidad de deriva genética, mutación, y migración que ocurrió. Si esta información no es independiente (o sea, que cada locus esta genéticamente ligado) entonces los resultados serán erróneos debido a que esta información será sobre representada en el set combinado de los datos (Murray, 1996).

ii. Estadísticas F de Wright y migración efectiva

La subdivisión de la población conlleva un efecto que presenta un característico exceso de homocigotos; entonces resulta conveniente medir este efecto en términos de la disminución en la proporción de genotipos heterocigotos. Una población subdividida tiene

tres niveles diferentes de complejidad: los organismos individuales (I), las subpoblaciones (S) y la población total (T), en estos términos se definen las siguientes variables:

H_I = La heterocigocidad de un individuo en una población.

H_S = La heterocigocidad esperada de un individuo en una subpoblación con cruzamiento al azar.

H_T = La heterocigocidad esperada de un individuo en una población total con cruzamiento al azar.

(Hartl and Clark, 1989)

H_I puede interpretarse como el promedio de la heterocigocidad de todos los genes en un individuo o como la probabilidad de heterocigocidad de cualquier gen; H_I es la heterocigocidad observada promediada entre las subpoblaciones. H_S representa el nivel de heterocigocidad que podría encontrarse en una subpoblación si ésta estuviera sufriendo cruzamiento al azar, y por consiguiente H_S siempre equivale a $2p_iq_i$ para una subpoblación con frecuencia de alelos p_i . La cantidad H_T representa la heterogeneidad que hubiera si todas las subpoblaciones se juntaran y se cruzaran al azar; si la frecuencia de alelos promedio entre poblaciones se denota p_0 ; entonces $H_T = 2p_0q_0$ (Hartl and Clark, 1989).

La proporción de individuos que migran en relación de la población total se llama tasa de migración y se denota m . La tasa de migración determina la velocidad con la cual las poblaciones en cuestión llegarán a tener una composición genética similar. Para estimar la tasa de migración, se pueden dividir los niveles de variación entre poblaciones por medio de las estadísticas F de Wright (Tabachnick and Black IV, 1996).

Se pueden estimar las desviaciones respecto de reproducción al azar dentro y entre las diferentes subpoblaciones; para ello, Wright indujo tres estadísticas F para describir la estructura reproductiva de las poblaciones naturales: F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} (Tabachnick and Black IV, 1996).

La estadística F_{IS} se calcula con la fórmula:

$$F_{IS} = (H_S - H_I) / H_S;$$

este valor describe la desviación de la reproducción al azar dentro de una subpoblación. Este dato es el promedio para todas las subpoblaciones de la correlación entre gametos que se unen, en relación con los gametos presentes en la misma subpoblación. Se dice que dos gametos están correlacionados, cuando los dos alelos se derivan de un mismo alelo con un ancestro común. En una población en la que los individuos se reproducen de manera selectiva con individuos muy cercanos genéticamente, la correlación entre los gametos que se unen es muy grande y la estadística F_{IS} toma un valor positivo. Si la heterocigocidad observada y la esperada son iguales, entonces $F_{IS} = 0$ y la población está en equilibrio de Hardy-Weiberg puesto que no hay correlación entre los gametos. El fenómeno de endogamia produce un exceso de homocigotos, o a una deficiencia de heterocigotos y F_{IS} será mayor de 0 indicando que la subpoblación no está en equilibrio de Hardy-Weinberg, y que existe dicha correlación entre los gametos. El parámetro F_{IS} puede tener un valor menor que cero cuando existe un exceso de heterocigotos como se discutió previamente (Tabachnick and Black IV, 1996).

La desviación respecto de la reproducción al azar entre subpoblaciones se describe por medio de la estadística F_{ST} . Esta estadística se calcula a partir del número de heterocigotos esperados en la población total (H_T), y del promedio de heterocigotos esperados en las diferentes subpoblaciones (H_S), por medio de la siguiente ecuación:

$$F_{ST}=(H_T-H_S)/H_T$$

Este dato indica la correlación entre gametos tomados al azar dentro de una subpoblación, en relación con los gametos en la población total (Tabachnick and Black IV, 1996).

Cuando existe flujo genético limitado entre dos subpoblaciones, los gametos tomados al azar dentro de una subpoblación tendrán alelos que se derivan de un ancestro común con mayor frecuencia que los gametos en la población total. En este caso, la estadística F_{ST} tendrá un valor positivo. Los factores que provocan que los gametos dentro de una subpoblación estén correlacionados son la deriva genética y la selección local de algunos alelos (Tabachnick and Black IV, 1996).

Existen varios métodos para estimar F_{ST} , sin embargo solamente tres permiten obtener este dato sin conocer la frecuencia de heterocigotos. Entre estos tres se encuentra el desarrollado por Wright en 1951. En este caso, la estadística F_{ST} se trata como una varianza estandarizada de la frecuencia de alelos entre diferentes subpoblaciones. La estadística F_{ST} se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$F_{ST}=s^2/(q(1-q))$$

donde s^2 es la varianza en la frecuencia de un alelo entre las distintas subpoblaciones, y q es el promedio ponderado de la frecuencia de dicho alelo entre las subpoblaciones (Tabachnick and Black IV, 1996).

El valor de F_{ST} también se conoce como índice de fijación y se utiliza para medir diferencias entre subpoblaciones. En una población ideal, sin mutación, migración o selección, el valor de F_{ST} puede interpretarse fácilmente en términos de deriva genética, pero la interpretación no es tan sencilla en poblaciones naturales, porque los valores observados de F_{ST} están influenciados no sólo por deriva genética, sino también por mutación y especialmente por migración y selección natural. Las dificultades en la interpretación, sin embargo, no invalidan la utilidad del parámetro F_{ST} como un índice de diferenciación genética (Hartl, 1988).

A pesar de que el valor de F_{ST} tiene un mínimo teórico de 0 (que indica que no hay divergencia genética) y un máximo teórico de 1 (que indica la fijación de alelos en las subpoblaciones), el máximo observado es usualmente mucho menor que 1. Wright sugirió los lineamientos cualitativos que se presentan a continuación para la interpretación de F_{ST} :

1. El rango de 0 a 0.05 puede considerarse como indicador de una diferenciación genética muy pequeña.
2. El rango de 0.05 a 0.15 indica diferenciación genética moderada.
3. El rango de 0.15 a 0.25 indica mucha diferenciación genética.
4. Los valores de F_{ST} sobre 0.25 indican una diferenciación genética enorme.

(Hartl, 1988)

La estadística F_{IT} indica la desviación con respecto a la reproducción al azar en la población total. Se calcula por medio de la ecuación que se presenta a continuación:

$$F_{IT}=(H_T-H_i)/H_T$$

Este parámetro representa la correlación entre los gametos que se unen para producir nuevos individuos, en relación con los gametos en la población total. La

estadística F_{IT} es un indicador del grado de cruces entre individuos muy cercanos. Para calcular las estadísticas F_{IS} y F_{IT} es necesario conocer el promedio de heterocigotos observados y esperados entre las subpoblaciones, y el número de heterocigotos esperados en la población total (Tabachnick and Black IV, 1996).

La estadística F de Wright empleada para calcular la velocidad de migración es la estadística F_{ST} . La tasa de migración efectiva se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$Nm=(1-F_{ST})F_{ST}$$

donde Nm es el número total de individuos que migran de una subpoblación a otra, sin importar el tamaño de la población (Tabachnick and Black IV, 1996).

Al aumentar el número de individuos que migran, la estadística F_{ST} presenta valores menores, pues las subpoblaciones se vuelven genéticamente similares. En realidad, se ha determinado que se necesita muy poca migración para mantener la homogeneidad entre las diferentes subpoblaciones. Al aproximarse la velocidad de migración efectiva (Nm) a diez, la estadística F_{ST} se reduce rápidamente a cero, indicando que las subpoblaciones son homogéneas (Tabachnick and Black IV, 1996).

D. Estudios de genética de poblaciones del mosquito *Anopheles albimanus* llevados a cabo en Guatemala.

A. M. de Mérida y su equipo de trabajo estudiaron en 1995 la genética de poblaciones del mosquito *Anopheles albimanus* analizando la variación en el largo y en el número de copias de los espaciadores ingergénicos (IGS) de ADN ribosomal nuclear. Se hicieron extensas colecciones en Guatemala, que incluyen las localidades de Vista Bella, El Motor, Champona, La Cañada, Trinchera, Puente Blanco, Salinas y El Zapote y básicamente se encontró que las poblaciones de la costa pacífica diferían de las poblaciones de la costa atlántica del país, al sugerir la existencia de barreras que impiden el flujo de genes entre estas dos regiones (Mérida et al., 1995).

En un estudio subsecuente, el mismo grupo examinó la distribución de haplotipos de ADN mitocondrial entre poblaciones de *Anopheles albimanus* para estudiar el flujo de genes con un marcador genético diferente; este estudio consistió en el análisis de 1,105 mosquitos colectados de 16 sitios de Guatemala. El principal resultado de este estudio fue que las frecuencias de haplotipos no variaron entre las costas pacífica y atlántica de Guatemala, al contrario que el estudio que se hizo anteriormente con ADN ribosomal. Esto sugiere que para establecer el flujo genético entre poblaciones en un sitio determinado, a veces es necesario utilizar más de un marcador genético para determinar variación (Mérida et al., 1999).

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

A. Objetivos:

1. Generales:

- Estudiar la genética de poblaciones del principal vector de malaria en Guatemala, el mosquito *Anopheles albimanus* en diferentes regiones del país por medio del análisis de tres marcadores microsatélites.
- Determinar si existe flujo de genes entre las poblaciones de *Anopheles albimanus* de las regiones norte, sur y este de Guatemala.

2. Específicos:

- Determinar el polimorfismo que existe en el tamaño de secuencias microsatélites para individuos dentro de las poblaciones de *Anopheles albimanus* incluidas en el estudio: Champona, Nahua, San Luis Petén, San Luis Buenaventura, Cuto, Lauro, El Mango, Ruperto, Tallado, El Motor, y Puente Blanco.
- Estimar la variación genética que existe entre las diferentes poblaciones de *Anopheles albimanus* de distintas regiones del país; es decir, entre las poblaciones del norte, que son Champona, Nahua, San Luis Petén y San Luis Buenaventura; entre las poblaciones del sur que son Cuto, Lauro, El Mango, Ruperto y Tallado y entre las poblaciones del este, que son El Motor, y Puente Blanco.

B. Hipótesis

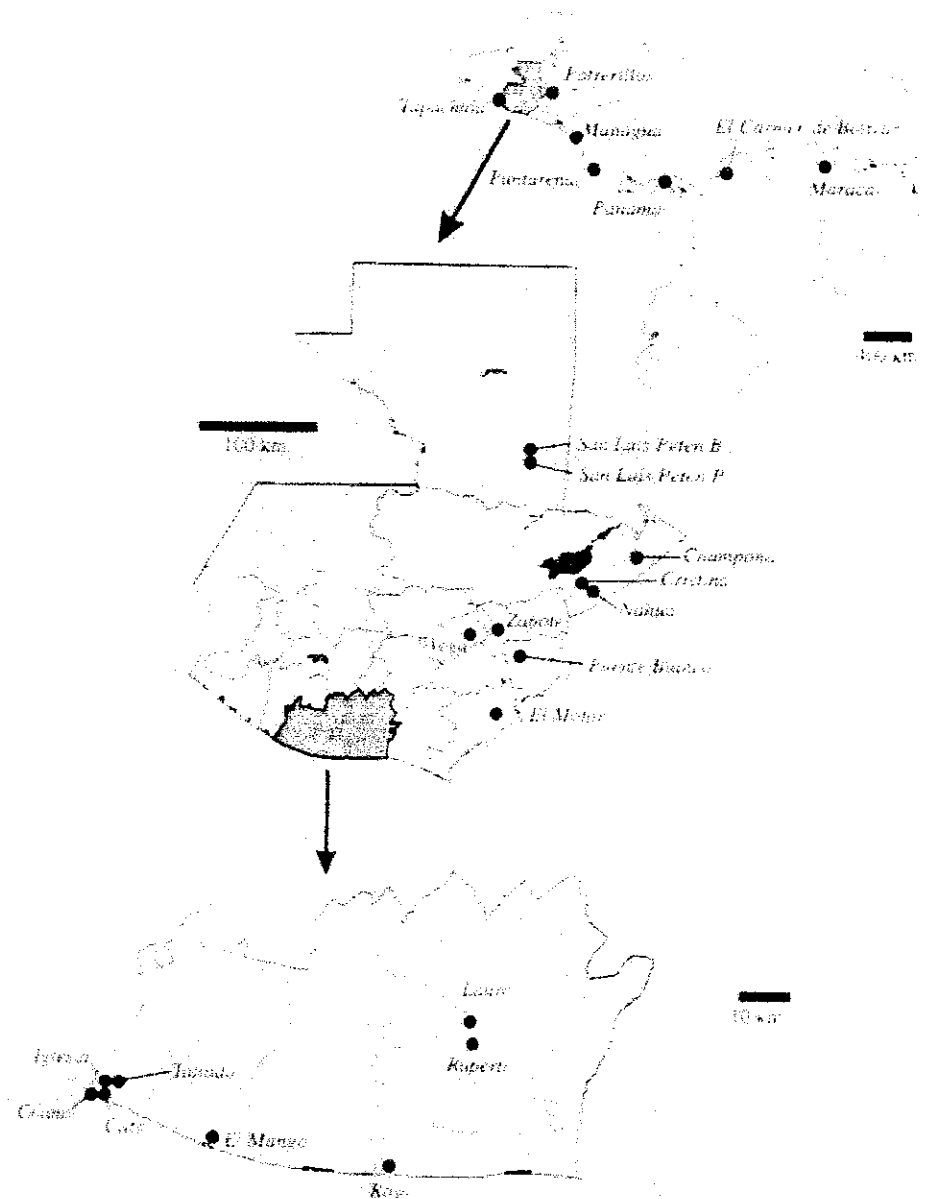
Las poblaciones de mosquitos *Anopheles albimanus* de las regiones norte, sur y este de Guatemala se encuentran aisladas reproductivamente, por lo que no existe flujo de genes entre ellas y por consiguiente presentan patrones genéticos de secuencias microsatélites significativamente diferentes.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Colección de mosquitos

Se trabajó con mosquitos *Anopheles albimanus* hembra colectados durante 1995 y 1996 en diferentes localidades de varios departamentos de Guatemala. Los lugares donde se hicieron las colectas están indicados en la figura a continuación:

Figura 10
Sitios de colecta de *Anopheles albimanus*
(Mérida et. al., 1999)

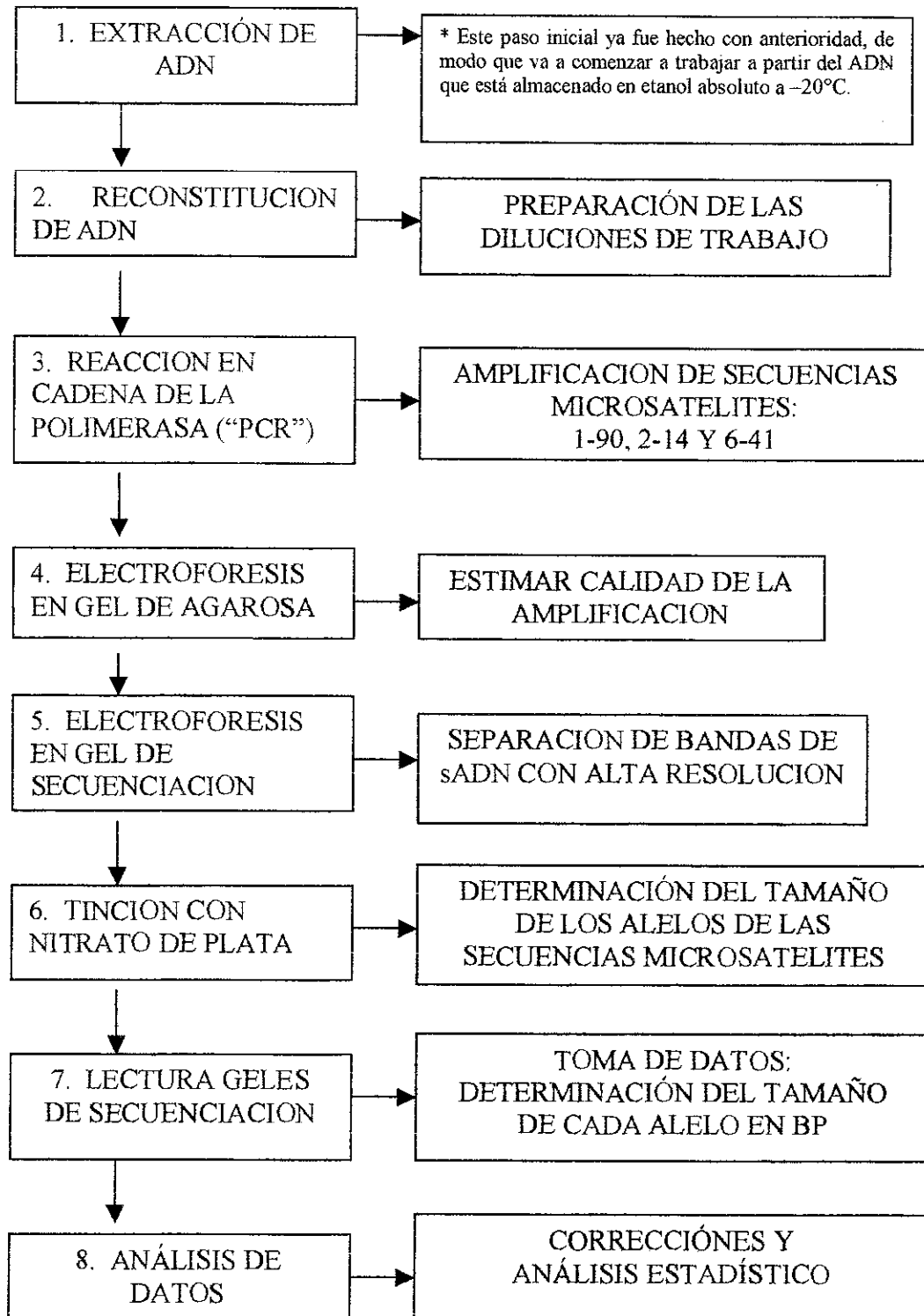


En el cuadro que se presenta a continuación está indicado a qué región pertenece cada localidad del país y el tamaño de las colecciones de *Anopheles albimanus* que se trabajaron.

Cuadro 2
Región de cada sitio de colecta, fecha de colección y número de individuos trabajados

SITIO DE COLECCIÓN	FECHA DE COLECCIÓN	NUMERO DE INDIVIDUOS TRABAJADOS
Guatemala del Norte		115
Champona	11/3/96	37
Nahuá	13/3/96	24
San Luis Petén	12/3/96	31
San Luis Petén Buenaventura	12/3/96	23
Guatemala del Sur		211
Cuto	27/3/96	48
Lauro	27/3/96	14
Lauro	7/6/95	13
El Mango	28/2/96	32
Ruperto	4/10/95	48
Ruperto	27/3/96	16
Tallado	7/2/95	40
Guatemala del Este		96
El Motor	20/2/96	48
Puente Blanco	21/2/96	48
Total de individuos trabajados		422

B. Esquema general de la metodología



1. Extracción de ADN:

1. Colocar 100 μ l de buffer de extracción en un vial.
2. Colocar un mosquito por vial.
3. Macerar el mosquito.
4. Incubar a 65°C por 30 minutos.
5. Agregar 14 μ l de acetato de potasio 8 M y colocar en hielo por 30 minutos.
6. Centrifugar 10 minutos a 14000 rpm.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
8. Agregar 200 μ l de etanol absoluto frío.
9. Almacenar a -20°C.

Nota: La extracción para las muestras que se van a utilizar ya fue hecha con anterioridad, de modo que se trabajó a partir del ADN que estaba almacenado en etanol absoluto a -20°C.

2. Reconstitución de ADN:

1. Tomar la muestra que se encuentra almacenada en etanol absoluto.
2. Centrifugar 20 minutos a 10000 rpm y a 4°C.
3. Decantar la solución.
4. Lavar con 100 μ l de etanol al 70 % frío, y luego con 100 μ l de etanol absoluto frío.
5. Dejar secar al aire durante al menos 1 hora.
6. Disolver en 100 μ l de TE. Mezclar y golpear ligeramente el tubo.
7. Dejar en reposo a 4 °C por 8 horas.
8. Elaborar las diluciones de trabajo tomando 2 μ l de ADN y 98 μ de TE para alcanzar la proporción de 1:50.

3. Reacción en cadena de la polimerasa (“PCR”)

1. Preparar la cantidad de Buffer 1X (MgCl₂ 1.5 mM, Buffer 1X, dNTP 0.2 mM) a utilizar de acuerdo al número de muestras que se van a amplificar: 24 μ l de Buffer 1X + 0.05 μ l de cada iniciador** por muestra.
2. Colocar 23.75 μ l de buffer en cada tubo.
3. Agregar dos gotas de aceite mineral estéril.
4. Exponer los tubos 10 minutos a una fuente de luz ultravioleta.
5. Agregar 1 μ l de muestra (**dilución 1:50) por tubo.
6. Colocar los tubos en el termociclador y agregar 0.25 μ l de enzima Taq polimerasa cuando la temperatura alcanza los 80°C.
7. Programa de termociclador utilizado: BLACK

Cuadro 3: Programa para PCR utilizado

Paso	Tiempo	Temperatura
1	5 min	95 °C
2	20 min	80 °C
3	1 min	95°C
4	1 min	48°C /55°C *
5	1 min	72°C
6	39 veces al paso 3	-
7	7 min	72°C
8	Indefinido	4°C
9	FINAL	-

* La temperatura de hibridización varía según la secuencia que se amplifique, que es de 48°C para los microsátélites 1-90 y 2-14 y de 55 °C para el microsátélite 6-41.

** A continuación se encuentra indicada la secuencia de cada iniciador, su tamaño, temperatura de hibridización y casa comercial.

*** El ADN empleado para la muestra se reconstituyó en 100 µl de buffer TE y se hizo una dilución de trabajo de 1:50.

4. Electroforesis en gel de agarosa

1. Pesar 2.4 g de agarosa y agregar 160 mL de buffer TBE 1X
2. Calentar hasta ebullición con agitación constante hasta que se disuelva la agarosa.
3. Dejar enfriar hasta aproximadamente 60 °C.
4. Agregar 5 µl de Bromuro de etidio.
5. Verter en molde con peine y dejar polimerizar.
6. Llenar la cámara con buffer TBE 1X (Se utiliza aproximadamente 1150 mL)
7. Colocar sobre un trozo de papel parafilm una gota de 2 µl de buffer de montaje por cada muestra.
8. Tomar 8 µl de producto de PCR y mezclar con 2 µl de buffer de montaje.
9. Colocar la muestra en el pozo del gel.
10. Cargar 5 µl de marcador de tamaño 1kb en el primer y último pozo de la electroforesis.
11. Conectar la cámara a 60 V.
12. El gel se saca 2 horas después y se irradia con luz UV para detectar las bandas de ADN.
13. Fotografíar el gel.

5. Electroforesis en gel de secuenciación

A. Preparación del gel y del sistema

1. Colocar en un beaker con agitación:
 - 32 mL ddH₂O
 - 20 mL TBE 5X
 - 17 mL de Acrilamida (disolver 285 g Poliacrilamida + 15 b Bis-acrilamida y llevar a 1 Lt con ddH₂O)
 - 42 g de Urea

NOTA: La concentración final de acrilamida en el gel es del 5%.

2. Preparar Bind Silano agregando 5 μ l de BS (metacriloxi-propil-trimetoxisilano) en 1 mL de etanol con una proporción de 0.5:1 de ácido acético glacial.
3. Preparar la solución persulfato de amonio (APS) (agregar 1000 μ l de agua a 250 mg de APS).
4. Restregar la placa de vidrio exterior con una esponja plástica y jabón de cocina. Colocar la solución limpiadora de placas (10 M NaOH, 0.2M SDS) abundantemente sobre ella, distribuir la solución de un modo parejo sobre la placa con la esponja y dejar reposar de 5 a 15 minutos. Luego restregar vigorosamente la placa de vidrio con la esponja. Enjuagar abundantemente con agua corriente, luego con agua destilada y por último con etanol al 70 %.
5. Restregar la placa de vidrio adherida a la cámara superior con detergente para cocina y una esponja suave. Enjuagar con agua corriente y luego con agua destilada. Lavar con etanol al 70% y dejar secar al ambiente.
6. Poner la solución de BS del inciso 2 sobre la placa rectangular de vidrio y distribuir de un modo parejo por toda la placa con dos paños Kimwipes. Dejar asentar por 5 minutos. Limpie tres veces el exceso de BS con etanol al 95 %.
7. Cámbiese los guantes (ahora contaminados con BS) para trabajar con la placa que está adherida a la cámara superior. Agregue 2 mL de sigmacote, de a 1 mL por vez, dispersando bien con un paño de papel.
8. Ensamblar la unidad superponiendo las placas de vidrio, con los espaciadores (0.4mm) por medio y ajustar con los clamps. Tenga cuidado de alinear bien los espaciadores y las placas antes de asegurar los clamps.
9. Filtre con vacío la mezcla de urea y acrilamida del inciso 1 a través de dos filtros Whatman #1 durante 30 minutos a fin de desoxigenarla.
10. Agregue 107 μ l de TEMED y 107 μ l de APS a la mezcla del gel y mezcle un momento. Cargue esta mezcla en una pipeta volumétrica de 100 mL y luego inyéctelo entre las placas para tratar de evitar burbujas.
11. Antes de que el gel polimerice, use el lado del revés de un peine de 0.4 mm de grosor para hacer un solo pozo de 7 a 8 mm de profundidad en el inicio del gel y ajuste las dos placas con clips metálicos de papel. El gel debe polimerizar en una hora como mínimo y por no más de 12 horas antes de usar.

B. Preparación precorrida

1. Lleve a $\sim 95^{\circ}\text{C}$ un bloque calentador para calentar los tubos que contengan el producto de PCR.
2. Mezcle 6 μ l de producto de PCR con 4 μ l de buffer de montaje (10mM NaOH, 95% formamida, 0.05% azul de bromofenol y 0.05% xilen cianol) y 5 μ l de marcador de tamaño PBR322 HaeIII digest con 5 μ l del mismo buffer de montaje. No ponga ésto en el bloque calentador todavía.
3. Coloque agua caliente (aproximadamente a 60°C) en la cámara superior del gel para calentar el sistema.
4. Diluya 100 mL de buffer TBE 5X a 500 mL con ddH₂O y póngalo en la cámara inferior del sistema.

4. Deseche la solución de nitrato de plata y lave el gel con 2 litros de agua destilada desionizada helada durante 18 segundos.
5. Deseche el agua del lavado e inmediatamente sumerja el gel en una solución reveladora helada (ésta se prepara disolviendo 60 gr de Na_2CO_3 en 2 lt de agua destilada desionizada + 8mL de formaldehído al 37% + 200 μl de una solución que contiene 0.01 g de tiosulfato de sodio en 1 mL de agua). Mantenga el gel en agitación hasta que las bandas aparezcan teñidas en un color café oscuro o negro (esto sucede aproximadamente a los 4 o 5 minutos) y detenga la reacción antes de que el fondo se oscurezca mucho, al agregar los dos litros de ácido acético al 10% que recuperó en el inciso 2.
6. Mantenga en agitación hasta que la reacción entre el carbonato de sodio y el ácido acético finalice, esto sucede cuando deja de burbujear. Deseche esta solución y lave el gel dos veces con 2 litros de agua desionizada durante 2 minutos cada vez.
7. Coloque la placa que lleva adherida el gel sobre una superficie plana con algún absorbente como papel o un paño y deje secar antes de leerlo de 24 a 48 horas, o hasta que el gel ya no esté pegajoso.

7. Lectura del gel de secuenciación

1. Cuando el gel esté completamente seco, colóquelo sobre una fuente continua de luz blanca para visualizar bien las bandas de ADN y rotúlelo con un marcador negro permanente. Debe registrar la fecha, el nombre de la población que está corriendo en el gel y a qué muestra pertenece cada pozo. Debe identificar en qué posición cargó el marcador de tamaño y asignar a cada banda su valor en número de bases. **NOTA: En el caso de los microsátélites estudiados, se obtiene una serie de bandas en lugar de una sola (para individuos homocigotos) o de dos (para individuos heterocigotos), la banda que debe leerse es la banda principal, usualmente más intensa, coloreada de negro y debajo de una banda café.** Determine cuidadosamente las bandas que van a ser leídas para cada individuo y márquelas con tinta negra dibujando un punto en el extremo derecho de la banda para identificarla.
2. Coloque una regla metálica de 30 cm con el 0 exactamente sobre el inicio del gel. Tome la medida en cm de la migración de la banda de interés cerciorándose de que la regla está completamente alineada entre el inicio y el final de la placa. Lea todos los individuos del gel tomando en cuenta que los individuos homocigotos presentan una sola banda principal y los heterocigotos presentan dos.
3. Del mismo modo que leyó las muestras, lea las bandas del marcador de tamaño PBR 322 HaeIII digest que está presente por lo menos tres veces en el gel (al inicio, en el centro y al final). Debe darle un valor de migración en cm a las bandas de 578, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123 y 104 bases que aparecen consecutivas de arriba hacia abajo en el gel.
4. En una hoja electrónica calcule el promedio de la migración en cm de las bandas correspondientes a 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123 y 104 bases del marcador de tamaño que fue cargado en triplicado. Grafique este promedio vrs el logaritmo del tamaño de cada una de las bandas y calcule una regresión lineal.

Con los valores de esta ecuación y la medida en cm de la migración de las bandas de los individuos calcule el tamaño en bases de cada uno de los alelos que aparecen por individuo.

8. Análisis de datos

Es conveniente volver a cargar en un gel de secuenciación aquellos individuos que en geles diferentes demostraron tener los mismos alelos para cerciorarse de que así sea, o en su defecto, realizar la corrección pertinente de los valores. Una forma adecuada de hacerlo es correr una muestra control de alelos conocidos en un nuevo gel para que los alelos de la población que se está estudiando puedan ser identificados correctamente.

también se recomienda digitalizar la imagen de los geles a fin de guardar un registro del mismo. Esto se puede hacer con un scanner y software apropiado.

C. Materiales, Reactivos y equipo

1. Materiales y equipo

Autoclave

Congelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Refrigerador

Destilador de agua

Microcentrífuga

Termociclador, Programmable Thermal Controller, M.J. Research, Inc. Peltier Effect Cycling. PTC-100.

Cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa.

Cámara de electroforesis vertical para geles de secuenciación, BioRad.

Fuentes de poder

Fuente de luz ultravioleta

Balanza analítica

Agitador magnético

Micropipetas de $2\text{ }\mu\text{l}$, $200\mu\text{l}$, $100\mu\text{l}$ y $1000\text{ }\mu\text{l}$.

Puntas para micropipetas

Beakers y balones de 250 mL , 500 mL , 1000 mL y 2000 mL

Filtros

Guantes

Tubos de 1.5 mL y 0.5 mL para microcentrífuga

Cámara fotográfica para fotografiar geles

Bloque calentador para tubos

Termómetro

Pipeta pasteur

Paños kimwipes

Relojes timer

2. Reactivos

Buffer para reacción de PCR 10 X con MgCl_2 (Promega).

Acrilamida, grado biología molecular (Sigma).

Bisacrilamida, pureza de reactivo para electroforesis, (BioRad)
 Agarosa, Wide Range Standard 3:1, grado biología molecular, (Sigma).
 Persulfato de amonio, grado electroforesis (BioRad)
 Urea, grado electroforesis, (Sigma)
 Bind Silane (Sigma)
 Ácido bórico para biología molecular (Sigma).
 EDTA para biología molecular (Sigma).
 Azul de Bromofenol grado electroforesis (BioRad)
 Detergente Extran (Merck).
 Hidróxido de sodio en lentejas (Merck).
 Dodecil sulfato de sodio (Sigma).
 dNTP (Promega)
 Etanol absoluto y etanol al 95 % (Merck).
 Bromuro de etidio (Sigma)
 Formaldehído al 37%, (Merck).
 Ácido acético glacial (Merck).
 Aceite mineral para biología molecular, (Sigma).
 Cloro comercial
 Cloruro de sodio (Merck).
 Sigma Cote, (Sigma).
 Nitrato de plata, (Merck).
 Carbonato de sodio anhidro, reactivo ACS (Sigma).
 Tiosulfato de sodio (Sigma)
 Polimerasa taq (Promega)
 TEMED, (BioRad).
 Trizma HCl y Trizma Base para biología molecular (Sigma).
 Formamida (Sigma).
 Xilen cianol, (Sigma).
 Marcador de tamaño de ADN para geles de agarosa: Escalera de 1kb, Gibco-RBL.
 Marcador de tamaño de ADN para geles de secuenciación: PBR 322 Hae III, Sigma.

Cuadro 4: Iniciadores* usados para la reacción de PCR

Nombre del iniciador	Secuencia	Tamaño	Peso molecular	Temperatura de fusión
Aams 1-90+	5'-GCA TAA ATA ATA GCC GAA CA-3'	20	6128.05	54°C
Aams 1-90-	5'-GTC ACA CTT CCG ACT ACA AA-3'	20	6030.95	58°C
Aams 2-14+	5'-GCC CTT GCC AAG ATA AAA TGG AAA -3'	24	7379.85	61°C
Aams 2-14-	5'-TCA AAT AAT CCT AAA ACA CCG TTC-3'	24	7249.77	59°C
Aams 6-41+	5'-CGG CAT CCA TCC TTT CTC TG-3'	20	5995.89	62°C
Aams 6-41-	5'-GAC CTC GCG CCT TGT CAT AA-3'	20	6053.94	62°C

* Estos iniciadores fueron diseñados por Maria Marta Yurrita y colaboradores.
 Fueron adquiridos en **Macromolecular Resources**, Colorado State University,
 Department of Biochemistry and Molecular Biology, 355 MRB Fort Collins, CO
 80523-1870. Se pidieron sin sales.
 Se recibieron liofilizados y se reconstituyeron para una concentración final de 500
 pmol/μl. Se hicieron alícuotas de 10 μl y se almacenaron a -70°C

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Optimización de la técnica de PCR para cada uno de los microsátélites

Inicialmente se optimizaron condiciones generales como la concentración de cloruro de magnesio, la dilución de la muestra de ADN a usar y el número de ciclos en el programa del termociclador para los tres microsátélites juntos, y usar una temperatura de hibridización para los tres. En el cuadro 5 a continuación se presentan las condiciones de la primera prueba que se realizó. En este PCR hubo amplificación para los tres microsátélites, pero las bandas de ADN en la electroforesis de agarosa fueron muy tenues; esto indicó que aun era necesario optimizar las condiciones.

Cuadro 5
Optimización de PCR, primera prueba.
Programa AMC

Paso	Tiempo	Temperatura
1	5 min	94°C
2	20 min	80°C
3	1 min	94°C
4	1 min	48°C
5	1 min	72°C
6	19 veces al paso 3	-
7	1 min	94°C
8	1 min	43°C
9	1 min	72°C
10	29 veces al paso 7	
11	10 min	72°C
12	Indefinido	4°C
13	FINAL	-

Concentración de $MgCl_2 = 1.5 \text{ mM}$

Dilución de la muestra = 1:5

Se cambió el programa del termociclador en la prueba No. 2, la concentración de cloruro de magnesio, la temperatura de hibridización y la dilución de la muestra permanecieron iguales. El programa que se usó se presenta en el cuadro 6. Con este programa hubo amplificación para los tres microsátélites, pero las bandas de ADN aún fueron tenues.

Cuadro 6
Optimización de PCR, segunda prueba.
Programa BLACK0

Paso	Tiempo	Temperatura
1	5 min	95 °C
2	20 min	80 °C
3	1 min	95°C
4	1 min	48°C
5	1 min	72°C
6	29 veces al paso 3	-
7	7 min	72°C
8	Indefinido	4°C
9	FINAL	-

Concentración de $MgCl_2 = 1.5 \text{ mM}$

Dilución de la muestra = 1:5

Con el fin de obtener un producto de PCR más abundante, se modificó el programa Black0 para aumentar a 40 el número de ciclos. También se probaron diferentes diluciones para la muestra. El nuevo programa usado se presenta en el cuadro 7 a continuación.

Cuadro 7
Optimización de PCR, tercer prueba.
Programa BLACK

Paso	Tiempo	Temperatura
1	5 min	95 °C
2	20 min	80 °C
3	1 min	95°C
4	1 min	48°C
5	1 min	72°C
6	39 veces al paso 3	-
7	7 min	72°C
8	Indefinido	4°C
9	FINAL	-

Concentración de $MgCl_2 = 1.5 \text{ mM}$

Dilución de la muestra = 1:1, 1:10 y 1:50

Con este nuevo programa la amplificación mejoró para los tres microsatélites puesto que en las electroforesis de agarosa se visualizaron bandas mas intensas. El microsatélite 6-41 aun presenta bandas un poco tenues. Para los microsatélites 1-90 y 2-14 se obtuvieron similares productos de PCR con las tres diluciones utilizadas, por lo que se decidió usar la mas diluida (1:50). En la figura 11 se puede ver que se obtuvieron bandas de igual intensidad para las diferentes diluciones de la muestra en la electroforesis en gel de agarosa con el microsatélite 1-90. En la figura 12 se muestran los resultados de la amplificación de los individuos de la población Ruperto 4/10/95 con el microsatélite 2-14.

Figura 11:
Electroforesis en agarosa, optimización de PCR, prueba 3, microsatélite 1-90,
diferentes diluciones de la muestra, individuos de varias poblaciones.

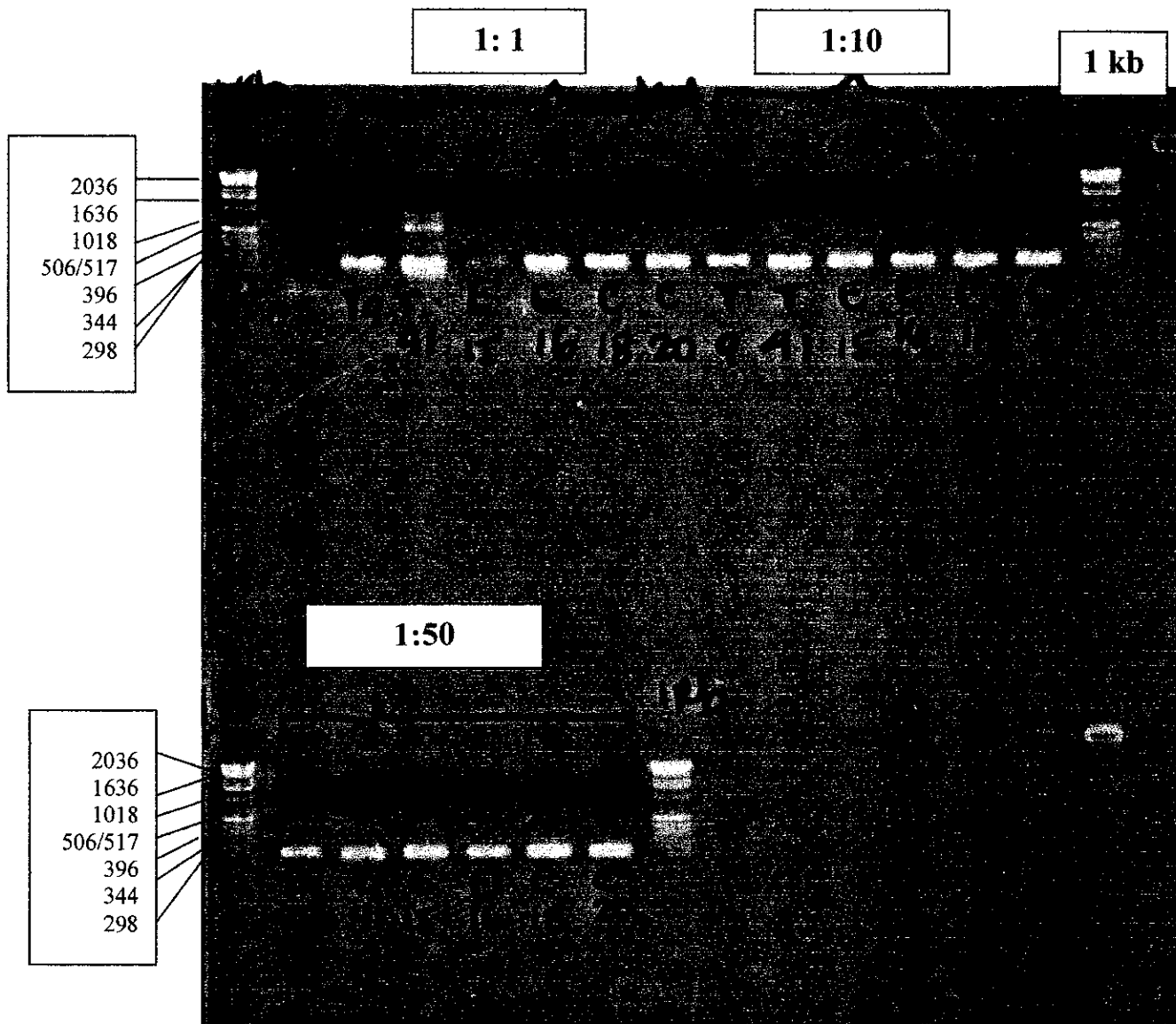
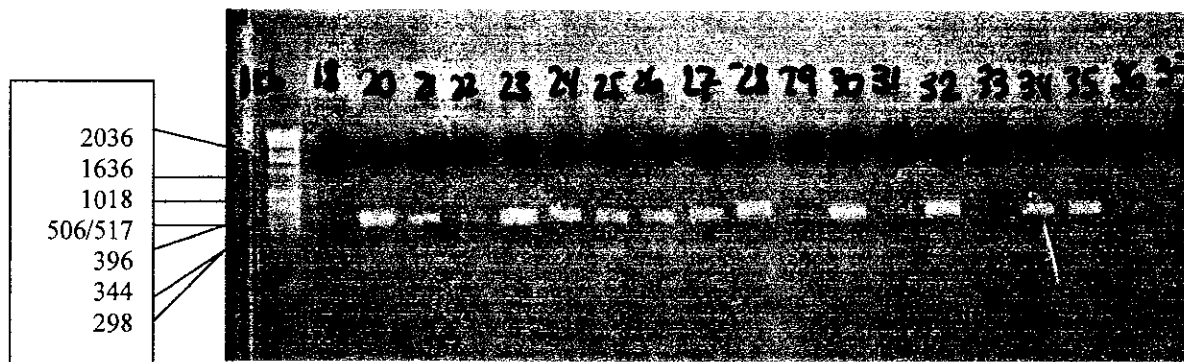


Figura 12:
Electroforesis en agarosa, optimización de PCR, prueba 3, microsatélite 2-14,
individuos de la población Ruperto 4/10/95.

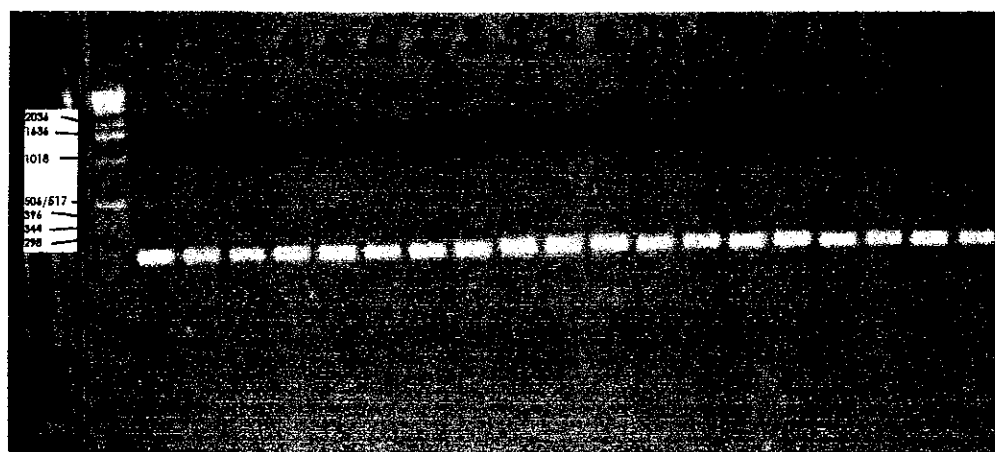


El microsatélite 6-41 se optimizó por separado debido a que las temperaturas de fusión de los iniciadores son diferentes a los microsatélites 1-90 y 2-14 (Ver datos en sección de Materiales y Métodos). Para obtener un producto de PCR específico es importante utilizar una temperatura de hibridación lo suficientemente restrictiva que permita que los iniciadores se unan con alta especificidad al templado de ADN, esto se logra al utilizar una temperatura de hibridación aproximadamente 10°C menor que la temperatura de fusión de los iniciadores. En el cuadro 8 se presentan las condiciones bajo las cuales se optimizó el microsatélite 6-41 y en la figura 13 puede verse que los resultados de haber cambiado la temperatura de hibridación a 55 °C fueron satisfactorios, ya que todos los individuos de Champona mostraron un producto de amplificaron abundante.

Cuadro 8
Optimización para el microsatélite 6-41
Cuarta prueba

Nombre del programa: BLACK, la temperatura de hibridación se cambió a 55°C.
Concentración de $MgCl_2 = 1.5 Mm$
Dilución de la muestra = 1:50

Figura 13:
Electroforesis en agarosa, optimización de PCR, prueba 4
microsatélite 6-41, población Champona 11/3/96



NOTA: Las condiciones finales de la optimización de PCR se encuentran descritas en la sección de Materiales y Métodos.

Cuadro 9: Tamaño de las secuencias amplificadas determinado con electroforesis en agarosa

Microsatélite		
1-90	2-14	6-41
160 bases	250 bases	200 bases

Como se puede ver en las electroforesis en agarosa que se presentaron con anterioridad, al amplificar cada microsatélite sólo se visualizaba una banda gruesa que aparentemente presentaba la misma migración para todos los individuos.

Puesto que en este estudio se busca identificar el tamaño de cada alelo de la secuencia microsatélite para cada individuo de las poblaciones; es necesario emplear una técnica de separación electroforética que proporcione muy alta resolución.

Después de determinar la calidad de la amplificación por PCR por medio de la electroforesis en geles de agarosa, se empleó la electroforesis en gel de secuenciación de acrilamida con condiciones desnaturizantes para la lectura de datos. Esta técnica permite separar los fragmentos de ADN con muy alta resolución debido a la gran distancia que recorre la muestra a lo largo del gel (aproximadamente 40 cm), esto permitió separar fragmentos de hasta 1 base de diferencia. Las condiciones desnaturizantes tales como la urea en el propio gel y la alta temperatura de la corrida no permitieron ningún tipo de conformación secundaria en el ADN, lo cual restringe la migración únicamente al tamaño o peso de los fragmentos. Para poder determinar estos tamaños con precisión se requirió de un marcador de tamaño que proporcionara datos patrón para poder interpolar las migraciones de las bandas y obtener sus tamaños en pares de bases. El tamaño de los marcadores que se leyeron tiene un rango de 587 a 104 pares de bases. La tinción con nitrato de plata de los geles de secuenciación elevaron la sensibilidad del método, con lo que se puede visualizar las bandas en el gel con alta precisión.

A continuación se presentan seis geles de secuenciación, uno para cada microsatélite trabajado. Puede notarse que es posible diferenciar entre individuos homocigotos (que presentan una sola banda) de los heterocigotos (dos bandas). También puede verse que en los tres casos se obtuvieron bandas de fondo, a modo de sombra arriba o debajo de la banda principal, esto se atribuyó al evento que se conoce en inglés como “replication slippage” durante la replicación del ADN, que sucede en la naturaleza durante la replicación celular (que constituye una de las principales fuentes de polimorfismo en los marcadores microsatélites) así como en PCR con la enzima taq polimerasa. Cabe mencionar que, como se indicó en la sección de Materiales y Métodos, se leyó la banda principal, usualmente mas intensa, coloreada de negro y debajo de una banda café.

En las figuras 14, 15 y 16 se muestran geles de poblaciones completas para cada microsatélite, mientras que en las figuras 17, 18 y 19 se muestran geles de secuenciación con individuos de diferentes poblaciones que exhiben la totalidad de alelos diferentes que se encontraron para cada marcador.

Figura 15: Gel de secuenciación de la población Tallado, microsatélite 6-41

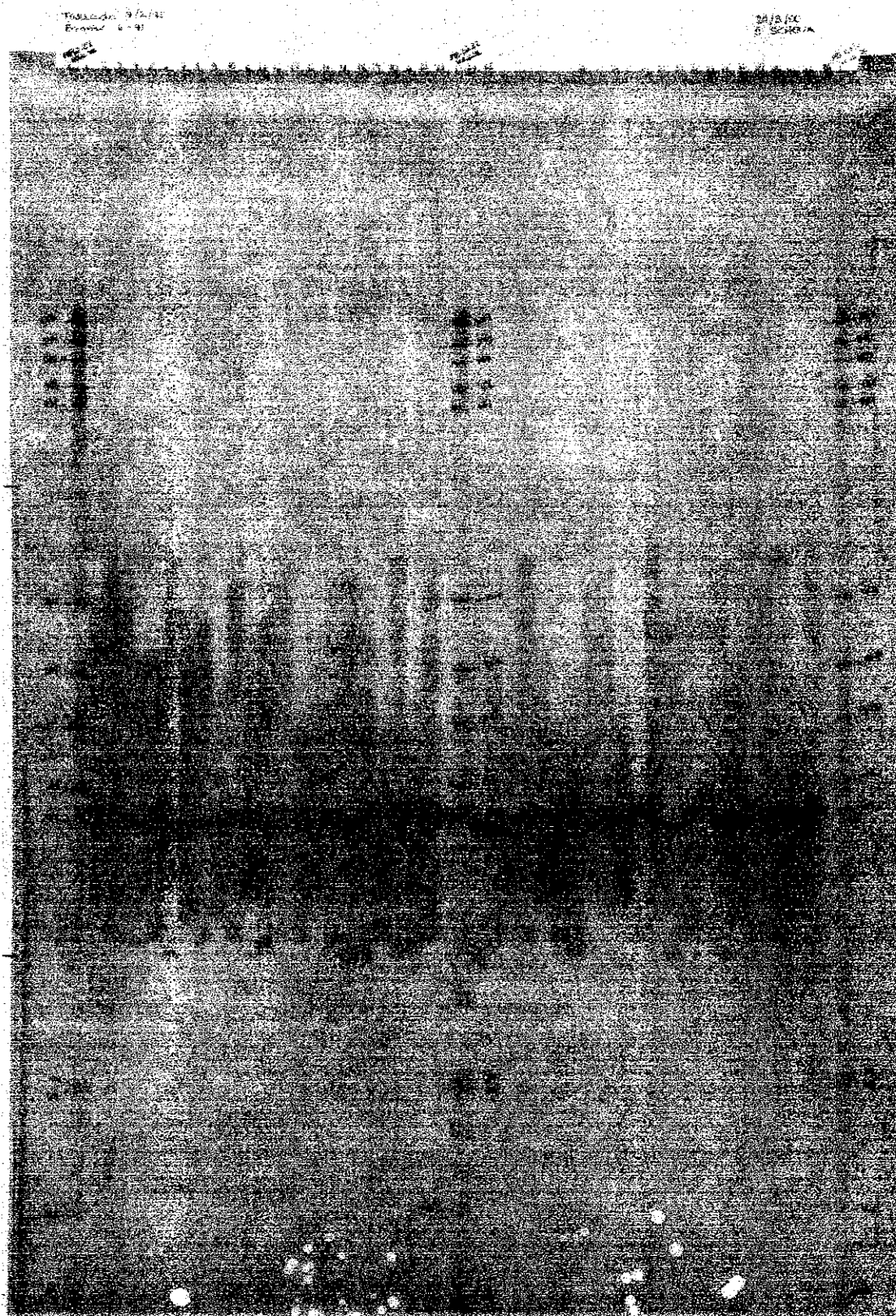


Figura 16: Gel de secuenciación de la población El Motor, microsatélite 2-14

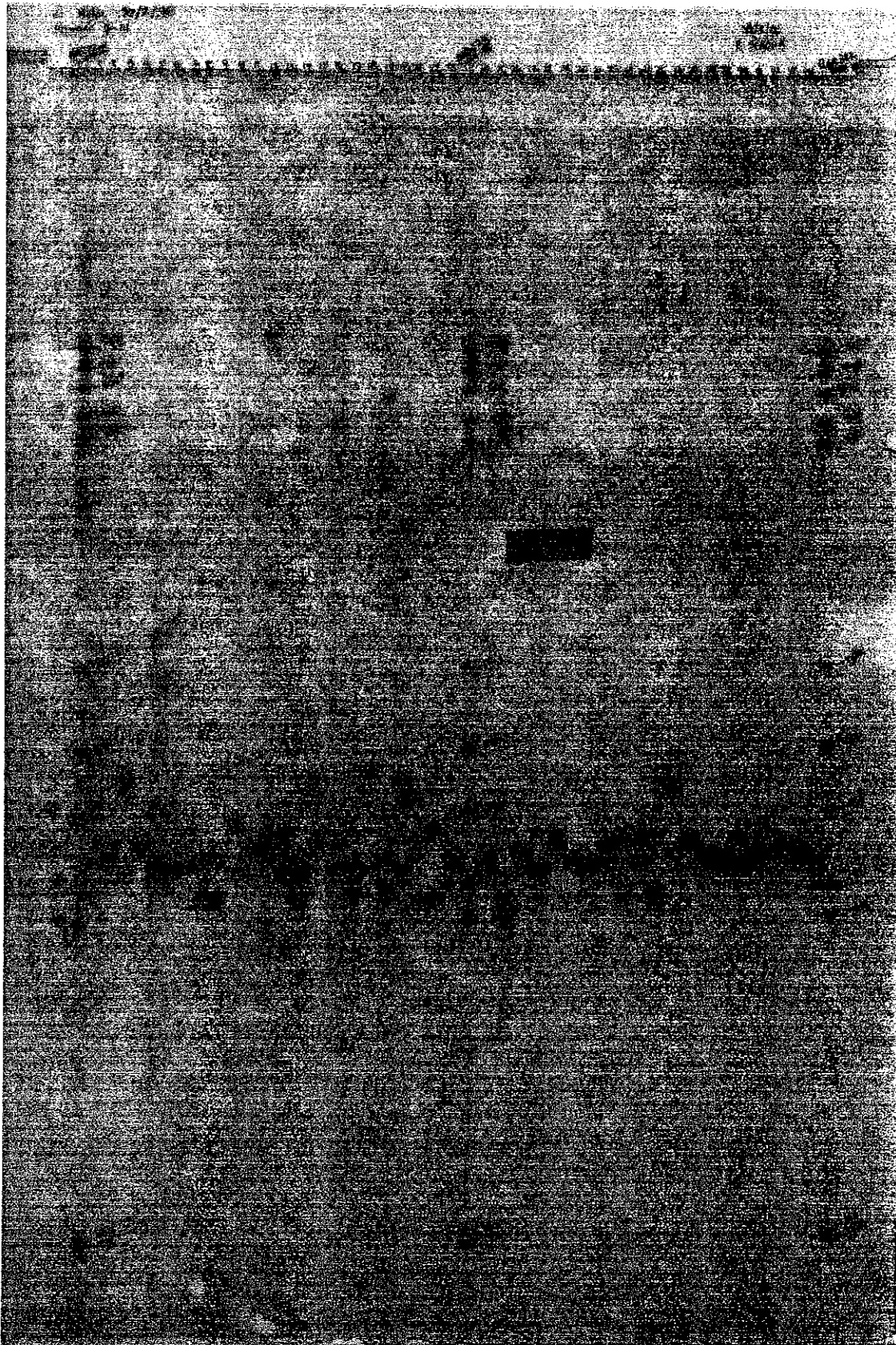


Figura 17: Gel de secuenciación de varias poblaciones, microsatélite 1-90

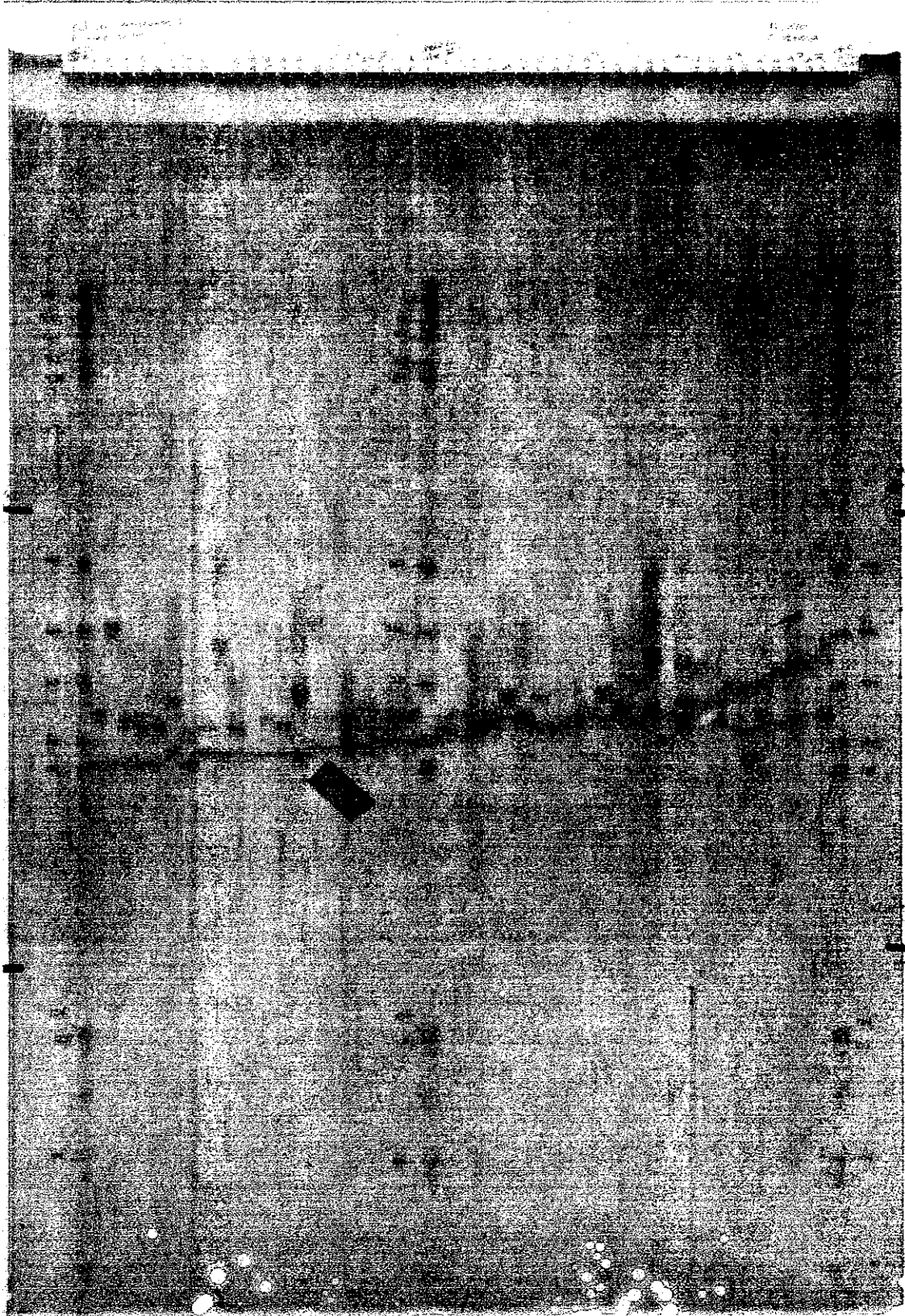


Figura 18: Gel de secuenciación de varias poblaciones, microsatélite 2-14

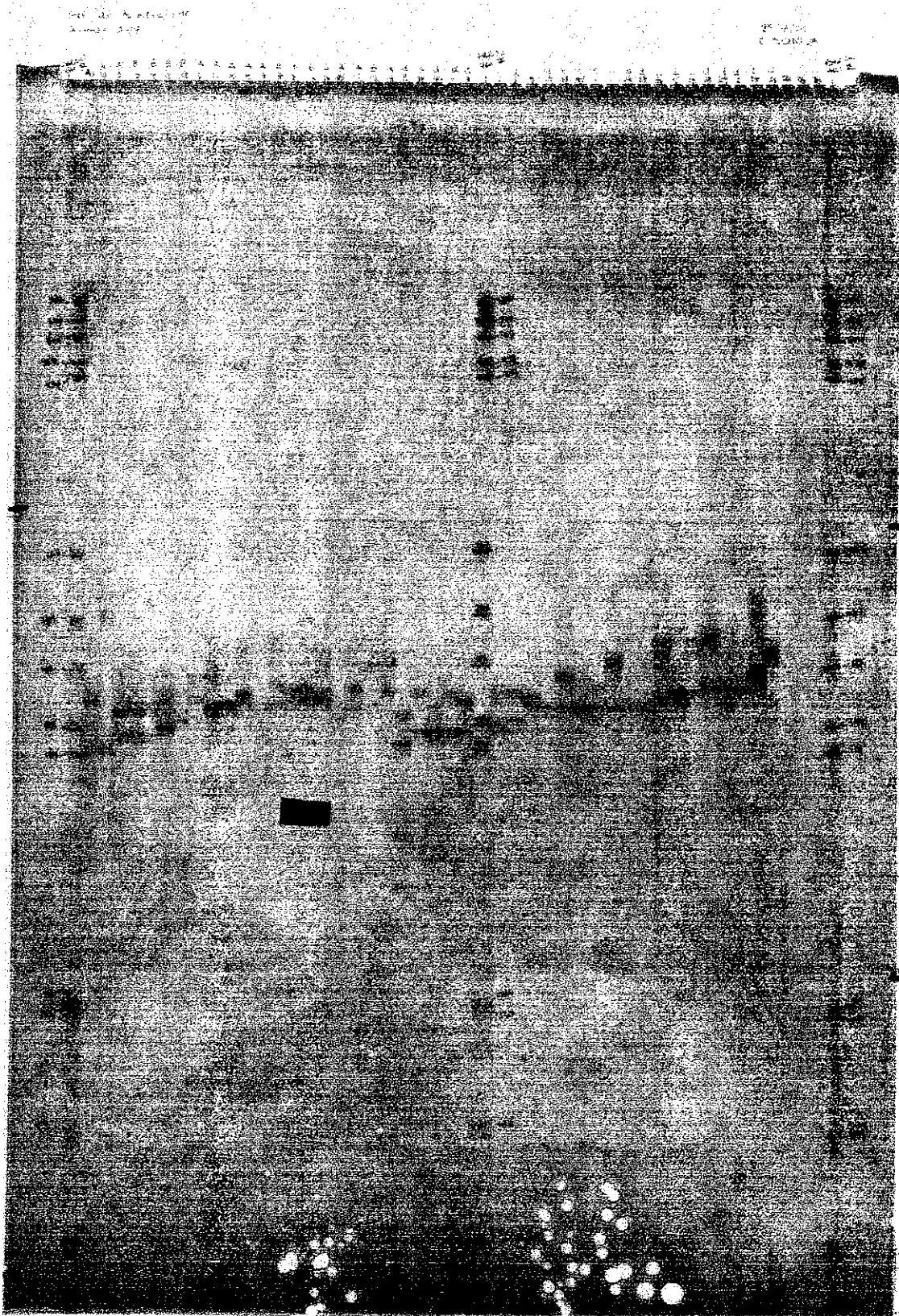
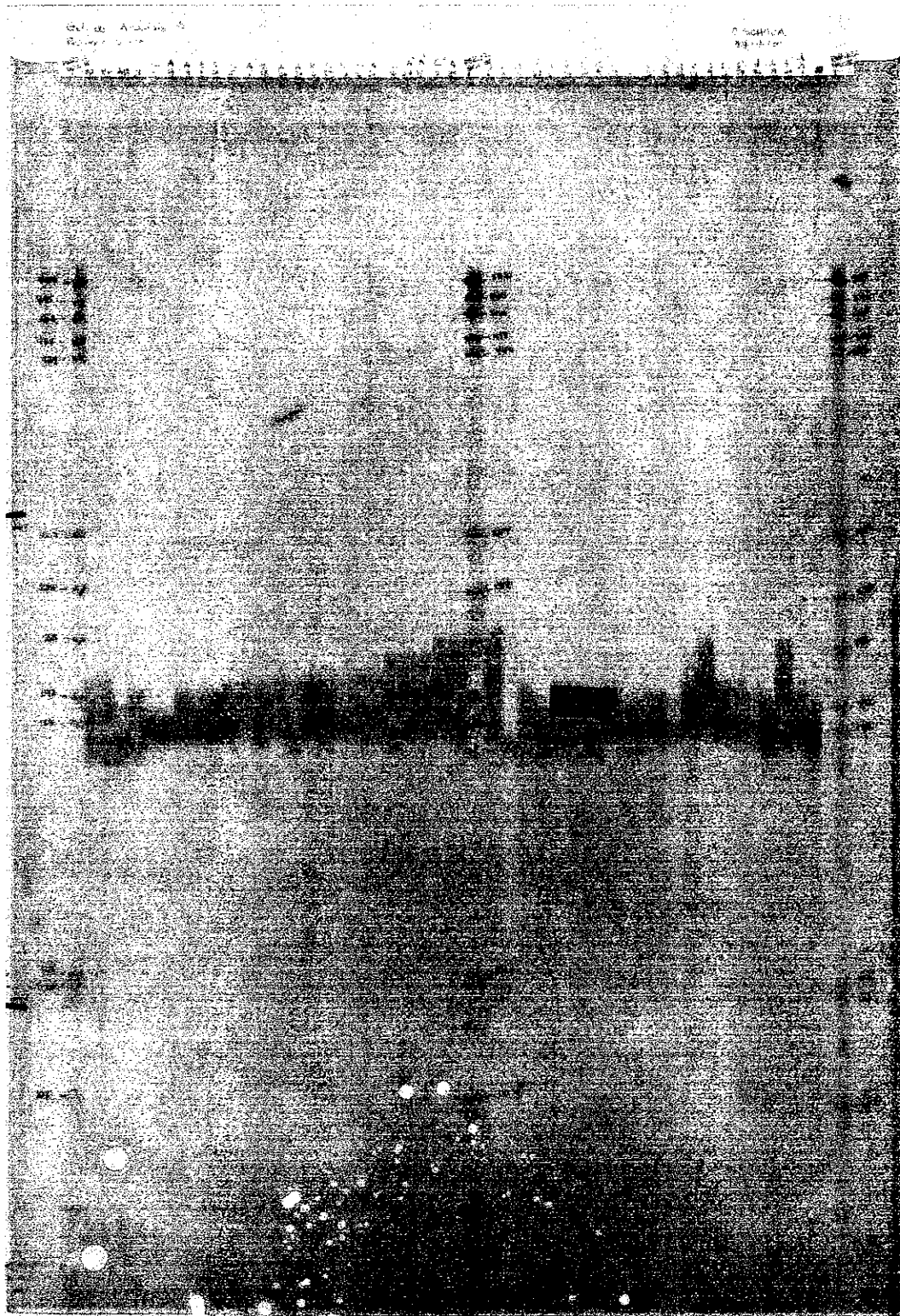


Figura 19: Gel de secuenciación de varias poblaciones, microsatélite 6-41



B. Tamaños y frecuencias alélicas de los individuos estudiados

En el cuadro 10 se presenta la región de cada sitio de colecta, la fecha de colección, el número de individuos que amplificaron con PCR y el número de individuos a los que se les determinó composición y tamaño de alelos por cada microsatélite trabajado. Es muy importante notar en este cuadro que no hubo alelos nulos para los microsatélites 1-90 y 6-41. Si bien no todos los alelos pudieron ser identificados (como en el caso del microsatélite 2-14, para el que se identificaron los alelos de 390 individuos de 422 trabajados en total), todos los individuos amplificaron con PCR.

Como se discutió en la sección de Antecedentes, los alelos nulos son causados por una mutación en el sitio de unión del iniciador que lleva un alelo que no será amplificado. La presencia de alelos nulos puede llevar a una observación falsa de exceso de homocigotos, que va a indicar que la población no está en equilibrio de Hardy-Weinberg. En este caso, la ausencia de alelos nulos para dos de los microsatélites es indicio de que se puede realizar un análisis de datos con el cumplimiento de una de las suposiciones principales.

Cuadro 10

Región de cada sitio de colecta, fecha de colección, número de individuos que amplificaron con PCR y número de individuos a los que se les determinó composición y tamaño de alelos a través de electroforesis de secuenciación por cada microsatélite trabajado

SITIO DE COLECCIÓN	FECHA DE COLECCIÓN	NÚMERO DE INDIVIDUOS	INDIVIDUOS QUE RESULTARON PCR+ Y CON ALELOS IDENTIFICADOS					
			1-90		2-14		6-41	
			PCR +	Alelos +	PCR +	Alelos +	PCR +	Alelos +
Guatemala del Norte		115	115	115	115	114	115	115
San Luis Petén	12/3/96	31	31	31	30	31	31	31
San Luis Petén	12/3/96	23	23	23	23	23	23	23
Buenaventura								
Nahá	13/3/96	24	24	24	24	24	24	24
Champona	11/3/96	37	37	37	37	37	37	37
Guatemala del Sur		211	211	210	211	181	211	211
Lauro	27/3/96	14	14	14	13	14	14	14
Lauro	7/6/95	13	13	13	13	13	13	13
Ruperto	27/3/96	16	16	16	16	16	16	16
Ruperto	4/10/95	48	48	48	45	48	48	48
El Mango	28/2/96	32	32	32	21	32	32	32
Talado	7/2/95	40	40	40	25	40	40	40
Cuto	27/3/96	48	48	47	48	48	48	48
Guatemala del Este		96	96	96	95	96	96	96
El Motor	20/2/96	48	48	48	47	48	48	48
Puente Blanco	21/2/96	48	48	48	48	48	48	48
Total de individuos trabajados		422	422	421	390	422	422	422

En el cuadro 11 a continuación se presentan los alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90 y en el cuadro 12 y gráfica 1 se presentan las frecuencias de alelos para este microsatélite.

Se puede notar que las frecuencias de los alelos que se determinaron para el microsatélite 1-90 presentan una distribución casi normal, y que los alelos se diferencian en casi dos bases para la mayoría de los casos. Según los mecanismos de evolución por los cuales se cree que fueron generados los polimorfismos en estas secuencias repetitivas, la mayoría de alelos se diferencian por la ganancia o pérdida de una unidad repetitiva, en este caso de dos bases nitrogenadas. Cuando sólo hay una base de diferencia, se especula que existen unidades repetitivas que están interrumpidas por mutaciones puntuales. Este patrón también estuvo presente para los microsatélites 2-14 y 6-41, como se puede ver en los datos que se presentan en los cuadros 13, 14, 15 y 16 y en las gráficas 6 y 11 a continuación.

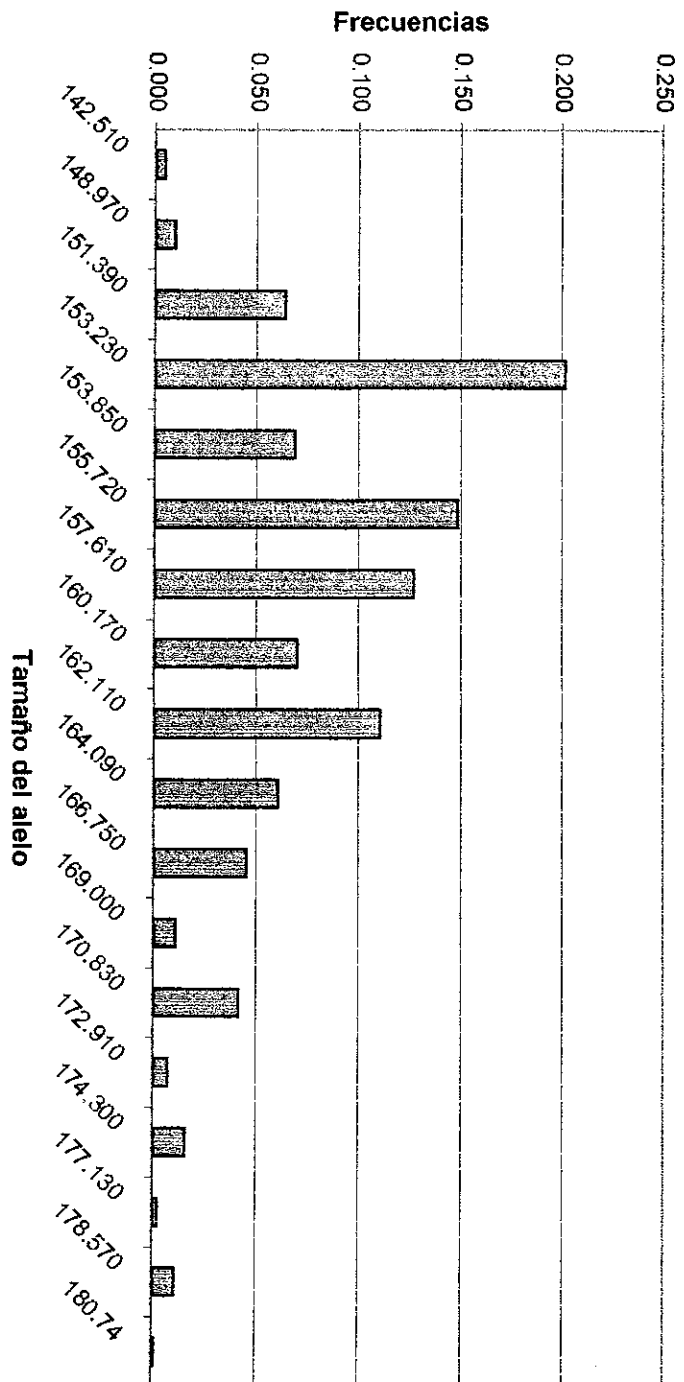
Cuadro 11
Auelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90

Auelos	POBLACIONES DEL NORTE					POBLACIONES DEL SUR							POBLACIONES DEL ESTE			AUELOS TOTALES	
	S.L. Peten 12/3/96	S. L.P Buenav. 12/3/96	Nahua 13/3/96	Champ. 11/3/96	TOTAL AUELOS NORTE	Lauro 27/3/96	Lauro 7/6/95	Ruperto 27/3/96	Ruperto 4/10/95	Ei Mango 28/2/96	Talado 7/2/95	Cuto 27/3/96	TOTAL AUELOS SUR	Ei Motor 20/2/96	P. Blanco 21/2/96		TOTAL AUELOS ESTE
142.51	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2	0	2	2	4
148.97	0	1	0	0	1	0	0	3	2	0	1	0	6	0	1	1	8
151.39	6	3	0	12	21	5	0	0	6	3	5	4	23	6	4	10	54
153.23	17	6	0	0	23	7	9	11	34	22	26	21	130	0	17	17	170
153.85	0	0	19	13	32	0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	26	58
155.72	2	10	2	10	24	0	5	5	9	12	8	14	53	18	30	48	125
157.61	8	3	4	5	20	5	3	1	10	12	18	20	69	10	8	18	107
160.17	7	3	3	9	22	1	1	2	14	0	0	0	18	7	12	19	59
162.11	12	6	10	8	36	3	3	1	5	4	7	16	39	13	5	18	93
164.09	5	4	0	4	13	3	1	3	12	3	4	9	35	3	0	3	51
166.75	0	0	5	2	7	0	1	4	3	6	3	2	19	3	9	12	38
169.00	2	0	0	0	2	0	0	0	0	1	3	3	7	0	0	0	9
170.83	3	5	4	9	21	3	1	0	0	1	0	0	5	4	5	9	35
172.91	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	2	5	0	0	0	6
174.3	0	3	0	0	3	0	1	0	0	0	1	1	3	6	1	7	13
177.13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
178.57	0	2	1	1	4	1	0	0	0	0	2	2	5	0	0	0	9
180.74	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1

Cuadro 12
Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90

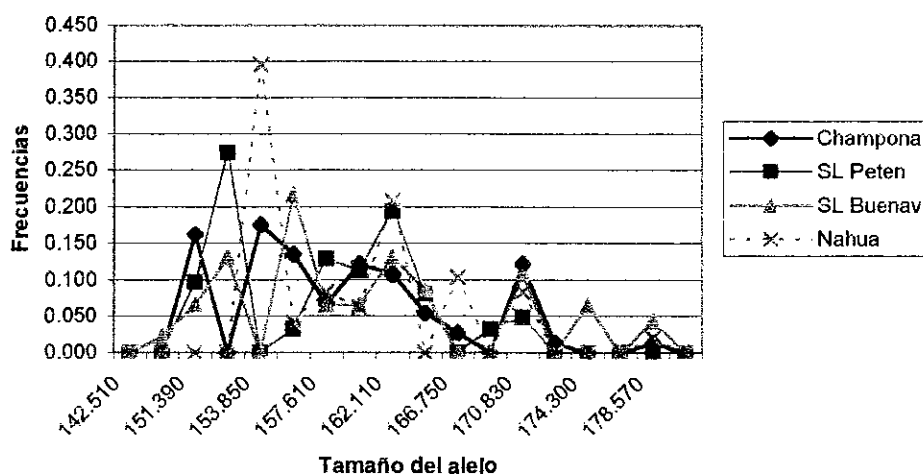
Alelos	POBLACIONES DEL NORTE				TOTAL ALELOS NORTE	POBLACIONES DEL SUR							TOTAL ALELOS SUR	POBLACIONES DEL ESTE			TOTAL ALELOS ESTE	ALELOS TOTALES
	S.L. Peten 12/3/96	S. L.P Buenav. 12/3/96	Nahua 13/3/96	Champ. 11/3/96		Lauro 27/3/96	Lauro 7/6/95	Ruperto 27/3/96	Ruperto 4/10/95	EI Mango 28/2/96	Tallado 7/2/95	Curo 27/3/96		EI Motor 20/2/96	P. Blanco 21/2/96			
142.51	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000	0.013	0.000	0.000	0.021	0.010	0.005			
148.97	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.094	0.021	0.000	0.013	0.000	0.014	0.010	0.005	0.010			
151.39	0.097	0.065	0.000	0.162	0.091	0.179	0.000	0.063	0.047	0.063	0.043	0.055	0.063	0.052	0.064			
153.23	0.274	0.130	0.000	0.000	0.100	0.250	0.346	0.344	0.354	0.344	0.325	0.223	0.310	0.089	0.202			
153.85	0.000	0.000	0.396	0.176	0.139	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.271	0.135	0.069			
155.72	0.032	0.217	0.042	0.135	0.104	0.000	0.192	0.156	0.094	0.188	0.100	0.126	0.188	0.250	0.148			
157.61	0.129	0.065	0.083	0.068	0.087	0.179	0.115	0.031	0.104	0.188	0.225	0.213	0.164	0.094	0.127			
160.17	0.113	0.065	0.063	0.122	0.096	0.036	0.038	0.063	0.146	0.000	0.000	0.043	0.073	0.099	0.070			
162.11	0.194	0.130	0.208	0.108	0.157	0.107	0.115	0.031	0.052	0.063	0.088	0.170	0.093	0.094	0.110			
164.09	0.081	0.087	0.000	0.054	0.057	0.107	0.038	0.094	0.125	0.047	0.050	0.096	0.083	0.016	0.061			
166.75	0.000	0.000	0.104	0.027	0.030	0.000	0.038	0.125	0.031	0.094	0.038	0.021	0.045	0.063	0.045			
169.00	0.032	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.038	0.032	0.017	0.000	0.011			
170.83	0.048	0.109	0.083	0.122	0.091	0.107	0.038	0.000	0.000	0.016	0.000	0.012	0.042	0.047	0.042			
172.91	0.000	0.000	0.000	0.014	0.004	0.000	0.000	0.031	0.010	0.000	0.013	0.021	0.012	0.000	0.007			
174.3	0.000	0.065	0.000	0.000	0.013	0.000	0.038	0.000	0.000	0.000	0.013	0.011	0.007	0.036	0.015			
177.13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.002			
178.57	0.000	0.043	0.021	0.014	0.017	0.036	0.000	0.000	0.000	0.025	0.021	0.012	0.000	0.000	0.011			
180.74	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.001			

Gráfica 1: Frecuencia de alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90



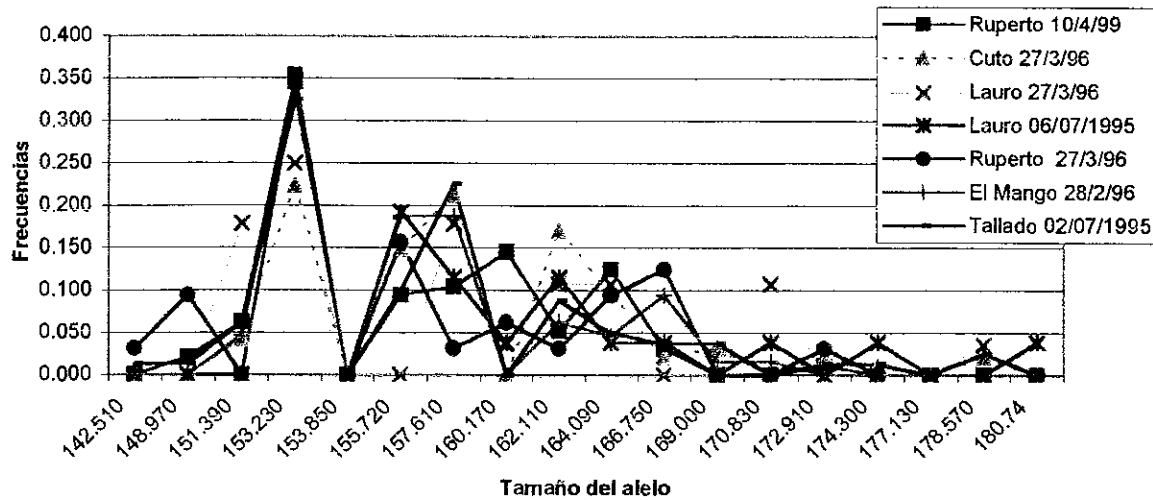
En la gráfica 2 se presentan las frecuencias alélicas de las poblaciones del Norte, para el microsatélite 1-90. Al comparar estas frecuencias alélicas, se puede notar que las cuatro poblaciones presentan patrones bastante diferentes. Si se observan los alelos más frecuentes que son el 153.85 para Nahuá y Champona, el 153.23 para San Luis Petén y el 155.72 para San Luis Petén Buenaventura las diferencias resultan más evidentes.

Gráfica 2: Comparación de las frecuencias alélicas de las poblaciones del Norte, microsatélite 1-90



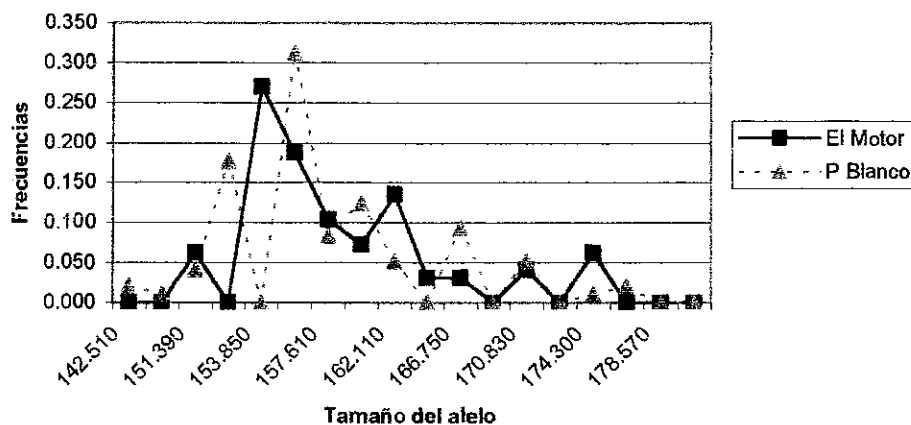
En la gráfica 3 a continuación se comparan las frecuencias alélicas de las poblaciones del sur, para el microsatélite 1-90. Se puede observar que dichas poblaciones presentan patrones similares. El alelo 153.23 es el más frecuente para todas las poblaciones.

Gráfica 3: Comparación de las frecuencias alélicas de las poblaciones del Sur, microsatélite 1-90



En la gráfica 4 se comparan las frecuencias alélicas de las dos poblaciones del Este para el microsatélite 1-90. Se puede observar que los patrones son diferentes tanto para los alelos mas frecuentes como para la mayoría de ellos.

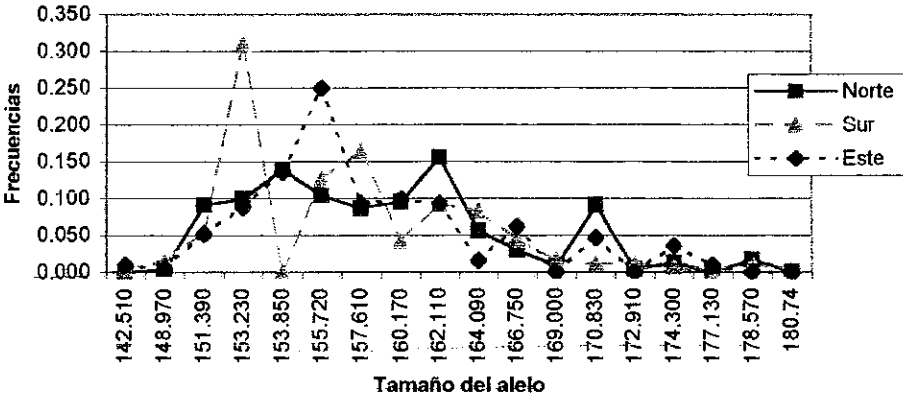
Gráfica 4: Comparación de las frecuencias alélicas de las poblaciones del Este, microsatélite 1-90



A continuación se presenta la gráfica 5, que compara las frecuencias alélicas obtenidas para las regiones norte, sur y este de Guatemala con el microsatélite 1-90. Se puede notar que la región del sur tiene un patrón diferente de las regiones norte y este, las cuales comparten

ciertas características a pesar de no ser iguales. Esto sugiere cierto aislamiento entre las regiones noreste y sur, probablemente por la presencia de alguna barrera geográfica.

Gráfica 5: Comparación de las frecuencias alélicas obtenidas para las regiones Norte, Sur y Este, microsatélite 1-90



En el cuadro 13 a continuación se presentan los alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14 y en el cuadro 14 y gráfica 6 se presentan las frecuencias de alelos para este microsatélite.

Se puede notar que al igual que con el microsatélite 1-90, las frecuencias de los alelos que se determinaron para el microsatélite 1-90 presentan una distribución casi normal, y los alelos se diferencian en casi dos bases para la mayoría de casos.

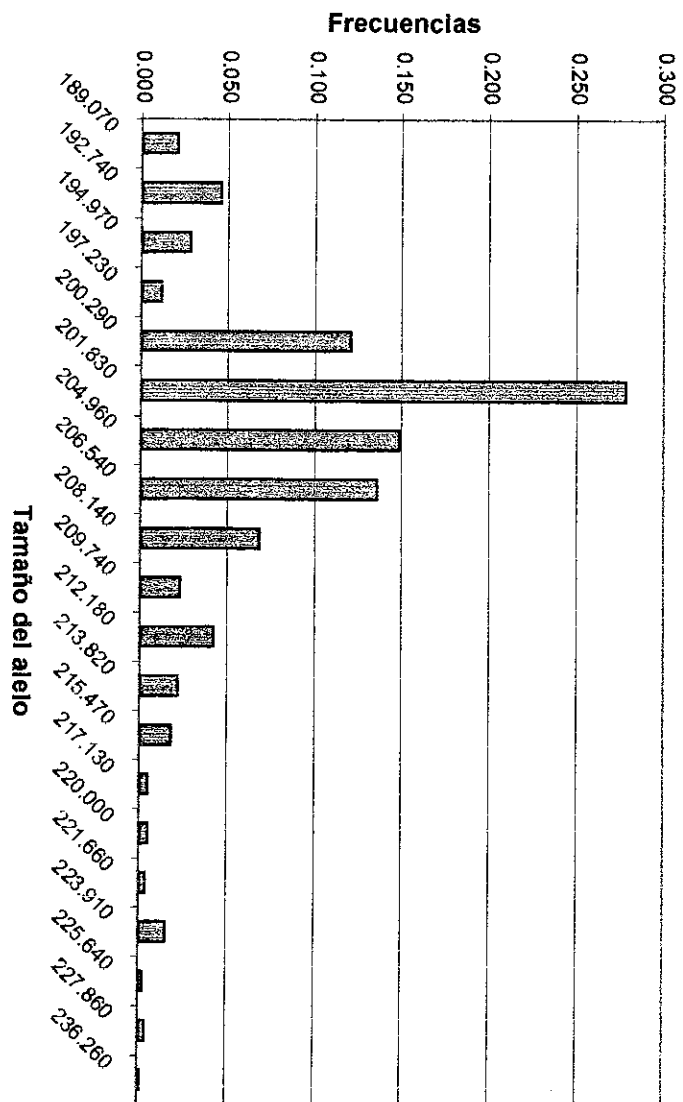
Cuadro 13
Auelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14

Auelos	POBLACIONES DEL NORTE					POBLACIONES DEL SUR								POBLACIONES DEL ESTE			AUELOS TOTALES
	S.L. Petén 12/3/96	S.L.P Buenav. 12/3/96	Nahua 13/3/96	Champ. 11/3/96	TOTAL AUELOS NORTE	Lauro 27/3/96	Lauro 7/6/95	Ruperto 27/3/96	Ruperto 4/10/95	Ei Mango 28/2/96	Tallado 7/2/95	Cuto 27/3/96	TOTAL AUELOS SUR	Ei Motor 20/2/96	P. Blanco 21/2/96	TOTAL AUELOS ESTE	
189.07	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	6	2	11	1	4	5	16
192.74	3	0	0	0	3	1	2	1	5	5	2	3	19	10	4	14	36
194.97	0	0	2	5	7	0	2	2	0	0	2	7	13	0	2	2	22
197.23	2	2	0	0	4	2	1	0	1	0	0	1	5	0	0	0	9
200.29	0	7	0	0	7	2	6	1	0	7	5	26	47	0	40	40	94
201.83	29	21	16	23	89	8	8	5	47	4	16	12	100	24	4	28	217
204.96	10	0	8	14	32	2	3	14	3	7	7	15	51	20	13	33	116
206.54	3	1	9	12	25	5	0	0	16	14	10	13	58	10	13	23	106
208.14	6	9	6	7	28	2	2	0	6	0	2	0	12	13	0	13	53
209.74	0	2	0	0	2	0	1	7	0	1	0	0	9	7	0	7	18
212.18	0	0	2	9	11	0	0	0	0	3	0	12	15	2	5	7	33
213.82	5	3	0	1	9	0	0	0	7	0	0	0	7	1	0	1	17
215.47	1	0	4	1	6	0	1	0	0	0	0	3	4	0	4	4	14
217.13	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	2	0	1	1	4
220	0	1	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	2	1	0	1	4
221.66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2	2	3
223.91	0	0	0	2	2	0	0	1	1	0	0	0	2	4	4	8	12
225.64	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2
227.86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	0	1	3
236.26	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1

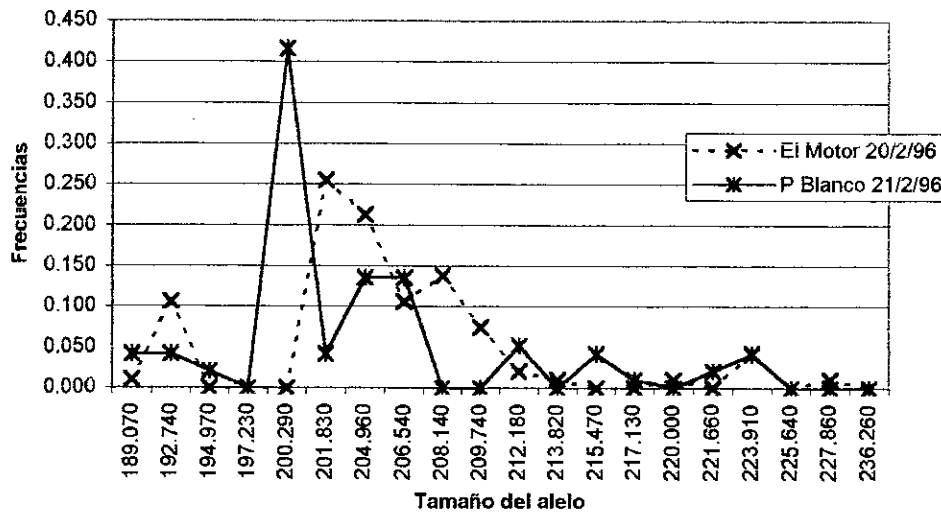
Cuadro 14
Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14

Alelos	POBLACIONES DEL NORTE					POBLACIONES DEL SUR										POBLACIONES DEL ESTE			TOTAL ALELOS TOTALES
	S.L. Peten 12/3/96	S.L.P Buenav. 12/3/96	Nahua 13/3/96	Champ. 11/3/96	TOTAL ALELOS NORTE	Lauro 27/3/96	Lauro 7/6/95	Ruperto 27/3/96	Ruperto 4/10/95	Ei 28/2/96	Tallado 7/2/95	Curo 27/3/96	TOTAL ALELOS SUR	Ei 20/2/96	P. Blanco 21/2/96	TOTAL ALELOS ESTE			
189.07	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.077	0.000	0.000	0.011	0.000	0.120	0.021	0.030	0.011	0.042	0.026	0.021		
192.74	0.050	0.000	0.000	0.000	0.013	0.038	0.077	0.031	0.056	0.119	0.040	0.031	0.052	0.106	0.042	0.074	0.046		
194.97	0.000	0.000	0.042	0.068	0.031	0.000	0.077	0.063	0.000	0.000	0.040	0.073	0.036	0.000	0.021	0.011	0.028		
197.23	0.033	0.043	0.000	0.000	0.018	0.077	0.038	0.000	0.011	0.000	0.000	0.010	0.014	0.000	0.000	0.000	0.012		
200.29	0.000	0.152	0.000	0.000	0.031	0.077	0.231	0.031	0.000	0.167	0.100	0.271	0.130	0.000	0.417	0.211	0.121		
201.83	0.483	0.457	0.333	0.311	0.390	0.308	0.308	0.156	0.522	0.095	0.320	0.125	0.276	0.255	0.042	0.147	0.278		
204.96	0.167	0.000	0.167	0.189	0.140	0.077	0.115	0.438	0.033	0.167	0.140	0.156	0.141	0.213	0.135	0.174	0.149		
206.54	0.050	0.022	0.188	0.162	0.110	0.192	0.000	0.000	0.178	0.333	0.200	0.135	0.160	0.106	0.135	0.121	0.136		
208.14	0.100	0.196	0.125	0.095	0.123	0.077	0.077	0.000	0.067	0.000	0.040	0.000	0.033	0.138	0.000	0.068	0.068		
209.74	0.000	0.043	0.000	0.000	0.009	0.000	0.038	0.219	0.000	0.024	0.000	0.000	0.025	0.074	0.000	0.037	0.023		
212.18	0.000	0.000	0.042	0.122	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000	0.125	0.041	0.021	0.052	0.037	0.042		
213.82	0.083	0.065	0.000	0.014	0.039	0.000	0.000	0.000	0.078	0.000	0.000	0.000	0.019	0.011	0.000	0.005	0.022		
215.47	0.017	0.000	0.083	0.014	0.026	0.000	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.011	0.000	0.042	0.021	0.018		
217.13	0.000	0.000	0.021	0.000	0.004	0.038	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000	0.010	0.005	0.005		
220	0.000	0.022	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.006	0.011	0.000	0.005	0.005		
221.66	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.003	0.000	0.021	0.011	0.004		
223.91	0.000	0.000	0.000	0.027	0.009	0.000	0.000	0.031	0.011	0.000	0.000	0.000	0.006	0.043	0.042	0.042	0.015		
225.64	0.017	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.003		
227.86	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.006	0.011	0.000	0.005	0.004		
236.26	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.001		

Gráfica 6: Frecuencia de alelos obtenidos por población con el microsatelite 2-14

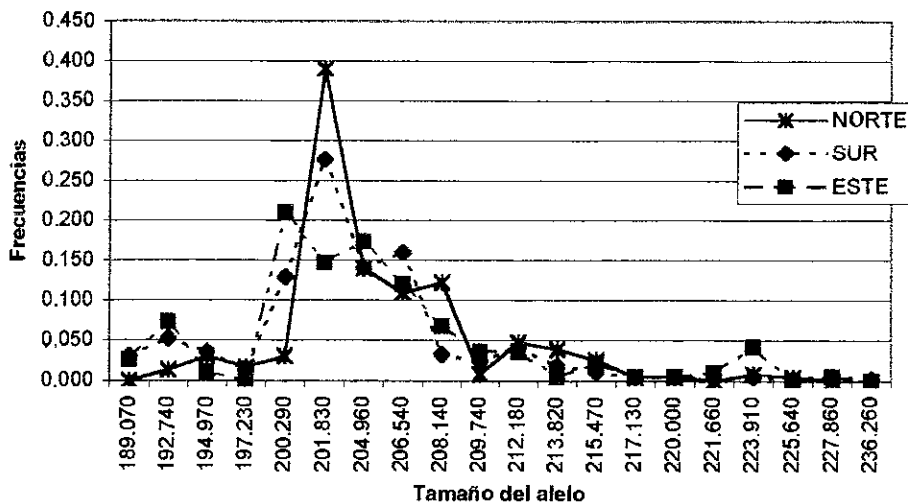


Gráfica 9: Comparación de las frecuencias alélicas de las poblaciones del Este, microsatélite 2-14



En la gráfica 10 se comparan las frecuencias alélicas obtenidas para las regiones norte, sur y este de Guatemala con el microsatélite 2-14. En esta gráfica puede notarse que los patrones resultaron ser similares para las tres regiones con este microsatélite, mientras que con el microsatélite 1-90 (ver gráfica 5), la región del sur tiene un patrón diferente de las regiones norte.

Gráfica 10: Comparación de las frecuencias alélicas obtenidas para las regiones Norte, Sur y Este, microsatélite 2-14



En el cuadro 15 a continuación se presentan los alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41 y en el cuadro 16 y la gráfica 11 se presentan las frecuencias de alelos para este microsatélite.

Como con los microsatélites 1-90 y 2-14, las frecuencias de los alelos que se determinaron para el microsatélite 6-41 presentan una distribución casi normal, y los alelos se diferencian en casi dos bases para la mayoría de casos. Con este marcador se obtuvo un número reducido de alelos en comparación con los microsatélites anteriores.

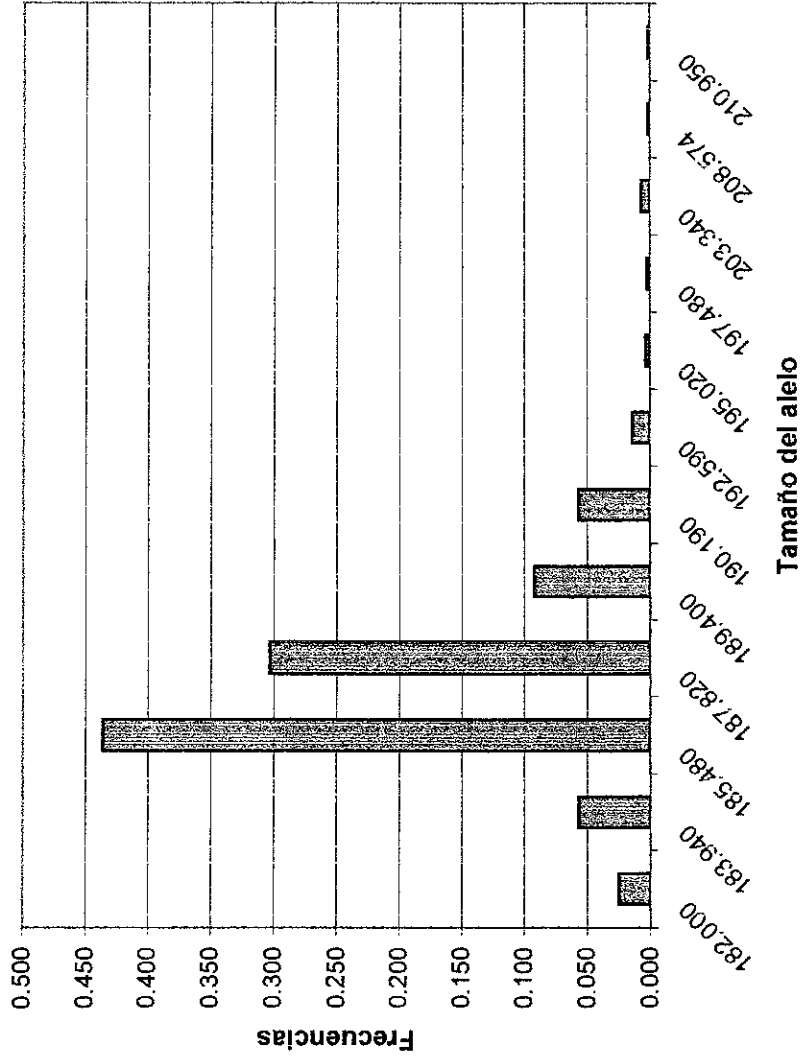
Cuadro 15
Alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41

Alelos	POBLACIONES DEL NORTE					POBLACIONES DEL SUR								POBLACIONES DEL ESTE			ALELOS TOTALES
	S.L. Petén 12/3/96	S. L.P Buenav. 12/3/96	Natua 13/3/96	Champ. 11/3/96	TOTAL ALELOS NORTE	Lauro 27/3/96	Lauro 7/6/95	Ruperto 27/3/96	Ruperto 4/10/95	Ei Mango 28/2/96	Talado 7/2/95	Cuto 27/3/96	TOTAL ALELOS SUR	Ei Motor 20/2/96	P. Blanco 21/2/96	TOTAL ALELOS ESTE	
182	0	0	2	0	2	0	1	4	11	2	0	1	19	0	0	0	21
183,94	3	1	3	5	12	0	0	0	0	13	4	6	23	7	6	13	48
185,48	21	19	20	17	77	10	14	15	38	20	44	52	193	43	55	98	368
187,82	32	23	15	43	113	13	6	8	38	20	0	0	85	31	27	58	256
189,4	5	3	7	9	24	0	0	0	0	0	19	20	39	8	7	15	78
190,19	0	0	0	0	0	4	3	1	8	8	11	13	48	0	0	0	48
192,59	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	1	2	8	4	0	4	12
195,02	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	3
197,48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	2
203,34	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	4	1	0	1	6
208,57	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
210,95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1

Cuadro 16
Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41

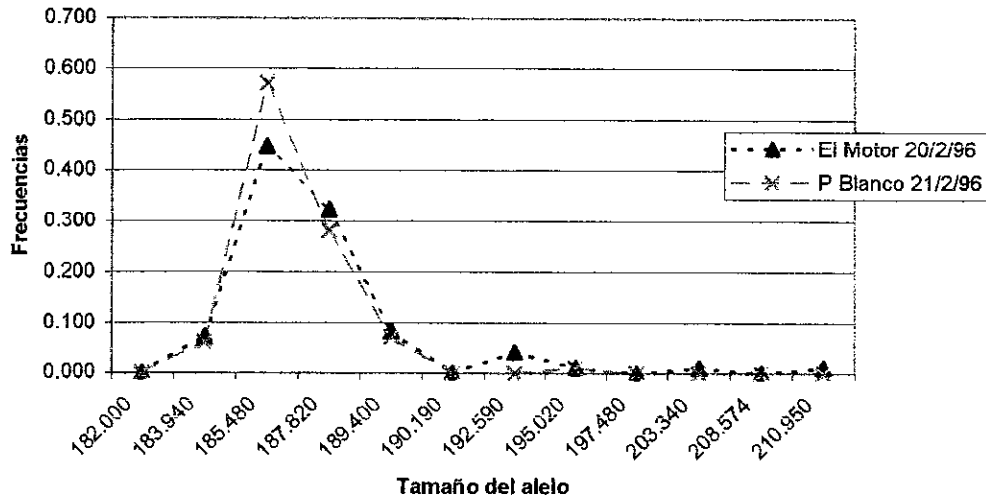
Alelos	POBLACIONES DEL NORTE					POBLACIONES DEL SUR					POBLACIONES DEL ESTE					
	S.L. Peten 12/3/96	S. L.P Buenav. 12/3/96	Nahua 13/3/96	Champ. 11/3/96	TOTAL ALELOS NORTE	Lauro 27/3/96	Lauro 7/6/95	Ruperto 27/3/96	Ruperto 4/10/95	Ei Mango 28/2/96	Tallado 7/2/95	Cuto 27/3/96	TOTAL ALELOS SUR	Ei Motor 20/2/96	P. Blanco 21/2/96	TOTAL ALELOS ESTE
182	0.000	0.000	0.042	0.000	0.009	0.000	0.038	0.125	0.115	0.031	0.000	0.010	0.045	0.000	0.000	0.000
183.94	0.048	0.022	0.063	0.068	0.052	0.000	0.000	0.000	0.000	0.203	0.050	0.063	0.055	0.073	0.063	0.068
185.48	0.339	0.413	0.417	0.230	0.335	0.357	0.538	0.469	0.396	0.313	0.550	0.542	0.457	0.448	0.573	0.510
187.82	0.516	0.500	0.313	0.581	0.491	0.464	0.231	0.250	0.396	0.313	0.000	0.000	0.201	0.323	0.281	0.302
189.4	0.081	0.065	0.146	0.122	0.104	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.238	0.208	0.092	0.083	0.073	0.078
190.19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.143	0.115	0.031	0.083	0.125	0.138	0.135	0.114	0.000	0.000	0.000
192.59	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.094	0.010	0.000	0.013	0.021	0.019	0.042	0.000	0.021
195.02	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.010	0.010	0.004
197.48	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.005	0.000	0.000	0.002
203.34	0.000	0.000	0.021	0.000	0.004	0.000	0.038	0.031	0.000	0.016	0.013	0.000	0.009	0.010	0.000	0.007
208.57	0.016	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
210.95	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.005

Gráfica 11: Frecuencia de alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41



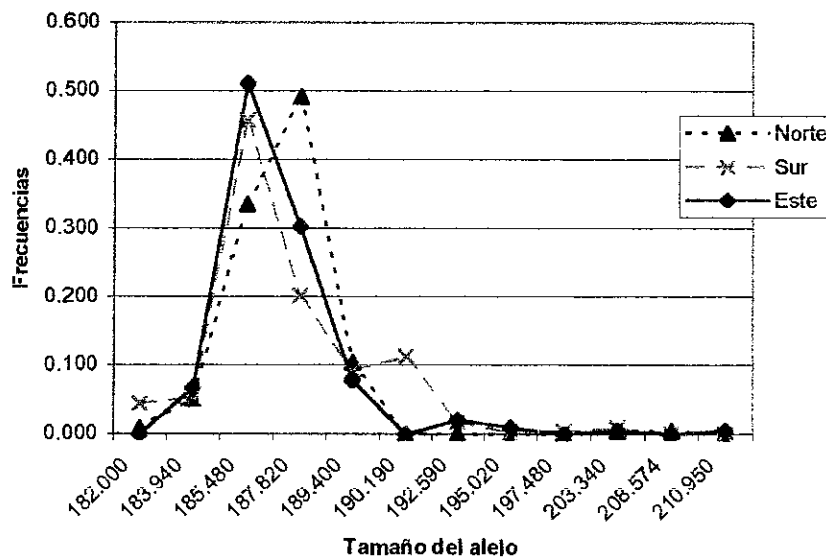
En la gráfica 14 se comparan las frecuencias alélicas de las poblaciones del este con el microsatélite 6-41. Las dos poblaciones que conforman esta región tienen patrones casi idénticos.

Gráfica 14: Comparación de las frecuencias alélicas de las poblaciones del Este, microsatélite 6-41



En la gráfica 15 se comparan las frecuencias alélicas obtenidas para las regiones norte, sur y este con el microsatélite 6-41. Se puede observar en esta gráfica que las tres regiones tienen patrones muy parecidos, aunque el alelo más frecuente de la región del norte no es el mismo que para el sur y el este.

Gráfica 15: Comparación de las frecuencias alélicas obtenidas para las regiones Norte, Sur y Este, microsatélite 6-41



C. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico al utilizar el programa para genética de poblaciones Arlequin ver.1.1 (Schneider, 1997). Los resultados que se presentan a continuación se calcularon al ingresar los datos de los tres microsatélites juntos. También se analizaron los microsatélites por separado, los resultados se presentan en la sección de anexos.

En el cuadro 17 se describe la forma en que fueron agrupadas las poblaciones o colectas formando los grupos que definieron cada región; para calcular los parámetros estadísticos que se presentan en los cuadros siguientes.

Cuadro 17: Estructura de grupos para el ingreso de datos

Grupo Norte	Grupo Sur	Grupo Este
Champona 11/3/96	Cuto 27/3/96	El Motor 20/2/96
Nahua 13/3/96	Lauro 27/3/96	Puente Blanco 21/2/96
San Luis Peten 12/3/96	Lauro 7/6/95	
S.L.P. Buenaventura 12/3/96	El Mango 28/2/96	
	Ruperto 4/10/95	
	Ruperto 27/3/96	
	Tallado 7/2/95	

Como se indica en la sección de antecedentes teóricos, se debió probar la independencia de cada locus antes de realizar un análisis estadístico con los datos de los tres microsatélites combinados.

Los análisis de ligamiento de locus por parejas se hicieron al separar los datos por regiones y también al tomar todos los individuos como una población total. Los resultados se presentan en los cuadros 18, 19, 20 y 21 a continuación.

Mientras que para la región norte no se detectó ligamiento entre los microsatélites, con las poblaciones del este el microsatélite 2-14 resultó ligado con los microsatélites 1-90 y 6-41 y con las poblaciones del sur, el microsatélite 6-41 resultó ligado con los microsatélites 1-90 y 2-14. Al analizar todos los individuos juntos, como una población total, las tres parejas de microsatélites resultaron ligadas. A pesar de ello, se asumió que los microsatélites son independientes debido a la inconsistencia de los resultados por regiones y porque se estima que es muy poco probable que las secuencias microsatélites se encuentren cercanas en el genoma del insecto ya que tales marcadores fueron seleccionados al azar.

Cuadro 18: Análisis de ligamiento de locus por parejas para las poblaciones del Este

Pareja de locus analizado	Valor de P	Prueba de Chi²	Significancia (nivel de 0.05)
1-90 con 2-14	0.0000 ± 0.000000	223.454 (P=1, 2327 g.l)	+
1-90 con 6-41	0.6111± 0.00180429	64.625 (P=1, 2041 g.l)	-
2-14 con 6-41	0.0164±0.000402889	101.629 (P=1, 2718 g.l)	+

Cuadro 19: Análisis de ligamiento de locus por parejas para las poblaciones del Norte

Pareja de locus analizado	Valor de P	Prueba de Chi ²	Significancia (nivel de 0.05)
1-90 con 2-14	0.5032 ± 0.001518	152.4 (P=1, 3066 g.l)	-
1-90 con 6-41	0.5762 ± 0.001472	56.9 (P=1, 2506 g.l)	-
2-14 con 6-41	0.7209 ± 0.001351	54.79 (P=1, 2480 g.l)	-

Cuadro 20: Análisis de ligamiento de locus por parejas para las poblaciones del Sur

Pareja de locus analizado	Valor de P	Prueba de Chi ²	Significancia (nivel de 0.05)
1-90 con 2-14	0.0902648±0.0009427	228.997(P=1, 5424 g.l)	-
1-90 con 6-41	8.98455*10 ⁻⁵ ±2.95657*10 ⁻⁵	155.294 (P=1, 4784 g.l)	+
2-14 con 6-41	0.0281815 ±0.000545235	154.564 (P=1, 5780 g.l)	+

Cuadro 21: Análisis de ligamiento de locus por parejas para la población total

Pareja de locus analizado	Valor de P	Prueba de Chi ²	Significancia (nivel de 0.05)
1-90 con 2-14	0.0000000 ± 0	367.347 (P= 1, 12438 g.l)	+
1-90 con 6-41	0.00223615 ±0.000150052	185.532 (P= 1, 9990 g.l)	+
2-14 con 6-41	0.00682824 ± 0.000259858	199.48 (P= 1, 10689 g.l)	+

La tercera suposición sobre la cual se basó el análisis estadístico de los microsatélites consistió en asumir que cada locus era un marcador neutro. Puesto que se pretendió medir factores como diversidad genética y migración entre regiones, se esperaba que no existiera selección sobre los microsatélites, que pudiera estabilizar o fijar las frecuencias de ciertos alelos y por consiguiente llevar a una mala interpretación de los resultados. Con este propósito se realizó el análisis de Hardy-Weinberg en tres niveles.

En los cuadros 22, 23 y 24 a continuación se presentan los valores obtenidos para el equilibrio de Hardy-Weinberg por poblaciones, por regiones y para la población total, respectivamente.

Al analizar las colectas por separado, se encontró que con dos de los microsatélites la mayoría de las poblaciones está en equilibrio, tal como se esperaba si se tiene en cuenta que dentro de las poblaciones no deben existir fuerzas que desvíen las frecuencias genotípicas de las esperadas, si el marcador bajo estudio no está sujeto a selección natural.

Al estudiar los individuos por regiones, que agrupan las poblaciones correspondientes se encontró que ninguna de las regiones cumple con el equilibrio de Hardy-Weinberg para los microsatélites 2-14 y 6-41, mientras que sólo la región del Sur cumple con el equilibrio para el microsatélite 1-90. También se determinó que la población total tampoco está en equilibrio.

Cuando el equilibrio de Hardy-Weinberg no se establece en una población, es porque la frecuencia de genotipos observada no corresponde a la esperada y esto no es una consecuencia exclusiva de selección natural. Como se describe en la teoría, una población no está en equilibrio por el efecto de una o varias fuerzas combinadas como la deriva genética (por ejemplo cuellos de botella causados por condiciones climáticas o fumigación con insecticidas) y migración o flujo de genes reducido a causa de una gran distancia geográfica.

Es importante notar que los resultados del análisis de Hardy-Weinberg no son representativos para la región del este debido a que está formada únicamente por dos poblaciones, de las cuales una no está en equilibrio al estudiarla por separado.

En cuanto a las regiones norte y sur, y también a la población total, que no están en equilibrio de Hardy-Weinberg, se cree que existen fuerzas como migración o flujo de genes entre regiones y deriva genética que alteran las frecuencias genotípicas con respecto a las esperadas. Estos eventos son muy comunes en poblaciones de insectos; la migración entre regiones representa el ingreso de individuos con genotipos diferentes a una población que se encontraba originalmente en equilibrio y que con la introducción de nuevos alelos éste se ve alterado. La deriva genética ocurre normalmente cuando emerge una nueva población de un número reducido de individuos que ya sea migraron de una población mayor o que sobrevivieron a condiciones adversas (por ejemplo fumigaciones con insecticidas) que redujeron mucho el tamaño de la población original, de modo que en la nueva población ciertos genotipos están ausentes y causan el desequilibrio. Para determinar la magnitud de estas fuerzas en términos estadísticos, se compararon las tres regiones al utilizar parámetros como el análisis de varianza AMOVA, las F_s de Wright y la migración efectiva.

Cuadro 22: Valores del equilibrio de Hardy-Weinberg por poblaciones y significancia para cada microsatélite

Población	Microsatélite			Significancia		
	1-90	2-14	6-41	1-90	2-14	6-41
San Luis Peten 12/3/96	0.02248	0.09314	0.41661	-	+	+
SL Peten Buenaventura 12/3/96	0.43717	0.00081	0.00936	+	-	-
Nahua 13/3/96	0.04566	0.00000	0.00096	-	-	-
Champona 11/3/96	0.89269	0.08918	0.90313	+	+	+
Lauro 27/3/96	0.04312	0.75233	0.15924	-	+	+
Lauro 7/6/95	0.48428	0.05210	0.36960	+	+	+
Ruperto 27/3/96	0.99789	0.00849	0.54390	+	-	+
Ruperto 4/10/95	0.37613	0.00000	0.64242	+	-	+
El Mango 28/2/96	0.04007	0.00070	0.65309	-	-	+
Tallado 7/2/95	0.42964	0.00000	0.85474	+	-	+
Cuto 27/3/96	0.12180	0.00000	0.60187	+	-	+
El Motor 20/2/96	0.04337	0.00000	0.02285	-	-	-
Puente Blanco 21/2/96	0.05700	0.25632	0.10699	+	+	+

Cuadro 23: Valores del equilibrio de Hardy-Weinberg por regiones y significancia para cada microsátelite

Región	Microsátelite			Significancia		
	1-90	2-14	6-41	1-90	2-14	6-41
Norte	0.0678	0.0000	0.03496	-	-	-
Sur	0.30852	0.0000	0.00046	+	-	-
Este	0.00619	0.0000	0.00880	-	-	-

Cuadro 24: Valores del equilibrio de Hardy-Weinberg para la población total

Individuos estudiados	Microsátelite			Significancia		
	1-90	2-14	6-41	1-90	2-14	6-41
Población total	0.00000	0.00000	0.03693	-	-	-

En el cuadro 25 se presenta el análisis de varianza AMOVA. Los resultados de este análisis mostraron que el porcentaje de variación fue mucho más alto dentro de las poblaciones (92.85%) que entre las poblaciones de una región (4.23%), y que a su vez el porcentaje de variación fue aún menor cuando se compararon las regiones (2.92%).

El porcentaje de variación entre poblaciones dentro de las regiones sugiere que hay de flujo genético entre poblaciones adyacentes o cercanas. El porcentaje de variación entre regiones indica que si bien hay migración de individuos entre ellas, aún hay diferencias que se mantienen por un flujo de genes restringido por algún tipo de barrera o por distancia geográfica que no permite la completa homogeneización de la población total. A fin de concluir respecto a la magnitud de estas diferencias entre regiones se calcularon los índices de fijación de Wright.

Es importante notar que al realizar el análisis estadístico AMOVA con los microsátelites por separado (Ver sección de anexos), se obtuvieron resultados similares que al analizar los tres juntos. Esto indica que los tres marcadores microsátelites se vieron afectados de la misma forma, tal como se espera si se toma en cuenta que los factores de cruzamiento al azar, deriva genética y flujo de genes afectan al genoma completo del vector y no a un marcador en particular, como sucedería si ocurriese el efecto de "assortative mating" o "cruce sesgado" que se describió en la teoría.

Cuadro 25: Análisis de varianza AMOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre regiones	2	19.099	0.02344 Va	2.92
Entre las poblaciones dentro de las regiones	10	28.316	0.03398 Vb	4.23
Dentro de las poblaciones	831	619.809	0.74586 Vc	92.85
Total	843	667.224	0.80328	

En el cuadro 26 a continuación se presentan los valores de los índices de fijación de Wright. El índice F_{ST} describe la desviación respecto de la reproducción al azar entre regiones. Según Hartl, 1988, el valor de F_{ST} que se obtuvo en este estudio cae en el rango de 0.05 a 0.15, a lo que se le atribuye una diferenciación genética moderada. Estas diferencias pudieron originarse por deriva genética, y se mantienen gracias a grandes distancias geográficas que impiden el libre flujo de genes entre las regiones, esta barrera no permite la completa homogeneización de la población total por lo que se determina que no es panmítica o de cruzamiento aleatorio. Al analizar los microsatélites por separado los resultados fueron consistentes, ya que se obtuvieron valores de F_{ST} que caían dentro del mismo rango propuesto por Hartl, 1988; con evidencia de que los tres marcadores microsatélites fueron afectados de igual modo.

Cuadro 26: Índices de fijación F de Wright

Fsc	0.04357
F_{ST}	0.07148
Fct	0.02918

En el cuadro 27 se presentan los valores de F_{ST} por parejas. Al analizar las poblaciones del norte, se vio que la población de Champona es diferente a todas las demás poblaciones, lo mismo sucedió con Nahua excepto que tiene similitud con las dos poblaciones del este que son El Motor y Puente Blanco. La población de San Luis Petén fue diferente a todas las poblaciones excepto a San Luis Petén Buenaventura que está adyacente, y a las poblaciones de Lauro y Ruperto en el sur. La población de San Luis Petén Buenaventura se diferencia de todas las poblaciones excepto de las de Lauro en el sur y Puente Blanco en el este. Finalmente de las 10 similitudes encontradas al comparar las poblaciones del norte con el resto de las poblaciones bajo estudio, se encontró que dos fueron entre poblaciones de la misma región norte, cinco para el sur y tres para el este.

Al analizar las poblaciones del sur, se encontró que la población de Cuto es diferente a todas poblaciones bajo estudio excepto a una de las poblaciones de Lauro y a Tallado, ambas del sur. Las poblaciones de Lauro fueron similares entre ellas y también a varias poblaciones, como San Luis Petén y San Luis Petén Buenaventura en el norte; Cuto, Ruperto y Tallado en el sur, y por último a Puente Blanco en el este. La población de El

Mango fue diferente a todas las demás poblaciones excepto a las poblaciones de Lauro y Ruperto ambas en el sur. Las poblaciones de Ruperto son diferentes de todas las demás poblaciones del estudio excepto a algunas poblaciones del sur y lo mismo sucedió con Tallado. Finalmente, la gran mayoría de similitudes que ocurrieron en esta región fueron entre poblaciones del sur.

Al estudiar las poblaciones del este, se encontró que la población de El Motor fue diferente a todas las demás poblaciones excepto a Nahua en el norte. De igual modo, la población de Puente Blanco resultó ser diferente a todas las poblaciones, incluso a la otra población del este, pero similar a Nahua y a San Luis Petén en el norte y a Lauro en el sur. De las cuatro similitudes que se encontraron en las poblaciones del este, tres ocurrieron con poblaciones del norte y una con el sur.

El gran número de diferencias significativas entre poblaciones confirma la diferenciación genética moderada entre regiones que se establecieron al calcular el índice F_{ST} y el porcentaje de variación del análisis de varianza AMOVA.

Es muy importante notar que en el estudio se incluyeron poblaciones del mismo sitio de colección pero con diferentes fechas, tal es el caso de las poblaciones de Ruperto y Lauro, cuyas fechas de colección pertenecen al invierno y al verano. Si se comparan las colecciones de invierno y verano para Ruperto y Lauro por medio de los valores de F_{ST} por parejas, se puede notar que no se encontraron diferencias significativas, lo que sugiere que el cambio de estación no representa un “cuello de botella” causante de deriva genética para las poblaciones de mosquitos aunque el análisis de solamente dos poblaciones no es lo suficientemente representativo como para ser concluyente.

Cuadro 27. Fst de las poblaciones por parejas

	Champ (N)	Nahua (N)	SL Peten (N)	SLP Buenav.(N)	Cuto (S)	Lauro 27/3/96 (S)	Lauro 7/6/95(S)	El Mangor(S)	Rup. 4/10/95 (S)	Rup. 27/3/96(S)	Tallado(E)	El Motor(E)
Nahua (N)	0.05654											
SL Peten (N)	0.03738	0.07166										
SLP Buenav. (N)	0.02256	0.02031	0.00959									
Cuto (S)	0.16350	0.07580	0.10591	0.09753								
Lauro 27/3/96 (S)	0.04264	0.08206	-0.00427	0.01262	0.08943							
Lauro 7/6/95 (S)	0.11252	0.04747	0.04102	0.02894	0.02492	0.02532						
El Mangor (S)	0.08898	0.06491	0.03725	0.04323	0.06623	0.02397	0.01149					
Rup. 4/10/95 (S)	0.08010	0.08299	0.01578	0.02872	0.08607	0.00776	0.00872	0.02346				
Rup. 27/3/96 (S)	0.10879	0.06132	0.04765	0.03860	0.03947	0.03947	-0.01155	0.02186	0.00384			
Tallado (S)	0.17883	0.10303	0.10991	0.11238	0.03860	0.09067	0.02505	0.06484	0.08329	0.05367		
El Motor (E)	0.03770	0.01971	0.06188	0.02940	0.08180	0.06149	0.05364	0.07148	0.07468	0.06511	0.10182	
P Blanco (E)	0.09372	0.01991	0.06558	0.02555	0.05888	0.06795	0.00872	0.04723	0.04807	0.02297	0.06755	0.04139

Cuadro 28. Valores de P para Fst

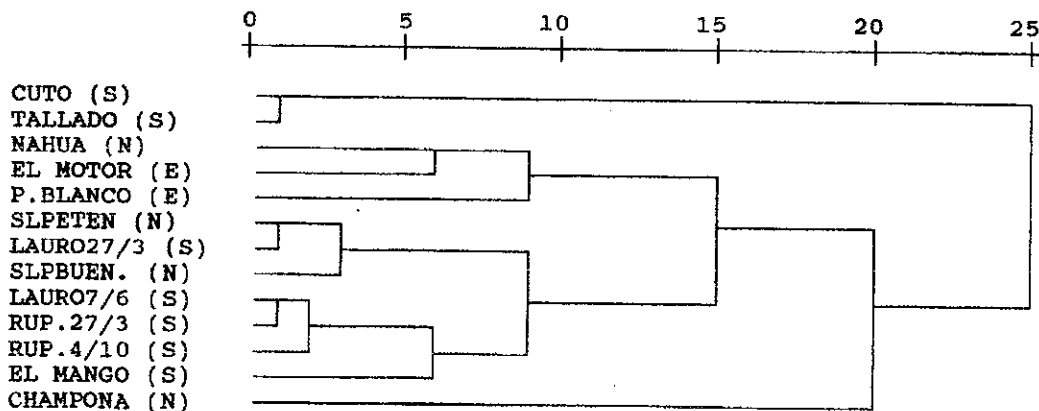
	Champ (N)	Nahua (N)	SL Peten (N)	SLP Buenav.(N)	Cuto (S)	Lauro 27/3/96 (S)	Lauro 7/6/95(S)	El Mangor(S)	Rup. 4/10/95 (S)	Rup. 27/3/96(S)	Tallado(E)	El Motor(E)
Nahua (N)	0.0000+-0.000											
SL Peten (N)	0.0039+-0.010	0.0000+-0.000										
SLP Buenav. (N)	0.0495+-0.022	0.0267+-0.021	0.2970+-0.070									
Cuto (S)	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000								
Lauro 27/3/96 (S)	0.0297+-0.015	0.0000+-0.000	0.7822+-0.038	0.2673+-0.056	0.0000+-0.000							
Lauro 7/6/95 (S)	0.0000+-0.000	0.0039+-0.010	0.0594+-0.022	0.0792+-0.029	0.0690+-0.047	0.0990+-0.030						
El Mangor(S)	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.1485+-0.031	0.1980+-0.045					
Ruperto 4/10/95	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.1980+-0.029	0.0495+-0.022	0.0000+-0.000	0.3366+-0.050	0.3960+-0.033	0.0396+-0.016				
Ruperto 27/3/96	0.0000+-0.000	0.0039+-0.010	0.0198+-0.013	0.0198+-0.013	0.0000+-0.000	0.0198+-0.013	0.7525+-0.043	0.1089+-0.035	0.4752+-0.042			
Tallado (S)	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.8317+-0.034	0.0000+-0.000	0.0990+-0.021	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000		
El Motor (E)	0.0000+-0.000	0.0792+-0.036	0.0000+-0.000	0.0495+-0.022	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	
P Blanco (E)	0.0000+-0.000	0.0792+-0.020	0.0000+-0.000	0.0693+-0.030	0.0000+-0.000	0.0099+-0.010	0.3564+-0.048	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000	0.0495+-0.022	0.0000+-0.000	0.0000+-0.000

En la figura 20 a continuación se presenta un dendrograma que fue calculado a partir de un cluster análisis realizado con los valores $1-[F_{ST}/(1-F_{ST})]$ o $1-$ los valores de la transformación de Slatkin. Este dendrograma expresa la relación que existe entre poblaciones y las agrupa según el nivel de similitud.

Se puede observar que hay dos grandes grupos, el primero formado por dos poblaciones del sur, Cuto y Tallado, que difieren más del resto de las poblaciones. El segundo grupo está formado a su vez por otros dos grupos, de los cuales uno está formado exclusivamente por Champona, una población del norte; y el otro incluye varias poblaciones de las tres regiones relacionadas con diferentes niveles de similitud.

Puede notarse que las poblaciones de El Motor y Puente Blanco que conforman la región este, tienen una relación muy cercana y que a su vez también se relacionan con Nahua, del norte. Esto sugiere flujo de genes entre las regiones del norte y del este, como se vio al analizar los valores de F_{ST} por parejas. También se puede ver que las poblaciones del sur están relacionadas entre sí formando un grupo con varios niveles de similitud que incluye además de varias poblaciones del sur, poblaciones del norte como San Luis Petén y San Luis Petén Buenaventura, pero ninguna población del este. Esto sugiere que también hay flujo de genes entre las regiones norte y sur. Finalmente se concluye que si bien todas las poblaciones están relacionadas en cierto grado, las poblaciones del este están más aisladas genéticamente del sur, aunque ambas tienen relación con el norte.

Figura 20 : Dendrograma realizado a partir de un cluster analisis formulado con los valores $1-[F_{ST}/(1-F_{ST})]$ con el programa SPSS, versión 4.0 (Norusis, 1984)



Para determinar si las diferencias genéticas entre las poblaciones trabajadas se correlacionan con la distancia geográfica que existe entre ellas se realizó un análisis de correlación y el análisis de Mantel. En el análisis de correlación se pretende estimar si existe una relación lineal entre las variables de distancia genética (o su logaritmo) y distancia geográfica entre las poblaciones por parejas. El análisis de Mantel permite determinar si tal correlación es estadísticamente significativo al considerar que existen otros factores que pueden afectar la distancia genética entre poblaciones.

En el cuadro 31 y en las gráficas 16 y 17 a continuación se encuentran los resultados del análisis de Mantel. Estos resultados sugieren que el flujo de genes entre las

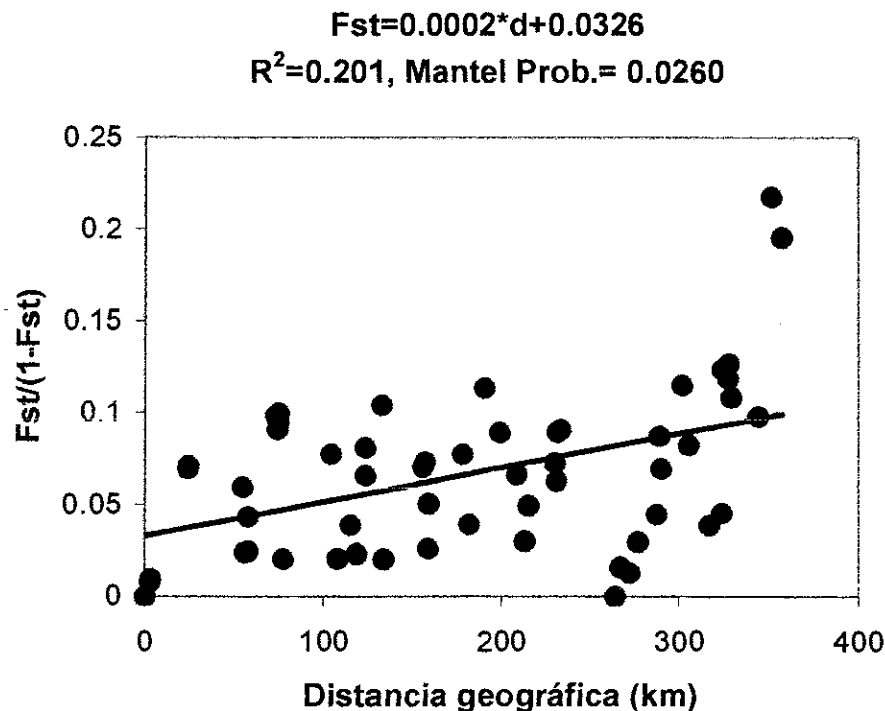
poblaciones de *Anopheles albimanus* disminuye (o aumenta su distancia genética) a medida que aumenta la distancia geográfica que las separa, puesto que las pendientes de las correlaciones fueron positivas y los valores del coeficiente de correlación fueron lo suficientemente altos y estadísticamente significativos según el análisis de Mantel.

Como no existe una barrera geográfica evidente entre las poblaciones, se estima que la distancia geográfica funciona en este caso al disminuir el flujo de genes cuando el mosquito tiene que migrar mas kilómetros para su cruce.

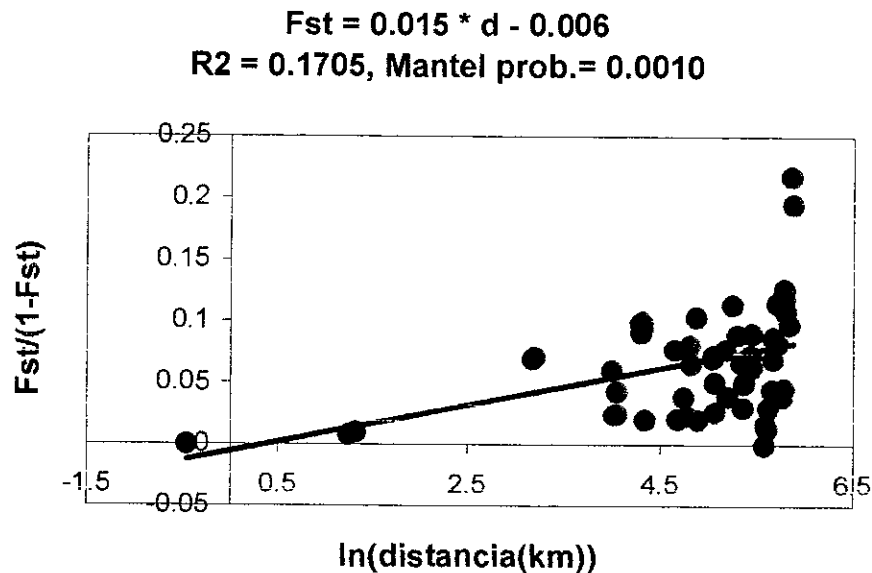
Cuadro 31: Análisis de Mantel, correlación entre distancia geográfica (en Km) y distancia genética según $F_{st}/(1-F_{st})$ entre las poblaciones estudiadas

Correlación	Pendiente	Intercepto	R ²	Probabilidad de Mantel
$F_{st}/(1-F_{st})$ vrs distancia geográfica	0.0002	0.0326	0.2010	0.0260
$F_{st}/(1-F_{st})$ vrs ln(distancia geográfica)	0.0150	-0.0060	0.1705	0.0010

Gráfica 16 : Análisis de Mantel, correlación entre distancia geográfica (en Km) y distancia genética según $F_{st}/(1-F_{st})$ entre las poblaciones estudiadas



Gráfica 17 : Análisis de Mantel, correlación entre Ln (distancia geográfica (en Km)) y distancia genética según $F_{ST}/(1-F_{ST})$ entre las poblaciones estudiadas



Al observar la matriz de los valores de migrantes en el Cuadro 32 a continuación, se encontró una migración muy alta entre ciertas poblaciones. Tal como se indica en los antecedentes teóricos, una alta migración es sinónimo de poca diferencia genética; ya que a medida que aumenta M , el valor de F_{ST} disminuye.

Cabe destacar que Nahua tiene alta migración con San Luis Petén Buenaventura y El Motor; que Champona tiene alta migración con San Luis Petén Buenaventura y éste a su vez con San Luis Petén. Esto indica que hay cierto flujo de genes entre las poblaciones del Norte y del Este; confirmando lo discutido examinar los valores de F_{ST} por parejas, el dendrograma de la figura 20 y el análisis de Mantel en el cuadro 31.

En la región del sur, se encontró alta migración entre las poblaciones de Cuto y Lauro; Lauro y Ruperto (adyacentes); El Mango y Lauro; Tallado y Lauro y por último entre las poblaciones con diferentes fechas de colección de Ruperto y de Lauro. No se detectó alta migración entre ninguna población del Sur y alguna del Este. Una vez más, se confirma la diferenciación genética moderada que se estableció entre las regiones y las relaciones de similitud antes establecidas.

Cuadro 32: Matriz de los valores de Migrantes donde $M=2Nm$

	Champ (N)	Nahua (N)	SL Peten (N)	SLP Buenav.(N)	Cuto (S)	Lauro 27/3/96 (S)	Lauro 7/6/95(S)	El Mango(S)	Rup. 4/10/95 (S)	Rup. 27/3/96(S)	Tallado(E)	El Motor(E)
Nahua (N)	8.34307											
SL Peten (N)	12.87699	6.47705										
SLP Buenaventura (N)	21.65985	24.11445	51.62065									
Cuto (S)	2.55806	6.09588	4.22100	4.62669								
Lauro 27/3/96 (S)	11.22502	5.59293	inf	39.11838	5.09119							
Lauro 7/6/95 (S)	3.94373	10.03339	11.68844	18.77915	19.56133	19.24813						
El Mango (S)	5.11937	7.20240	12.92376	11.06648	7.04972	20.35699	43.01751					
Ruperto 4/10/95 (S)	5.74216	5.52455	31.19274	16.91021	5.30945	63.90984	56.83839	20.81487				
Ruperto 27/3/96 (S)	4.09587	7.65438	9.99383	12.45485	8.39201	12.16679	inf	22.36787	129.84633			
Tallado (S)	2.29602	4.35292	4.04934	3.94927	inf	5.01431	19.46273	7.21173	5.50342	8.81679		
El Motor (E)	12.76345	24.86897	7.58022	16.50455	5.61225	7.63114	8.82138	6.49531	6.19557	7.17900	4.41042	
P Blanco (E)	4.83509	24.61100	7.12426	19.06820	7.99192	6.85784	56.82602	10.08729	9.90207	21.26674	6.90177	11.57919

Es importante mencionar que durante la finalización de esta tesis se encontró que los iniciadores usados para amplificar el microsatélite 2-14 tenían errores. Cada iniciador difería en una base de la secuencia original que se usó para diseñarlos, la secuencia correcta se presenta a continuación con la base incorrecta subrayada. Por esta razón los datos que aquí se presentan para el microsatélite 2-14 son preliminares y está pendiente su revisión con la pareja correcta de iniciadores.

Aams 2-14+	5'-GCC <u>G</u> TT GCC AAG ATA AAA TGG AAA-3'
Aams 2-14-	5'-TCA AAT AAT CCT AAA ACA CCG TCC-3'

Hubo dos estudios anteriores de genética de poblaciones realizados con *Anopheles albimanus*. Inicialmente Mérida, et. al. 1995 utilizó espaciadores intergenicos de ADN ribosomal para comparar las poblaciones de mosquitos de la costa atlántica y pacífica de Guatemala y encontró un 14.4% de variación según el índice de Shannon. En el año 1999 el mismo grupo de investigación comparó las mismas poblaciones al utilizar ADN mitocondrial como marcador genético y encontró un 1.67% de variación según el análisis de AMOVA. En este estudio, en el que también se compararon dichas poblaciones con tres marcadores microsatélites se encontró un porcentaje de variación AMOVA de 2.92%. Los resultados obtenidos en el presente estudio con marcadores microsatélites se asemejan más al estudio realizado en 1999 con ADN Mitocondrial.

VI. CONCLUSIONES

1. Al estudiar las suposiciones necesarias para realizar el análisis estadístico combinado de los tres microsatélites no se detectaron alelos nulos para los locus 1-90 y 6-41 y en el análisis de ligamiento se asumió independencia entre los tres microsatélites. Se asumió neutralidad selectiva para dos marcadores (1-90 y 6-41) porque el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg realizado por poblaciones mostró que la mayoría de las poblaciones estaban en equilibrio.
2. Para los microsatélites 1-90, 2-14 y 6-41 trabajados se encontraron alelos que se diferencian en casi una unidad repetitiva de dos pares de bases, lo cual coincide con el comportamiento esperado de este tipo de marcador según su mecanismo de evolución. Cuando solo hubo una base de diferencia se atribuyó a la presencia de mutaciones puntuales que interrumpían las unidades repetitivas ó que estaban fuera de ellas.
3. Al analizar las frecuencias alélicas de las poblaciones de *Anopheles albimanus* trabajadas se encontró que las regiones norte, sur y este de Guatemala tienen muy poca diferencia en la frecuencia de alelos para los microsatélites 1-90, 2-14 y 6-41.
4. El análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg realizado por poblaciones, por regiones y para la población total de *Anopheles albimanus* estudiada indicó que en su mayoría no están en equilibrio lo cual se puede deber a fuerzas como migración o flujo de genes y deriva genética entre las regiones norte, sur y este de Guatemala.
5. En el análisis de varianza AMOVA se determinó que el porcentaje de variación fue mucho más alto dentro de las poblaciones (92.85%) que entre las poblaciones de una región (4.23%), y que a su vez el porcentaje de variación fue aún menor cuando se compararon las regiones norte, sur y este de Guatemala (2.92%). Se concluyó que hay flujo genético entre poblaciones adyacentes o cercanas y que si bien hay migración de individuos entre regiones aún existen diferencias que se mantienen por un flujo de genes restringido por barreras que no permite la completa homogeneización de la población total. Al analizar los microsatélites por separado se obtuvieron resultados similares por lo que se concluye que los tres marcadores microsatélites, 1-90, 2-14 y 6-41 se vieron afectados de la misma forma.
6. Al calcular el índice F_{ST} de Wright se obtuvo un valor de 0.07148, que indicó una diferenciación genética moderada entre las regiones norte, sur y este de Guatemala. Estas diferencias se atribuyeron a la deriva genética y a barreras que impiden el libre flujo de genes entre las regiones. Se concluyó que la población total de *Anopheles albimanus* no es panmítica o de cruzamiento aleatorio. Al analizar los microsatélites 1-90, 2-14 y 6-41 por separado los resultados fueron consistentes.
7. Al analizar el dendrograma que relaciona a las poblaciones estudiadas según niveles de similitud, se concluyó que:
 - Las poblaciones adyacentes de Cuto y Tallado en el sur están genéticamente mas alejadas del resto de poblaciones estudiadas.

- La población de Champona en el norte está genéticamente alejada del resto de poblaciones estudiadas.
 - Se determinó alta similitud entre las regiones del norte y del este de Guatemala, lo que sugiere flujo de genes entre ellas.
 - Se determinó alta similitud entre las regiones norte y sur del país, lo que sugiere flujo de genes entre ellas.
 - Finalmente se concluye que si bien todas las poblaciones están relacionadas en cierto grado, las poblaciones del este están más alejadas genéticamente del sur, aunque ambas tienen similitudes con el norte
8. Al realizar el análisis de Mantel, se encontró que el flujo de genes entre las poblaciones de *Anopheles albimanus* disminuye a medida que aumenta la distancia geográfica que las separa. Se concluyó que la distancia geográfica funciona como barrera que disminuye el flujo de genes entre poblaciones.
 9. Al estudiar el número de migrantes por población, se encontró que si bien hay flujo de genes entre las regiones norte, sur y este de Guatemala, también hay cierto grado de aislamiento. Se detectó alta migración o flujo de genes entre las poblaciones del Norte y del Este; como se concluyó al examinar los valores de F_{ST} por parejas, el dendrograma de la Figura 20 y el análisis de Mantel. La migración entre poblaciones del sur y del este fue menor que entre las poblaciones del norte y del este; esta diferencia podría deberse a la mayor distancia geográfica que las separa.
 10. El microsatélite 2-14 fue amplificado al utilizar una pareja de iniciadores con una base equivocada para cada dirección y por consiguiente todos los datos son preliminares así también como los parámetros y análisis estadísticos realizados y las conclusiones derivadas de los mismos.
 11. En relación con los estudios anteriores de genética de poblaciones realizados con *Anopheles albimanus*, los resultados obtenidos en el presente estudio con marcadores microsatélites se asemejan más al estudio realizado por Mérida et. al 1999 con ADN Mitocondrial.

VII. RECOMENDACIONES

En cuanto a la metodología empleada para realizar el estudio se recomienda correr una serie de estándares internos en cada gel de secuenciación para poder integrar los datos de una población con otra. Esto puede hacerse seleccionando una colección de individuos de composición alélica conocida como estándares internos para cargarlos en los siguientes geles.

Puesto que el microsatélite 2-14 fue amplificado al utilizar una pareja de iniciadores con una base equivocada para cada dirección, se recomienda volver a trabajar los individuos con los iniciadores correctos o repetir los individuos homocigotos o aquellos a los cuales no se pudo determinar su composición alélica. Una vez obtenidos los nuevos datos se recomienda volver a calcular todos los parámetros y análisis estadísticos pertinentes.

Es muy importante notar que todos los parámetros estadísticos que se calcularon aumentan su exactitud al incrementar el número de muestras o individuos. Por ello se recomienda analizar más individuos de las poblaciones y más poblaciones de las diferentes regiones estudiadas. Especialmente se recomienda analizar poblaciones del Este, donde sólo se trabajaron dos poblaciones en total y también cercanas a Champona, Cuto y Tallado puesto que estas tres poblaciones resultaron ser genéticamente más distantes del resto.

Mérida et. al. 1999 estudió las diferencias que existen en la composición genotípica de los mosquitos *Anopheles albimanus* colectados en invierno y en verano con un marcador mitocondrial (ND5) y concluyó que no existen diferencias significativas causadas por las distintas estaciones. Para poder enriquecer esta información con marcadores microsatélites se recomienda analizar un buen número de individuos colectados en un mismo sitio, en la estación seca y en la época lluviosa de Guatemala.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilar, F.J. 1997. Parasitología médica. 3ª ed. Litografía delgado. Guatemala. 366pp.
- Beaty, B.J. and C.W. Marquardt.(editors). 1996. The Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado. USA. 632pp.
- Black IV, W.C. and N.M. Du Teau. 1997. "RAPD-PCR and SSCP analysis for Insect Population Genetic Studies" in : Crampton, J.M., C.B. Beard and C.Louis (editors). Molecular Biology of Insect Disease Vectors: a Methods Manual. Chapman & Hall.
- Black, W.C. and W.J. Tabachnick. 1995. "Making a Case for Molecular Population Genetic Studies of Arthropod Vectors". Parasitology Today. 11(1):27-30.
- Curtis, H. and N.S. Barnes. 1989. Biology. 5th ed. Worth publishers. USA. 1192pp.
- García, L.S. and D.A. Bruckner. 1993. Diagnostic Medical Parasitology. 2nd ed. American Society for Microbiology. USA. 764pp.
- Godoy Bonilla, H.A. y García Dardón, C. 1980. Aspectos importantes de la malaria en Guatemala. Depto de Educación Sanitaria SNEM. Guatemala. 21pp.
- Dowling, T.E., C. Moritz, J.D. Palmer and L.H. Rieseberg. 1996. "Nucleic Acids III: Analysis of Fragments and Restriction Sites". Chapt 8 in: Hillis, D.M., C. Moritz and B.D. Mable (editors). Molecular Systematics. 2nd ed. Sinauer Associates. USA. 655pp.
- Hartl, D.L. 1988. A Primer of Population Genetics. 2nd ed. Sinauer associates. USA. 305pp.
- Hartl, D.L. and A.G. Clark. 1989. Principles of Population Genetics. 2nd ed. Sinauer Associates. USA. 682pp.
- Hoy, M.A. 1994. Insect Molecular Genetics. An Introduction to Principles and Applications. 1st ed. Academic Press, Inc. USA. 521pp.
- Huffaker, C.B. and R.L. Rabb. 1984. Ecological Entomology. John Wiley & Sons. USA. 844pp.
- Karamjit, S.R. 1996. "Genetic Control of Vectors". Chapt 33 in: Beaty, B.J. and C.W. Marquardt (editors). The Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado. USA. 632pp.
- Katz, M., D.D. Despommier and R. Gwadz. 1982. Parasitic Diseases. Springer Verlag. USA. 264pp.

- Knudson, D.L., L. Zheng, S.W. Gordon, S.E. Brown and F.C. Kafatos. 1996. "Genome Organization of Vectors". Chapt 13 in: Beaty, B.J. and C.W. Marquardt.(editors). The Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado. USA. 632pp.
- Marquardt, W.C. 1996. "Introduction to Arthropods and Vectors". Chapt 1 in: Beaty, B.J. and C.W. Marquardt.(editors). The Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado. USA. 632pp.
- Mérida, A.M.P., M.P. de Mata, E. Molina, C.H. Porter and W.C. Black IV. 1995. "Variation in Ribosomal DNA Intergenic Spacers Among Populations of *Anopheles albimanus* in South and Central America. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 53(5):469-477.
- Mérida, A.M., M. Palmieri, M.M. Yurrita, A. Molina, E. Molina and W.C Black IV. 1999. "Mitochondrial DNA Variation Among *Anopheles albimanus* Population". American Journal of Tropical Medicine and Higiene. 1999. 61(2): 230-239.
- Mettler, L.E., T.G. Gregg and H.E. Schaffer. 1988. Population Genetics and Evolution. 2nd ed. Prentice Hall. USA. 325pp.
- Murray, B. W. 1996. The Estimation of Genetic Distance and Population Substructure from Microsatellite allele frequency data. Department of Biology, McMaster University, 1280 Main Street West, Hamilton, Ontario. Canada, L8S 4K1. <http://helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html>
- Norusis, J.M. 1984. SPSS/PC+ Statistics 4.0. Statistical Data Analysis for the IBM PC/XT/AT and PS/2. SPSS inc.
- OPS-OMS. 1994. Situación de los programas de malaria en las Americas. Informe XLII. XXIV Conferencia Sanitaria Panamericana. XLVI Reunión del Comité Regional. 116pp.
- PAHO. 1996. Malaria in the Americas. Epidemiological Bulletin. 17(4):1-11
- Schneider, S., Kueffer, J.M., Roessli, D. and Excoffier, L. 1996. Arlequin ver.1.1: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneve, Switzerland.
- Tabachnick, W.J. and W.C. Black IV. 1996. "Population Genetics in Vector Biology". Chapt 25 in: Beaty, B.J. and C.W. Marquardt, C.W.(editors). The Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado. USA. 632pp.
- Vilee, C., E. Solomon, C. Martin, D. Martin, L. Berg, and P. Davis. 1992. Biología. 2^a ed. Interamericana Mc Graw Hill. México. 1404pp.

IX. APENDICES

A. Datos obtenidos en el estudio para las tres secuencias microsátélites

Cuadro 33: Composición alélica de la población Champona 11/3/96

Individuo	1-90	2-14	6-41
1	160.17	206.54	187.82
	153.85	201.83	187.82
2	153.85	201.83	187.82
	151.39	201.83	187.82
3	162.11	201.83	185.48
	157.61	201.83	185.48
4	153.85	194.97	187.82
	170.83	194.97	187.82
5	164.09	204.96	187.82
	155.72	201.83	187.82
6	162.11	206.54	187.82
	151.39	206.54	187.82
7	170.83	212.18	187.82
	155.72	201.83	187.82
8	170.83	223.91	187.82
	157.61	212.18	185.48
9	151.39	204.96	189.4
	151.39	204.96	185.48
10	162.11	204.96	189.4
	155.72	212.18	183.94
11	164.09	204.96	189.4
	155.72	201.83	185.48
12	160.17	204.96	187.82
	151.39	201.83	185.48
13	162.11	201.83	189.4
	153.85	194.97	187.82
14	164.09	212.18	187.82
	151.39	201.83	187.82
15	157.61	204.96	187.82
	153.85	194.97	185.48
16	153.85	206.54	187.82
	153.85	206.54	187.82
17	157.61	215.47	189.4
	153.85	204.96	187.82
18	170.83	208.14	187.82
	166.75	204.96	183.94
19	162.11	208.14	187.82
	151.39	206.54	187.82
20	160.17	201.83	187.82
	151.39	201.83	187.82

21	162.11	212.18	187.82
	160.17	208.14	187.82
22	160.17	201.83	187.82
	153.85	201.83	185.48
23	170.83	212.18	187.82
	160.17	204.96	189.4
24	170.83	204.96	187.82
	170.83	206.54	189.4
25	170.83	204.96	189.4
	160.17	204.96	187.82
26	153.85	208.14	189.4
	153.85	206.54	187.82
27	170.83	213.82	187.82
	151.39	212.18	187.82
28	172.91	201.83	187.82
	155.72	201.83	185.48
29	155.72	206.54	187.82
	153.85	201.83	185.48
30	164.09	206.54	185.48
	157.61	206.54	185.48
31	178.57	212.18	187.82
	162.11	201.83	183.94
32	151.39	208.14	187.82
	151.39	208.14	185.48
33	155.72	212.18	187.82
	151.39	201.83	185.48
34	160.17	206.54	187.82
	155.72	204.96	185.48
35	162.11	223.91	185.48
	160.17	194.97	183.94
36	155.72	208.14	187.82
	155.72	201.83	187.82
37	166.75	201.83	185.48
	153.85	201.83	183.94

Cuadro 34: Composición alélica de la población Cuto 27/3/96

Individuo	1-90	2-14	6-41
1	169	227.86	185.48
	157.61	192.74	185.48
2	164.09	201.83	185.48
	157.61	194.97	189.4
3	162.11	227.86	185.48
	155.72	206.54	183.94
4	164.09	212.18	189.4
	153.23	212.18	185.48
5	169	204.96	189.4
	153.23	204.96	183.94

6	166.75	212.18	185.48
	157.61	200.29	185.48
7	164.09	206.54	185.48
	153.23	206.54	185.48
8	162.11	204.96	185.48
	157.61	200.29	189.4
9	155.72	206.54	185.48
	153.23	206.54	189.4
10	155.72	215.47	185.48
	157.61	200.29	185.48
11	164.09	204.96	185.48
	153.23	204.96	189.4
12	162.11	215.47	185.48
	157.61	200.29	189.4
13	174.3	200.29	190.19
	162.11	200.29	185.48
14	178.57	201.83	185.48
	164.09	201.83	189.4
15	169	200.29	185.48
	157.61	200.29	197.48
16	162.11	206.54	190.19
	155.72	204.96	189.4
17	157.61	212.18	189.4
	155.72	200.29	185.48
18	157.61	194.97	190.19
	153.23	194.97	185.48
19	155.72	212.18	190.19
	153.23	201.83	190.19
20	162.11	204.96	190.19
	162.11	201.83	190.19
21	151.39	206.54	185.48
	172.91	197.23	185.48
22	178.57	201.83	185.48
	172.91	201.83	185.48
23	155.72	194.97	192.59
	153.23	194.97	185.48
24	164.09	212.18	185.48
	153.23	204.96	185.48
25	166.75	200.29	185.48
	162.11	200.29	190.19
26	153.23	215.47	190.19
	151.39	206.54	183.94
27	162.11	212.18	185.48
	162.11	204.96	189.4
28	162.11	201.83	185.48
	153.23	201.83	185.48
29	162.11	200.29	185.48
	155.72	192.74	189.4

30	155.72	206.54	185.48
	151.39	206.54	185.48
31	157.61	204.96	190.19
	157.61	194.97	189.4
32	155.72	204.96	185.48
	153.23	200.29	190.19
33	153.23	200.29	185.48
	153.23	192.74	185.48
34	155.72	201.83	185.48
	153.23	201.83	190.19
35	162.11	212.18	185.48
	162.11	194.97	189.4
36	164.09	200.29	185.48
	157.61	189.07	189.4
37	162.11	200.29	197.48
	153.23	200.29	185.48
38	157.61	204.96	183.94
	155.72	200.29	182
39	157.61	212.18	192.59
	153.23	201.83	185.48
40	157.61	212.18	185.48
	157.61	189.07	183.94
41	164.09	206.54	185.48
	157.61	200.29	183.94
42	155.72	212.18	185.48
	153.23	200.29	185.48
43	157.61	200.29	190.19
	151.39	200.29	189.4
44	153.23	200.29	185.48
	153.23	200.29	185.48
45	155.72	204.96	185.48
	153.23	200.29	185.48
46	164.09	204.96	189.4
	157.61	204.96	185.48
47	162.11	212.18	189.4
	157.61	200.29	185.48
48	?	206.54	189.4
	?	206.54	189.4

Cuadro 35: Composición alélica de la población El Mango 28/2/96

Individuo	1-90	2-14	6-41
1	157.61	204.96	183.94
	153.23	200.29	183.94
2	166.75	200.29	190.19
	153.23	200.29	185.48
3	153.23	?	187.82
	153.23	?	182

4	157.61	221.66	187.82
	157.61	209.74	185.48
5	162.11	?	190.19
	153.23	?	185.48
6	157.61	206.54	203.34
	155.72	200.29	187.82
7	155.72	204.96	190.19
	155.72	204.96	183.94
8	170.83	?	187.82
	157.61	?	183.94
9	153.23	204.96	187.82
	153.23	204.96	187.82
10	166.75	206.54	190.19
	162.11	200.29	182
11	153.23	206.54	185.48
	153.23	192.74	185.48
12	166.75	206.54	187.82
	153.23	206.54	185.48
13	157.61	206.54	187.82
	153.23	206.54	185.48
14	157.61	?	183.94
	153.23	?	183.94
15	153.23	212.18	185.48
	151.39	201.83	185.48
16	155.72	212.18	185.48
	153.23	192.74	185.48
17	155.72	201.83	187.82
	157.61	201.83	187.82
18	157.61	?	187.82
	155.72	?	185.48
19	153.23	204.96	190.19
	151.39	192.74	187.82
20	153.23	204.96	185.48
	153.23	200.29	183.94
21	166.75	?	185.48
	166.75	?	183.94
22	166.75	206.54	185.48
	162.11	206.54	185.48
23	164.09	?	187.82
	153.23	?	183.94
24	164.09	?	187.82
	155.72	?	185.48
30	153.23	206.54	185.48
	153.23	206.54	185.48
31	157.61	192.74	190.19
	153.23	192.74	183.94
32	157.61	206.54	187.82
	155.72	206.54	183.94

33	164.09	?	187.82
	162.11	?	187.82
34	157.61	212.18	190.19
	155.72	201.83	187.82
35	155.72	?	187.82
	155.72	?	185.48
36	169	206.54	187.82
	155.72	200.29	183.94
37	153.23	?	190.19
	151.39	?	183.94

Cuadro 36: Composición alélica de la población El Motor 20/2/96

Individuo	1-90	2-14	6-41
1	174.3	220	192.59
	155.72	201.83	185.48
2	151.39	204.93	185.48
	153.85	204.93	185.48
3	155.72	223.91	187.82
	153.85	201.83	187.82
4	162.11	208.14	189.4
	162.11	208.14	187.82
5	162.11	201.83	187.82
	162.11	201.83	185.48
6	153.85	201.83	187.82
	153.85	201.83	185.48
7	166.75	201.83	187.82
	166.75	209.74	185.48
8	153.85	201.83	187.82
	153.85	192.74	185.48
9	153.85	192.74	187.82
	153.85	204.93	185.48
10	157.61	213.82	185.48
	155.72	201.83	185.48
11	157.61	208.14	187.82
	153.85	208.14	183.94
12	174.3	206.54	187.82
	160.17	209.74	185.48
13	160.17	201.83	187.82
	155.72	209.74	185.48
14	162.11	201.83	187.82
	153.85	192.74	185.48
15	164.09	223.91	187.82
	157.61	208.14	185.48
16	166.75	208.14	189.4
	151.39	201.83	185.48
17	162.11	201.83	185.48
	155.72	192.74	185.48

18	162.11	201.83	187.82
	174.3	227.86	185.48
19	155.72	204.93	187.82
	153.85	192.74	185.48
20	155.72	223.91	189.4
	151.39	201.83	189.4
21	162.11	208.14	187.82
	162.11	201.83	185.48
22	170.83	209.74	195.02
	151.39	192.74	189.4
23	174.3	204.93	185.48
	155.72	204.93	185.48
24	174.3	206.54	187.82
	174.3	204.93	187.82
25	160.17	192.74	187.82
	153.85	189.07	185.48
26	162.11	206.54	187.82
	153.85	201.83	187.82
27	153.85	201.83	185.48
	153.85	201.83	185.48
28	157.61	208.14	187.82
	153.85	206.54	187.82
29	157.61	204.93	203.34
	155.72	204.93	185.48
30	160.17	201.83	185.48
	153.85	201.83	185.48
31	153.85	208.14	185.48
	151.39	208.14	185.48
32	160.17	209.74	187.82
	157.61	192.74	185.48
33	157.61	209.74	187.82
	155.72	201.83	185.48
34	170.83	192.74	189.4
	155.72	209.74	183.94
35	155.72	206.54	210.95
	153.85	223.91	183.94
36	162.11	208.14	189.4
	155.72	208.14	189.4
37	153.85	204.93	185.48
	162.11	204.93	183.94
38	153.85	204.93	187.82
	155.72	201.83	185.48
39	153.85	208.14	187.82
	157.61	201.83	185.48
40	164.09	206.54	185.48
	170.83	206.54	185.48
41	170.83	206.54	187.82
	157.61	206.54	185.48

42	153.85	?	192.59
	160.17	?	185.48
43	153.85	206.54	192.59
	160.17	204.93	185.48
44	153.85	204.93	192.59
	151.39	204.93	185.48
45	155.72	204.96	187.82
	155.72	204.96	183.94
46	155.72	204.96	185.48
	162.11	204.96	183.94
47	157.61	212.18	187.82
	164.09	212.18	187.82
48	155.72	204.96	185.48
	153.85	192.74	183.94

Cuadro 37: Composición alélica de la población Lauro 27/3/96

Individuo	1-90	2-14	6-41
1	160.17	208.14	187.82
	153.23	201.83	185.48
2	162.11	201.83	187.82
	151.39	201.83	185.48
3	164.09	206.54	185.48
	157.61	192.74	185.48
4	178.57	206.54	197.48
	153.23	189.07	185.48
5	170.83	206.54	187.82
	151.39	208.14	185.48
6	153.23	197.23	187.82
	153.23	201.83	185.48
7	153.23	204.96	187.82
	162.11	201.83	185.48
8	170.83	?	190.19
	164.09	?	187.82
9	170.83	206.54	190.19
	151.39	204.96	187.82
10	157.61	201.83	187.82
	157.61	200.29	187.82
11	153.23	201.83	187.82
	153.23	201.83	187.82
12	151.39	200.29	187.82
	157.61	197.23	185.48
13	151.39	236.26	187.82
	164.09	189.07	185.48
14	157.61	217.13	190.19
	162.11	206.54	190.19

Cuadro 38: Composición alélica de la población Lauro 7/6/95

Individuo	1-90	2-14	6-41
6	155.72	200.29	187.82
	155.72	200.29	185.48
7	170.83	201.83	187.82
	162.11	209.74	185.48
8	153.23	208.14	185.48
	155.72	201.83	185.48
9	153.23	201.83	192.5
	153.23	201.83	185.48
10	166.75	201.83	190.19
	157.61	201.83	190.19
11	160.17	201.83	203.34
	153.23	200.29	187.82
12	180.74	215.47	190.19
	157.61	201.83	185.48
13	162.11	200.29	187.82
	155.72	192.74	185.48
14	162.11	208.14	187.82
	155.72	204.96	185.48
15	157.61	194.97	185.48
	153.23	194.97	185.48
16	164.09	204.96	185.48
	153.23	204.96	182
17	153.23	200.29	187.82
	153.23	192.74	185.48
18	174.3	200.29	185.48
	153.23	197.23	185.48

Cuadro 39: Composición alélica de la población Nahua 13/3/96

Individuo	1-90	2-14	6-41
1	166.75	201.83	185.48
	157.61	201.83	185.48
2	162.11	204.96	185.48
	157.61	194.97	185.48
3	155.72	206.54	183.94
	155.72	206.54	183.94
4	166.75	206.54	187.82
	155.72	206.54	187.82
5	166.75	212.18	187.82
	155.72	201.83	187.82
6	160.17	208.14	187.82
	153.85	201.83	183.94
7	178.57	201.83	189.4
	155.72	201.83	187.82
8	162.11	215.47	185.48

	155.72	215.47	185.48
9	160.17	206.54	189.4
	160.17	206.54	185.48
10	155.72	208.14	182
	162.11	208.14	182
11	170.83	201.83	185.48
	155.72	201.83	185.48
12	166.75	201.83	185.48
	162.11	201.83	185.48
13	153.85	206.54	189.4
	153.85	201.83	185.48
14	162.11	201.83	203.34
	157.61	201.83	189.4
15	170.83	201.83	187.82
	155.72	201.83	187.82
16	155.72	204.96	187.82
	155.72	204.96	187.82
17	170.83	215.47	187.82
	157.61	194.97	185.48
18	155.72	217.13	189.4
	155.72	204.96	185.48
19	155.72	208.14	187.82
	166.75	208.14	185.48
20	162.11	212.18	185.48
	162.11	204.96	185.48
21	155.72	215.47	189.4
	155.72	204.96	189.4
22	170.83	208.14	185.48
	155.72	201.83	185.48
23	162.11	204.96	187.82
	155.72	204.96	187.82
24	162.11	206.54	187.82
	162.11	206.54	185.48

Cuadro 40: Composición alélica de la población Puente Blanco 21/2/96

Individuo	1-90	2-14	6-41
1	160.17	200.29	185.48
	155.72	200.29	185.48
2	162.11	212.18	185.48
	160.17	200.29	183.94
3	160.17	221.66	185.48
	155.72	206.54	183.94
4	157.61	200.29	187.82
	153.23	200.29	183.94
5	177.13	204.96	187.82
	155.72	200.29	187.82
6	153.23	200.29	187.82

	153.23	200.29	185.48
7	155.72	215.47	185.48
	142.51	204.96	185.48
8	166.75	204.96	187.82
	153.23	204.96	185.48
9	166.75	221.66	185.48
	153.23	200.29	183.94
10	166.75	206.54	187.82
	151.39	200.29	185.48
11	155.72	204.96	185.48
	153.23	200.29	185.48
12	170.83	212.18	185.48
	151.39	204.96	185.48
13	153.23	200.29	185.48
	153.23	200.29	185.48
14	157.61	204.96	185.48
	157.61	200.29	185.48
15	166.75	204.96	187.82
	148.97	194.97	183.94
16	153.23	223.91	185.48
	142.51	200.29	185.48
17	153.23	200.29	187.82
	153.23	200.29	185.48
18	162.11	223.91	185.48
	160.17	206.54	185.48
19	166.75	223.91	187.82
	162.11	206.54	185.48
20	155.72	200.29	189.4
	155.72	194.97	187.82
21	155.72	215.47	187.82
	153.23	200.29	185.48
22	155.72	200.29	195.48
	155.72	200.29	185.48
23	160.17	212.18	189.4
	157.61	206.54	185.48
24	166.75	200.29	187.82
	153.23	192.74	185.48
25	160.17	217.13	187.82
	160.17	206.54	185.48
26	155.72	206.54	185.48
	155.72	200.29	185.48
27	166.75	204.96	189.4
	155.72	200.29	185.48
28	160.17	200.29	187.82
	155.72	200.29	185.48
29	174.3	200.29	185.48
	153.23	200.29	185.48
30	170.83	204.96	189.4

	160.17	192.74	189.4
31	160.17	215.47	187.82
	155.72	206.54	185.48
32	166.75	200.29	185.48
	155.72	200.29	185.48
33	155.72	200.29	185.48
	155.72	200.29	185.48
34	160.17	206.54	187.82
	155.72	192.74	187.82
35	155.72	212.18	187.82
	155.72	204.96	185.48
36	157.61	200.29	187.82
	155.72	189.07	185.48
37	170.83	204.96	189.4
	157.61	189.07	189.4
38	162.11	200.29	185.48
	160.17	189.07	185.48
39	166.75	200.29	187.82
	157.61	192.74	185.48
40	155.72	212.18	187.82
	153.23	206.54	185.48
41	155.72	206.54	187.82
	155.72	189.07	185.48
42	155.72	204.96	187.82
	155.72	200.29	185.48
43	177.13	200.29	187.82
	155.72	200.29	185.48
44	155.72	215.47	187.82
	153.23	206.54	185.48
45	170.83	201.83	185.48
	155.72	201.83	185.48
46	170.83	223.91	187.82
	151.39	201.83	185.48
47	162.11	200.29	187.82
	153.23	200.29	183.94
48	157.61	206.54	185.48
	151.39	201.83	185.48

Cuadro 41: Composición alélica de la población Ruperto 4/10/95

Individuo	1-90	2-14	6-41
1	160.17	206.54	185.48
	160.17	206.54	182
2	151.39	208.14	187.82
	151.39	208.14	185.48
3	155.72	201.83	190.19
	153.23	189.07	187.82
4	164.09	201.83	187.82

	162.11	192.74	185.48
5	164.09	201.83	185.48
	153.23	197.23	185.48
6	153.23	201.83	192.59
	157.61	201.83	185.48
7	155.72	206.54	187.82
	155.72	206.54	185.48
8	157.61	201.83	187.82
	160.17	201.83	185.48
9	164.09	?	190.19
	166.75	?	187.82
10	153.23	201.83	185.48
	153.23	201.83	185.48
11	153.23	206.54	185.48
	157.61	192.74	185.48
12	160.17	206.54	185.48
	164.09	201.83	185.48
13	164.09	206.54	185.48
	153.23	201.83	187.82
14	153.23	201.83	187.82
	153.23	201.83	190.19
15	160.17	206.54	187.82
	148.97	201.83	185.48
16	148.97	201.83	187.82
	153.23	192.74	190.19
17	164.09	213.82	182
	155.72	213.82	185.48
18	153.23	213.82	185.48
	164.09	206.54	185.48
19	164.09	201.83	185.48
	157.61	201.83	185.48
20	153.23	213.82	185.48
	153.23	213.82	187.82
21	160.17	206.54	185.48
	164.09	201.83	187.82
22	153.23	?	187.82
	153.23	?	187.82
23	164.09	206.54	187.82
	153.23	206.54	187.82
24	166.75	220	187.82
	162.11	220	187.82
25	153.23	201.83	185.48
	162.11	201.83	185.48
26	153.23	206.54	190.19
	162.11	206.54	185.48
27	153.23	201.83	187.82
	155.72	201.83	187.82
28	155.72	225.64	182

	157.61	208.14	185.48
29	153.23	201.83	187.82
	157.61	201.83	190.19
30	160.17	201.83	185.48
	153.23	201.83	187.82
31	153.23	?	187.82
	155.72	?	187.82
32	160.17	206.54	187.82
	151.39	206.54	185.48
33	153.23	201.83	187.82
	164.09	201.83	185.48
34	153.23	201.83	187.82
	164.09	201.83	185.48
35	172.91	208.14	190.19
	160.17	208.14	187.82
36	153.23	204.96	185.48
	157.61	201.83	185.48
37	153.23	204.96	187.82
	160.17	201.83	187.82
38	153.23	201.83	187.82
	160.17	201.83	182
39	153.23	208.14	187.82
	160.17	201.83	185.48
40	153.23	201.83	187.82
	157.61	201.83	182
41	153.23	213.82	187.82
	151.39	192.74	185.48
42	153.23	201.83	187.82
	162.11	201.83	182
43	153.23	201.83	187.82
	153.23	201.83	185.48
44	157.61	201.83	185.48
	160.17	192.74	182
45	166.75	201.83	182
	160.17	201.83	187.82
46	155.72	223.91	182
	155.72	204.96	187.82
47	157.61	201.83	182
	153.23	201.83	185.48
48	151.39	213.82	182
	151.39	201.83	190.19

Cuadro 42: Composición alélica de la población Ruperto 27/3/96

Individuo	1-90	2-14	6-41
1	162.11	217.13	203.34
	155.72	201.83	187.82
2	166.75	209.74	185.48
	155.72	201.83	182
3	153.23	204.96	185.48
	148.97	204.96	185.48
4	157.61	209.74	185.48
	153.23	209.74	182
5	164.09	194.97	192.59
	155.72	194.97	185.48
6	166.75	201.83	187.82
	160.17	201.83	185.48
7	160.17	209.74	187.82
	153.23	204.96	187.82
8	153.23	204.96	192.59
	142.51	204.96	187.82
9	166.75	204.96	185.48
	153.23	200.29	182
10	153.23	204.96	185.48
	148.97	204.96	185.48
11	164.09	209.74	187.82
	153.23	209.74	187.82
12	155.72	204.96	187.82
	153.23	204.96	185.48
13	166.75	204.96	185.48
	153.23	201.83	185.48
14	172.91	223.91	185.48
	153.23	209.74	182
15	155.72	204.96	190.19
	148.97	204.96	185.48
16	164.09	204.96	192.59
	153.23	192.74	185.48

Cuadro 43: Composición alélica de la población San Luis Peten, 12/3/96

Individuo	1-90	2-14	6-41
1	153.23	201.83	187.82
	151.39	201.83	185.48
2	153.23	204.96	187.82
	153.23	204.96	185.48
3	153.23	204.96	185.48
	157.61	192.74	183.94
4	162.11	201.83	185.48
	153.23	201.83	187.82
5	157.61	206.54	185.48

	160.17	201.83	185.48
6	162.11	213.82	187.82
	162.11	201.83	187.82
7	160.17	204.96	187.82
	153.23	201.83	187.82
8	164.09	192.74	187.82
	162.11	192.74	189.4
9	164.09	201.83	189.4
	162.11	201.83	187.82
10	162.11	204.96	187.82
	151.39	204.96	185.48
11	153.23	201.83	187.82
	153.23	201.83	185.48
12	169	201.83	187.82
	169	201.83	183.94
13	151.39	208.14	187.82
	151.39	201.83	187.82
14	160.17	208.14	187.82
	160.17	208.14	187.82
15	157.61	201.83	187.82
	153.23	201.83	189.4
16	157.61	?	187.82
	157.61	?	185.48
17	151.39	201.83	187.82
	151.39	197.23	185.48
18	162.11	201.83	187.82
	155.72	201.83	185.48
19	164.09	213.82	187.82
	153.23	201.83	185.48
20	164.09	225.64	189.4
	162.11	204.96	187.82
21	155.72	208.14	187.82
	153.23	204.96	187.82
22	157.61	206.54	187.82
	157.61	206.54	185.48
23	170.83	208.14	189.4
	153.23	201.83	187.82
24	162.11	201.83	187.82
	160.17	201.83	185.48
25	162.11	201.83	185.48
	157.61	204.96	185.48
26	160.17	201.83	185.48
	153.23	213.82	185.48
27	160.17	213.82	187.82
	153.23	197.23	187.82
28	162.11	201.83	187.82
	153.23	204.96	185.48
29	153.23	201.83	187.82

	153.23	208.14	183.94
30	164.09	201.83	187.82
	162.11	215.47	185.48
31	170.83	201.83	208.57
	170.83	213.82	185.48

Cuadro 44: Composición alélica de la población San Luis Buenaventura 12/3/96

Individuo	1-90	2-14	6-41
1	155.72	200.29	187.82
	153.23	200.29	187.82
2	162.11	208.14	185.48
	155.72	201.83	185.48
3	164.09	200.29	189.4
	155.72	197.23	183.94
4	174.3	200.29	187.82
	170.83	200.29	185.48
5	155.72	200.29	187.82
	155.72	201.83	185.48
6	162.11	208.14	187.82
	153.23	208.14	185.48
7	162.11	201.83	185.48
	153.23	200.29	185.48
8	170.83	209.74	187.82
	164.09	201.83	185.48
9	155.72	201.83	187.82
	151.39	201.83	187.82
10	160.17	201.83	187.82
	151.39	201.83	185.48
11	157.61	201.83	187.82
	148.97	201.83	185.48
12	162.11	201.83	187.82
	162.11	201.83	185.48
13	174.3	213.82	189.4
	155.72	213.82	187.82
14	174.3	220	187.82
	157.61	209.74	185.48
15	155.72	208.14	187.82
	153.23	208.14	185.48
16	162.11	206.54	187.82
	157.61	197.23	185.48
17	170.83	208.14	189.4
	160.17	208.14	187.82
18	160.17	201.83	187.82
	155.72	201.83	185.48
19	178.57	201.83	187.82
	170.83	201.83	185.48
20	155.72	208.14	187.82

	151.39	201.83	185.48
21	178.57	213.82	187.82
	164.09	201.83	185.48
22	153.23	208.14	187.82
	153.23	201.83	185.48
23	170.83	201.83	187.82
	164.09	201.83	187.82

Cuadro 45: Composición alélica de la población Tallado 7/2/95

Individuo	1-90	2-14	6-41
1	157.61	201.83	189.4
	153.23	189.07	185.48
2	166.75	200.29	189.4
	153.23	189.07	189.4
3	155.72	206.54	185.48
	151.39	206.54	185.48
4	157.61	201.83	185.48
	153.23	201.83	185.48
5	174.3	201.83	190.19
	155.72	201.83	183.94
6	153.23	?	185.48
	153.23	?	183.94
7	155.72	?	185.48
	151.39	?	183.94
8	153.23	206.54	185.48
	153.23	206.54	185.48
9	169	?	185.48
	157.61	?	185.48
10	172.91	208.14	189.4
	153.23	206.54	189.4
11	153.23	?	189.4
	153.23	?	189.4
12	157.61	?	185.48
	153.23	?	185.48
13	157.61	?	190.19
	151.39	?	185.48
14	178.57	192.74	189.4
	153.23	192.74	183.94
15	157.61	?	185.48
	153.23	?	185.48
16	153.23	201.83	189.4
	153.23	201.83	185.48
17	164.09	?	185.48
	153.23	?	185.48
18	155.72	189.07	189.4
	153.23	189.07	185.48
19	157.61	206.54	190.19

	153.23	206.54	189.4
20	148.97	200.29	190.19
	142.51	200.29	185.48
21	157.61	206.54	190.19
	157.61	206.54	189.4
22	169	208.14	190.19
	157.61	201.83	185.48
23	162.11	204.96	189.4
	157.61	204.96	185.48
24	164.09	?	185.48
	155.72	?	185.48
25	162.11	194.97	189.4
	157.61	194.97	185.48
26	162.11	201.83	190.19
	151.39	201.83	185.48
27	157.61	201.83	189.4
	153.23	201.83	185.48
28	164.09	204.96	185.48
	157.61	204.96	185.48
29	162.11	204.96	190.19
	162.11	189.07	190.19
30	155.72	?	203.34
	153.23	?	185.48
31	153.23	201.83	185.48
	153.23	189.07	185.48
32	164.09	206.54	189.4
	153.23	201.83	185.48
33	178.57	?	192.59
	169	?	189.4
34	166.75	?	185.48
	153.23	?	185.48
35	157.61	204.96	185.48
	151.39	204.96	185.48
36	155.72	201.83	190.19
	155.72	201.83	185.48
39	166.75	?	189.4
	157.61	?	185.48
40	162.11	?	189.4
	153.23	?	185.48
41	157.61	?	185.48
	157.61	?	185.48
42	162.11	200.29	190.19
	153.23	200.29	185.48

B. Análisis estadístico

Cuadro 46: Análisis de varianza AMOVA, microsatélite 1-90

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	2	9.450	0.01221 Va	2.73
Entre poblaciones dentro de los grupos	10	12.878	0.01414 Vb	3.16
Dentro de las poblaciones	829	349.525	0.42162 Vc	94.12
Total	841	371.854	0.44798	

Cuadro 47: Análisis de varianza AMOVA, microsatélite 2-14

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	2	6.695	0.00172 Va	0.40
Entre poblaciones dentro de los grupos	10	22.885	0.03376 Vb	7.77
Dentro de las poblaciones	767	306.183	0.3920 Vc	91.84
Total	779	335.763	0.43468	

Cuadro 48: Análisis de varianza AMOVA, microsatélite 6-41

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	2	9.696	0.01133 Va	3.17
Entre poblaciones dentro de los grupos	10	15.449	0.01985 Vb	5.55
Dentro de las poblaciones	831	271.106	0.32624 Vc	91.27
Total	843	296.251	0.35743	

Cuadro 49: Índices de fijación F de Wright, microsatélite 1-90

Fsc	0.03246
Fst	0.05883
Fct	0.02725

Cuadro 50: Índices de fijación F de Wright, microsatélite 2-14

Fsc	0.07798
Fst	0.08163
Fct	0.00396

Cuadro 51: Índices de fijación F de Wright, microsatélite 6-41

Fsc	0.05737
Fst	0.08726
Fct	0.03171

C. Secuencias de los microsatélites

1. Secuencia del microsatélite 1-90

1 **70**

5' -

GATCTGGGTGCACCCACCCCGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTTCGGCCATCACCATGCGCCACCAT
 TTTGGTTTTTGGGCAAATGGCAGCTTGGCTCTGGTGTGCTGGCCGAGATTTATCACAAATCAGCACCAT
 CAACACATCCCGTGCCTGTTCCGGGCGACGGTCCGATGAGGAATCTTCTTTAATCCGATTCCG
 AGTCACTCATCCAAAACCCCTTCCCGGTCCCTTGGACAACACACCCGCACGGCAGAAGCATAAATAAATTA
GCATAAATAATAGCCGAACATATTAATGCCTTTTGGCGCTCTCTGTCTCTGCCTTT**TCTCTCTCTCTCTC**
TCTCTCTCTCTCTCTGTGTCCTTTGGTCATAAAAGGGTCCGTTACGTGTACTACGTCTCTGGATGTGCGTA
 TTTGTAGTCGGAAGTGTGACTGCCGATGGCCATTTTCATTGATATTAATGCACCATAATCATCCGGATAG
 TCGCCCTCGTGTACTCGAGGATC-3'

- La secuencia de los iniciadores se encuentra subrayada.
- La secuencia repetitiva se encuentra en negrita, consiste en 16 repeticiones de las bases TC.
- El tamaño de la secuencia amplificada es de 120 bases que junto a las 40 bases de los iniciadores suma 160 bases en total.

2. Secuencia del microsatélite 2-14

1 **70**

5'-
GATCGCCGTTGCCAAGATAAAATGGAAATCGAACCCTACGCTGGCTCGCTCCTTAGCGCCCGGG**TCTCTC**
TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCCGGCGCGGCCGCGGTGACGGGTGGTGAAGGTGTTCGGTAAGACGCGC
 GAACGGCGAACCATTCGGTTCGGTGC GCGAGTTGGACGGTGT TTTAGGATTATTTGAATTAGATTTGATT
 TGATTTAATTCGCTCACCCAGCAATTTAGCCCCCCCCGCCATGGGCATGCGGGGTTTACGGAGGTCTCAA
 CCCACCTGGCCCGGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGGCGGGGAATGTTTGATTGATTCCAGCGGCAGC
 GCGATAGAGCGCGCACGCCAGCCCATGGGCCAGGCCACGCAGTGAGCACAAACAATGAGCGCATAAGCGCG
 GTGGCACGCACGGTGGCACCAGACAGATGCTGTGCACAGTACCCAGCCTGCAGCAACAGCTTCTTGGCTT
 CACTCGGTTGCCACGAGTGCCTGGAAAAGGCCCCCCGATCG-3'

- La secuencia de los iniciadores se encuentra subrayada.
- La secuencia repetitiva se encuentra en negrita, consiste en 14 repeticiones de las bases TC.
- El tamaño de la secuencia amplificada es de 145 bases que junto a las 48 bases de los iniciadores suma 193 bases en total.

3. Secuencia del microsatélite 6-41

1 **70**

5'-
GATCGCGGGCACCTCCACCGCCCAGCAAACGGGAATTTAATCAACGGCATCCATCCTTTCTCTGTGGT
 GAGCAAGGGTAGAAGGGGTTGAGGAGGAGGTGGA**ACAGACACACACAGACACACACACACACAG**AGCCCG
 CCCGAAACACGGGGGCCACACCGTTAGGGCAAACGCACCTGATTCTCAGAGGCA GTTGATGCGCCGT
TATGACAAGGCGCGAGGTCGGCATAAC-3'

- La secuencia de los iniciadores se encuentra subrayada.
- La secuencia repetitiva se encuentra en negrita, consiste en 15 repeticiones de las bases AC.
- El tamaño de la secuencia amplificada es de 144 bases que junto a las 40 bases de los iniciadores suma 184 bases en total.

D. Distancia geográfica entre la localidad de las poblaciones estudiadas

Cuadro 52: Distancia en Km entre parejas de las localidades de las poblaciones estudiadas

Distancia entre	Km
Champona y Nahua	55.35
Champona y San Luis Petén Buenaventura	118.77
Champona y San Luis Petén	115.5
Champona y Cuto	357.71
Champona y Lauro	287.83
Champona y Mango	344.50
Champona y Ruperto	289.28
Champona y Tallado	351.75

Champona y El Motor	182.14
Champona y Puente Blanco	132.27
Nahua y San Luis Peten Buenaventura	108.3
Nahua y San Luis Petén	104.36
Nahua y Cuto	305.92
Nahua y Lauro	231.95
Nahua y Mango	290.36
Nahua y Ruperto	233.62
Nahua y Tallado	302.15
Nahua y El Motor	133.35
Nahua y Puente Blanco	77.63
San Luis Petén Buenaventura y San Luis Peten	3.79
San Luis Petén Buenaventura y Cuto	329.7
San Luis Petén Buenaventura y Lauro	272.84
San Luis Petén Buenaventura y Mango	324.34
San Luis Petén Buenaventura y Ruperto	276.87
San Luis Petén Buenaventura y Tallado	328.24
San Luis Petén Buenaventura y El Motor	213.38
San Luis Petén Buenaventura y Puente Blanco	158.85
San Luis Peten y Cuto	327.71
San Luis Peten y Lauro	264.77
San Luis Peten y Mango	317.31
San Luis Peten y Ruperto	267.44
San Luis Peten y Tallado	324.71
San Luis Peten y El Motor	209.09
San Luis Peten y Puente Blanco	155.55
Cuto y Lauro	73.87
Cuto y Mango	24.82
Cuto y Ruperto	75.3
Cuto y Tallado	0.64
Cuto y El Motor	199.34
Cuto y Puente Blanco	231.63
Lauro y Mango	58.25
Lauro y Ruperto	3.5
Lauro y Tallado	75.24
Lauro y El Motor	123.65
Lauro y Puente Blanco	157.02
Mango y Ruperto	56.42
Mango y Tallado	24.23
Mango y El Motor	178.43
Mango y Puente Blanco	215.34
Ruperto y Tallado	74.75
Ruperto y El Motor	123.33
Ruperto y Puente Blanco	158.60
Tallado y El Motor	190.85
Tallado y Puente Blanco	230.5
El Motor y Puente Blanco	58.11