

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Selección de secuencias microsatélites. Como se mencionó anteriormente, los siete loci denominados NP94F, NP106F, NP113F, NP76consA, NP128F, NP81R y NP38F ya habían sido descritos como polimórficos para cepas de laboratorio (comunicación personal con Andrew Hammond, CDC, 2000) pero no se habían evaluado en poblaciones naturales. Por otro lado las secuencias microsatélites denominadas Aa6-41, Aa2-25, Aa2-14 y Aa1-90 se habían evaluado utilizando la metodología de geles de secuenciación de poliacrilamida en poblaciones de Latinoamérica y no a nivel microregional. En este estudio las muestras examinadas se procesaron en un equipo de electroforesis capilar 3100 (ABI, CA) para comparar los resultados obtenidos utilizando geles de secuenciación de poliacrilamida con los obtenidos con esta metodología.

B. Extracción de ADN. De acuerdo con los resultados observados, se recomienda extraer el ADN de mosquitos mediante una modificación del método de Collins *et al.*, 1987 y el Kit comercial IsoQuick. En este estudio, 142 muestras fueron extraídas con el Kit comercial IsoQuick y 90 fueron extraídas con fenol / cloroformo. No se obtuvo producto de PCR, es decir, no se observaron picos en los electroferogramas de un alto porcentaje de muestras de ADN que habían sido extraídas con fenol / cloroformo mediante una modificación del método de Collins *et al.*, 1987, (Cuadro 8). Si bien es cierto que ambos métodos de extracción son buenos, la no amplificación de las muestras se debe a que en el método de fenol / cloroformo hay que tener precauciones porque en este estudio se perdió ADN, ya que en el paso de precipitación de ADN, sólo se utilizó etanol al 100% (v/v). Se sugiere que en este paso también se utilice una sal, como acetato de sodio, para que cuando se lave el ADN precipitado con etanol al 70% (v/v) se evite perder ADN con el 30% de agua que contiene la solución de etanol 70%. Es importante eliminar los residuos de etanol en la muestra, el cual inhibe la *Taq* polimerasa durante la reacción de PCR y pudo haber sido otra posible causa del fallo de la amplificación por PCR de estas muestras.

Locus	% amplificado, a partir de un total de 142 muestras, extraídas con el Kit comercial IsoQuick*	% amplificado, a partir de un total de 90 muestras, extraídas con fenol/cloroformo*
NP76consA	55%	12%
NP113F	70%	42%
NP38F	65%	38%

NP94F	38%	15%
Locus	% amplificado, a partir de un total de 142 muestras, extraídas con el Kit comercial IsoQuick*	% amplificado, a partir de un total de 90 muestras, extraídas con fenol/cloroformo*
NP81R	36%	29%
NP106F	5%	1%
NP128F	26%	13%
Aa6-41	1%	1%
Aa2-25	63%	45%
Aa2-14	0%	0%
Aa1-90	73%	21%
Promedio	40%	20%

* modificación del método de extracción de Collins et al., 1987

Cuadro 8. Porcentaje de muestras de *Anopheles albimanus* con amplificación positiva por PCR, de acuerdo al método de extracción (1) Isoquick y (2) fenol/cloroformo, a partir de un total de 232 diferentes mosquitos, colectados en diferentes fechas y preservados a -80°C

c. Amplificación de ADN.

1. Optimización de la técnica de PCR para la amplificación. Como resultado de las pruebas de estandarización de la reacción de PCR, se determinó la temperatura de hibridación para cada pareja de iniciadores, descritas en el (Cuadro 9). Para establecer la temperatura de hibridación de cada pareja de iniciadores, se realizó una reacción de PCR con gradiente de temperatura. El producto se corrió en un gel de poliacrilamida al 10%, y se observó con que temperatura aparecía una banda. Se volvió a repetir la reacción con la temperatura escogida, y al volver a observar una banda en el gel de poliacrilamida al 10% se escogió esta temperatura de hibridación como la adecuada.

Nombre del locus	Temperatura de hibridación
NP94F	54 °C
NP106F	54 °C
NP113F	54 °C
NP76consA	54 °C
NP128F	54 °C

NP81R	54 °C
Nombre del locus	Temperatura de hibridación
NP38F	54 °C
Aa6-41	47 °C
Aa2-25	47 °C
Aa2-14	46 °C
Aa1-90	46 °C

Cuadro 9. Temperatura de hibridación estandarizada para cada locus analizado.

a. Detección del producto amplificado durante la optimización de la técnica de PCR. Como producto de la amplificación de las secuencias microsatélites por PCR se obtuvo diferentes patrones de migración electroforética para cada locus. En la Figura 17, se muestran los diferentes patrones de bandas, producto de la amplificación de una sola muestra de ADN de *Anopheles albimanus*, utilizando los 11 pares de iniciadores.

En el gel de poliacrilamida de la Figura 17 se observa una banda café oscuro en cada pozo. Esta banda oscura bien definida en la mayoría de casos, excepto para los loci NP81R y Aa2-25, representa el fragmento de ADN microsatélite amplificado lo cual nos indica que la reacción de PCR es la adecuada. En los loci NP76consA, NP81R, NP38F, Aa2-14 y Aa1-90 se observan dos bandas bien definidas lo cual nos puede estar indicando que el individuo es heterocigoto. En algunos loci la banda oscura se observa más gruesa, por ejemplo con el locus NP128F, esto puede indicarnos que había exceso de ADN en la reacción de PCR. En los loci NP81R y Aa2-25 se observa un barrido y no una banda bien definida, lo cual nos indica que hubo deslizamiento de la *Taq polimerasa* y se obtuvieron bandas no específicas o no esperadas que se conocen como *stutter bands*.

E. Análisis de fragmentos pequeños de ADN por electroforesis capilar. Para maximizar el proceso de lectura del secuenciador se estableció la concentración óptima de producto de PCR dado que si la misma es elevada el aparato tiene problemas para leer. Por el contrario, si esta concentración es baja se incrementa la razón señal ruido lo que hace difícil distinguir entre los alelos reales y los picos no esperados. Las unidades de fluorescencia deben mantenerse entre 150 a 4000 uF para obtener resultados óptimos (Guía química GeneScan). Para este análisis se determinaron como diluciones óptimas la de 1:10 para los productos de PCR de muestras extraídas mediante una modificación del método de Collins *et al.*, 1987 y el Kit comercial IsoQuick (Orca Research, WA), y producto sin diluir para las muestras extraídas con fenol / cloroformo, mediante una modificación del método de Collins *et al.*, 1987.

Esta diferencia en cuanto a la dilución óptima se debe a que se contaba con menor concentración de ADN en las muestras extraídas con fenol / cloroformo. Para confirmar la amplificación de ADN y calcular su concentración se puede utilizar fluorimetría, espectrofotometría, correr los productos de PCR en una gel de agarosa o realizar un Dot Blott previo a analizar las muestras por electroforesis capilar.

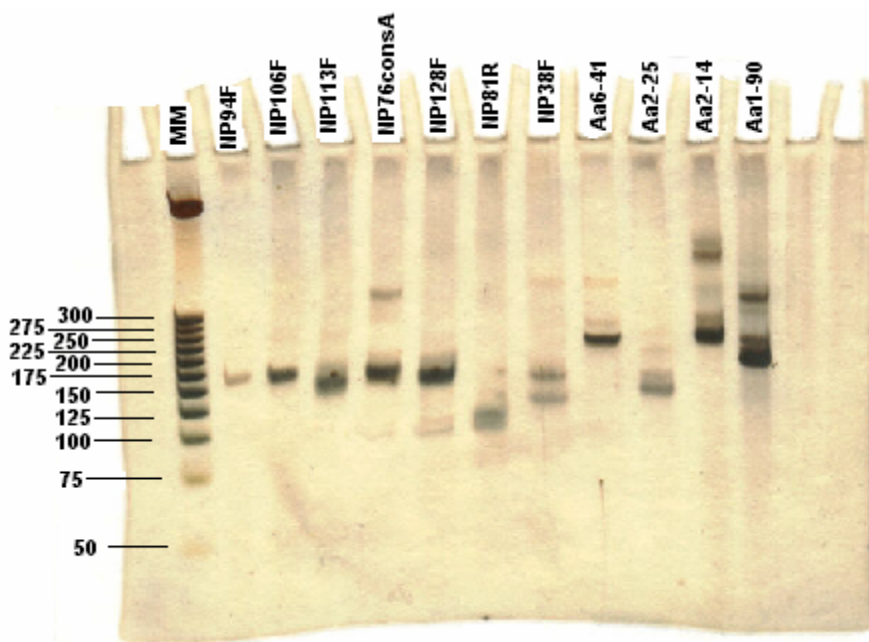


Figura 17. Gel de poliacrilamida de los productos de PCR, para cada pareja de iniciadores. Gel de poliacrilamida al 10% de productos de PCR de *Anopheles albimanus* (cepa Semillero, insectaribo Universidad del Valle) amplificada con cada pareja de iniciadores. MM representa el marcador de masa molecular de 25 pb (Promega), y en cada carril se indica el nombre del microsatélite amplificado.

Un aspecto a considerar es que el haber utilizado simultáneamente dos productos de PCR en el mismo pozo mejoró el rendimiento, pero también incrementó la concentración de sales en las muestras. Lo anterior contribuyó a la inhibición de la desnaturalización de la doble hebra de ADN por lo que se detectó menor concentración de ADN, lo que hizo la señal más débil (Guía química GeneScan). El método de utilizar dos productos de PCR es bueno pero para aumentar la intensidad de la señal, se puede realizar una de las dos opciones siguientes: combinar las muestras, precipitar el producto y resuspender las muestras; o utilizar una columna de separación iónica (Guía química GeneScan).

F. **Determinación de herencia mendeliana de los microsatélites.** Previo al análisis en poblaciones naturales se analizó la herencia de las secuencias microsatélites estudiadas a través

de cruces con mosquitos de dos colonias localizadas en el insectario de la Universidad del Valle, con la finalidad de comprobar si las 11 secuencias microsatélites utilizadas en el estudio se heredaban de forma mendeliana. La herencia mendeliana de los marcadores microsatélites ya ha sido descrita por varios autores (Ashley and Dow, 1994; Jarne and Lagoda, 1996; Rongneparut *et al.*, 1996), y es una de las características que hacen que los microsatélites sean marcadores moleculares de alta calidad para estudios de genética de poblaciones. Lo anterior, porque permiten asumir que los alelos de un individuo provienen únicamente de los padres. Con los cruces se observó que todos los alelos mostrados por la generación F1 estaban presentes en los progenitores, lo cual comprobó la herencia mendeliana de estos microsatélites.

Locus	Muestra	Tamaño de la muestra (pb)	Comentario
NP113F	P macho	114.45	Homocigoto
	P hembra	110.75 / 114.40	Heterocigoto
	F1	114.49	Homocigoto
	F1	114.49	Homocigoto
	F1	110.82 / 114.53	Heterocigoto
NP38F	P macho	111.53	Homocigoto
	P hembra	97.94	Homocigoto
	F1	97.91 / 111.76	Heterocigoto
	F1	97.92 / 111.70	Heterocigoto
Aa2-25	F1	97.91	Homocigoto
	P macho	111.66	Homocigoto
	P hembra	111.60	Homocigoto
	F1	111.63	Homocigoto
	F1	111.63	Homocigoto
	F1	111.67	Homocigoto

* P macho y hembra se refiere a los progenitores o generación parental, F1 se refiere a la primera descendencia de los cruces de estos progenitores.

Cuadro 10. Determinación de la herencia mendeliana de los microsatélites NP113F, NP38F y Aa2-25 a través de cruces con mosquitos del insectario de la Universidad del Valle

G. Identificación de alelos en cada locus. Previo a la discusión del análisis de microsatélites por electroforesis capilar, se debe tomar en cuenta que en el electroferograma se observa el

tamaño estimado del fragmento. El tamaño exacto sólo se puede obtener mediante secuenciación, la cual no se realizó. Por lo tanto, el tamaño estimado de los fragmentos que se obtuvo es preciso, pero no exacto. Desde este punto de vista, el uso de microsatélites es más informativo que el polimorfismo en aloenzimas pero menos informativo que el análisis por secuenciación (Jarne and Lagoda, 1996).

Para identificar y cuantificar los alelos reales para cada locus se siguieron las reglas listadas en la sección G de materiales y métodos. Los picos no esperados o *stutter bands*, que aparecen en los electroferogramas, son producidos por el deslizamiento de la enzima *Taq* polimerasa durante la amplificación, en la reacción de PCR, lo que incrementa o disminuye el número de repeticiones por una unidad (Jarne and Lagoda, 1996; Walton *et al.*, 1998).

Al analizar los electroferogramas, obtenidos con el programa GeneScan, se observó que 13 muestras de ADN no amplificaron con ninguno de los pares de iniciadores utilizados, lo que sugiere que el ADN pudo haberse degradado, posiblemente por la manipulación previa a la extracción, dado que la cabeza y el abdomen de todos los mosquitos fueron utilizados en un ELISA para detectar antígenos del circumsporozoito de *Plasmodium*. Por lo anterior, estas 13 muestras se excluyeron del análisis. Luego se cuantificaron las muestras que amplificaron y las que no amplificaron con cada microsatélite.

Para los loci NP106F, Aa6-41 y Aa2-14 no amplificaron más del 95% de las muestras analizadas (Cuadro 8) ni los controles positivos, por lo que estos marcadores se excluyeron del análisis ya que no se contaba con los datos suficientes para el análisis genético, y también porque al no amplificar los controles positivos, queda la incertidumbre de si la reacción de PCR tenía las condiciones adecuadas. Los loci Aa6-41 y Aa2-14 presentaron pocos alelos nulos cuando fueron analizados previamente por Molina *et al.*, 2004, lo cual puede deberse a la diferencia en la técnica de análisis utilizada ya que en este estudio las condiciones de la reacción de PCR para estos loci fueron cambiadas completamente. Con la información que se tiene al momento no se puede determinar que fue lo que causó que estos loci no amplificaran. Con otros loci sí se obtuvo amplificación de las muestras, lo que sugiere que sí había ADN, pero probablemente en poca cantidad lo que pudo provocar un error de muestreo. Para asegurarse que si hay ADN en la reacción se recomienda que en futuros estudios se incluya en cada reacción un control interno, por ejemplo ADN mitocondrial. Otra posible causa de la falta de amplificación de estos loci son las condiciones de la reacción de PCR, por lo que se recomienda volver a optimizarlas. Estos resultados también sugieren la posible existencia de alelos nulos, que son mutaciones en el sitio de hibridación de los iniciadores lo que inhibe la amplificación de uno o ambos alelos (Walton *et al.*, 1998). Los alelos nulos son un claro ejemplo de polimorfismo en los iniciadores; se identifican por la falta completa y consistente de la amplificación por PCR. Se ha observado, mediante secuenciación, que los alelos nulos resultan de polimorfismos en o muy cerca del extremo 3' de un iniciador (Wang *et al.*, 1999). Para verificar lo anterior, se sugiere diseñar

nuevos iniciadores, amplificar unas muestras y luego secuenciarlas para poder ver si realmente había mutado el sitio de hibridación de estos iniciadores.

Como se mencionó anteriormente, no se obtuvo producto de PCR, es decir, no se observaron picos en los electroferogramas de alrededor del 40% de muestras de ADN que habían sido extraídas con fenol / cloroformo, mediante una modificación del método de Collins *et al.*, 1987 (Cuadro 8). Probablemente, estas muestras pueden ser rescatadas concentrando el DNA por precipitación con etanol y repitiendo el PCR. Por lo anterior, se decidió excluir del análisis 43 de las muestras extraídas con una modificación del método fenol/cloroformo. Las muestras que se excluyeron tenían el número de identificación de laboratorio 143 – 186, (ver Apéndice B). En resumen, en el presente estudio se caracterizaron ocho secuencias microsatélites utilizando un total de 163 mosquitos. El Cuadro 11 muestra el porcentaje de muestras amplificadas con cada locus en estudio. En la Figura 18 se observa de manera gráfica que los loci NP128F y NP94F fueron los que más alelos nulos presentaron.

Locus	% amplificado
NP76consA	50%
NP113F	83%
NP38F	68%
NP94F	32%
NP81R	51%
NP128F	26%
Aa2-25	75%
Aa1-90	58%

Cuadro 11. Porcentaje de muestras con amplificación positiva por PCR, de un total de 163 mosquitos

Los secuenciadores automatizados de ADN y sus programas de computación contribuyen substancialmente a incrementar la eficiencia de los proyectos de genotipificación. Sin embargo, algunos pasos conceptualmente simples, requieren intervención manual la cual reduce la eficiencia del proceso. Uno de estos pasos es la conversión de tamaños imprecisos de los productos de PCR, determinados por programas comerciales, a los alelos discretos que los tamaños representan (Idury and Cardon, 1997). Por lo anterior se utilizó el programa *Allelogram* (Apéndice I) descrito por Idury and Cardon, 1997, que funciona en el sistema operativo Unix, para definir el tamaño de cada alelo y luego, de manera automatizada, las cajuelas o *bins* una vez que el tamaño inicial estuvo definido.

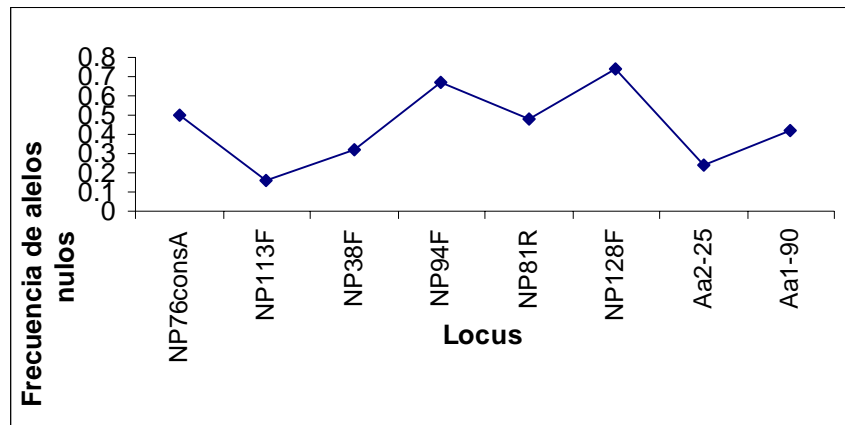


Figura 18. Frecuencia de alelos nulos para cada locus.

A partir del registro de los alelos reales, se procedió al análisis del polimorfismo de las ocho secuencias microsatélites.

El programa utiliza el método de mínimos cuadrados para generar la asignación categórica del alelo para cada muestra y una clasificación exacta de las cajuelas o *bins* para cada marcador. Este método permite que la asignación del tamaño de los alelos sea menos subjetiva que al hacerlo de manera manual. Adicionalmente, el programa permite identificar marcadores que no se puedan someter a procesos automáticos, y alertar al investigador de posibles problemas en el PCR, iniciadores, u otras condiciones que requieren de más atención en el laboratorio (Idury and Cardon, 1997).

El programa es capaz de analizar cualquier cantidad de datos que sean ingresados, siempre y cuando se mantenga el formato de entrada. Un factor importante es establecer el punto de corte para cada marcador, ya que el número de alelos afuera del punto de corte establecido depende de qué tan dispersos estén los tamaños de los alelos para ese marcador. Entre más pequeño sea el punto de corte, menos dispersión está permitida. Cualquier alelo que esté fuera del punto de corte permitido alrededor de cada *bin*, se toma como cero en los archivos de salida y el investigador debe de analizar manualmente la muestra para decidir si se incluye o no en el estudio (comunicación personal, Denise Brocklebank, 2003).

Por lo tanto, si se utiliza un punto de corte pequeño y el tamaño de los alelos está disperso, una parte de los datos se convierten en cero y no se van a utilizar. Incrementar el punto de corte significa que un mayor número de datos van a ser incluidos, pero probablemente a expensas de incluir datos de baja calidad o una asignación del tamaño de alelos menos exacta. El punto de corte que se seleccione depende de la calidad de el tamaño de los alelos en los datos brutos, y la dispersión o variabilidad que se desee permitir alrededor de cada *bin* (comunicación personal, Denise Brocklebank).

Por lo anterior se decidió trabajar con puntos de corte pequeños, que nos indicarán la calidad de los marcadores utilizados en este estudio. Para los microsatélites NP76consA, NP38F y Aa2-25 se utilizó 0.25 pb como punto de corte. Ningún alelo quedo afuera de este margen (Apéndice J), indicando que estos microsatélites son de alta calidad. La desviación estándar de cada *bin* menor de 0.3 (Apéndice K) indica que la asignación de los alelos fue exacta (Idury and Cardon, 1997). En las Figuras 19 a 21 se muestran los histogramas con las frecuencias alélicas para cada uno de estos locus. Los histogramas se construyeron utilizando el programa Microsoft Excel con el tamaño de los alelos calculado con el programa *Allelogram*.

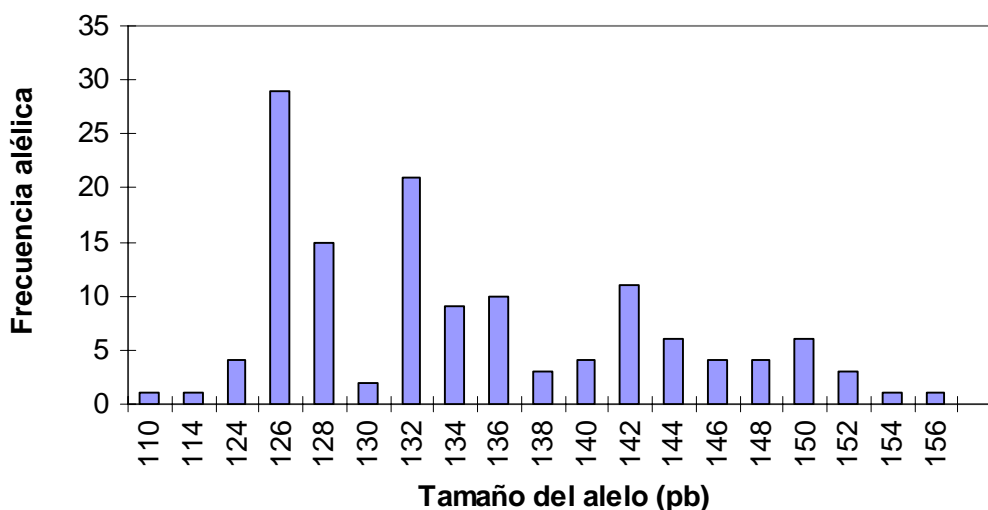


Figura 19. Frecuencia alélica para el locus NP76consA (Allelogram, 2003). Para este locus se obtuvieron 19 alelos, siendo el de 126 pb el alelo más frecuente, utilizando un punto de corte de 0.25 pb.

Los resultados obtenidos para el locus Aa2-25 utilizando geles de secuenciación de poliacrilamida y un equipo de electroforesis capilar, difieren en la determinación del alelo más frecuente (104 pb versus 98 pb) y en el rango de alelos obtenido (92 a 196 pb versus 90 a 154 pb). Aunque las diferencias no son muy significativas, se podría mencionar como posible causa de éstas que el método de electroforesis capilar es más exacto y menos subjetivo que las geles de secuenciación de poliacrilamida. Con la electroforesis capilar se tiene una mejor resolución para identificar los alelos reales, ya que el tamaño del pico, que representa al tamaño del alelo, tiene mejor resolución que las bandas observadas en los geles de secuenciación. En el equipo de electroforesis capilar el tamaño del alelo es calculado por medio del método *Local Southern* (Apéndice H), que promedia el resultado obtenido de tres regresiones lineales para obtener dicho tamaño de forma automática, lo cual representa otra ventaja sobre el otro método en el cual se realiza una sola regresión lineal, manualmente, utilizando el programa Microsoft Excel.

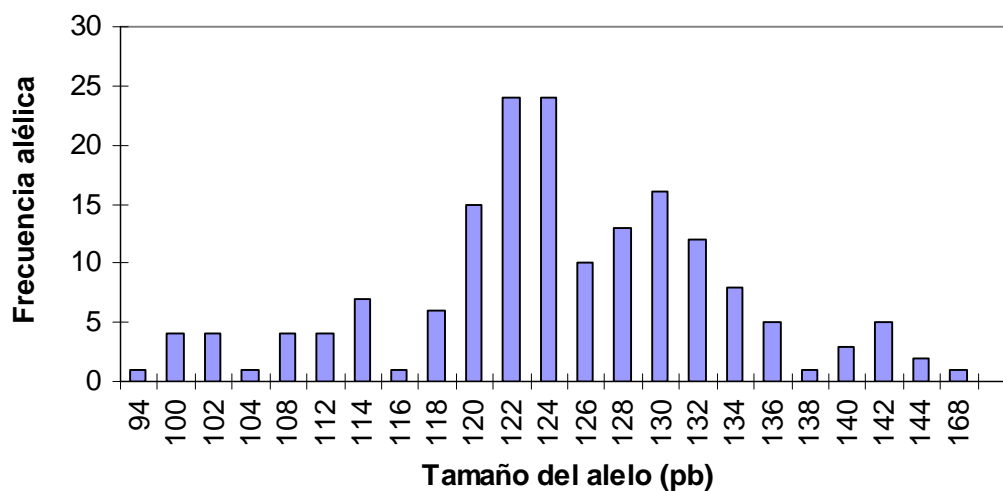


Figura 20. Frecuencia alélica para locus NP38F (Allelogram, 2003). Para este locus se obtuvieron 23 alelos, siendo los de 122 pb y 124 pb los alelos más frecuentes, utilizando un punto de corte de 0.25 pb.

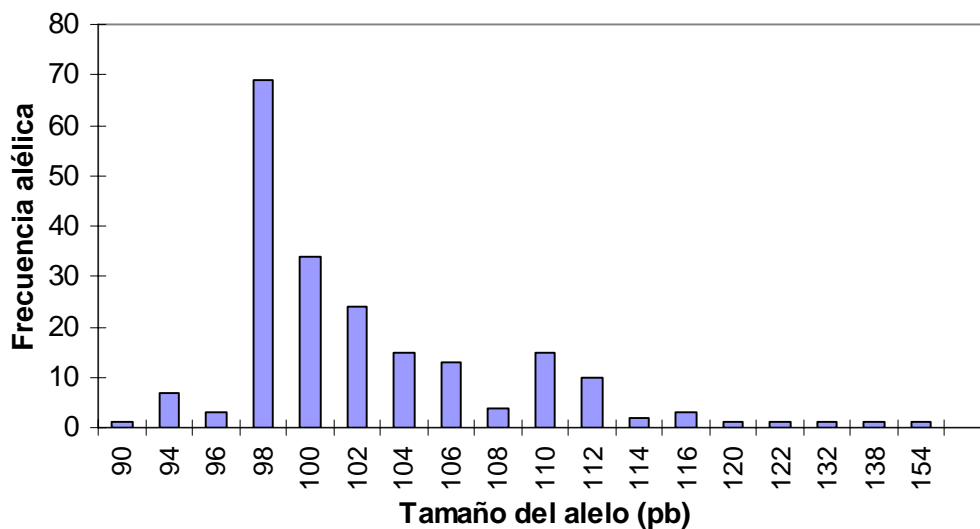


Figura 21. Frecuencia alélica para locus Aa2-25 (Allelogram, 2003). Para este locus se obtuvieron 18 alelos, siendo el de 98 pb el alelo más frecuente, utilizando un punto de corte de 0.25 pb.

Para el locus NP94F se utilizó un punto de corte de 0.30 pb. Para este punto de corte, el alelo 1 de la muestra 2 quedaba afuera del *bin* (Apéndice J) por lo que se analizó manualmente el electroferograma (Apéndice M) y se decidió incluir la muestra en el análisis, ya que el pico estaba bien definido con una altura de 177 uf. En el histograma, Figura 22, y en los datos de los archivos de información sobre cada *bin* (Apéndice K) se puede observar la información de este locus. También se pudo observar que la asignación de los alelos fue exacta ya que las desviaciones estándar de cada *bin* son menores de 0.3.

Para los loci NP113F y NP128F se utilizó un punto de corte de 0.40 pb. Con este punto de corte ningún alelo del locus NP113F quedó afuera de los *bins* (Apéndice J). Para el locus NP128F, el alelo 1 de la muestra 56 y el alelo 2 de la muestra 54 quedaron afuera de los respectivos *bins* (Apéndice J). Se analizaron manualmente los electroferogramas (Apéndice M) y se decidió incluir el alelo 2 de la muestra 54, ya que el pico estaba bien definido con una emisión de fluorescencia 371 uf. El alelo 1 de la muestra 56 era un pico pequeño con una altura de 52 uf, que estaba debajo de un pico del marcador molecular. Este alelo no se va a incluir porque puede tratarse de señal de ruido, o puede ser un *pull-up* de el pico del marcador molecular. En el histograma, Figuras 23 - 24, y los datos en los archivos de información sobre cada *bin* (Apéndice K) se puede observar el número de alelos para cada uno de estos loci y el alelo más frecuente para cada marcador.

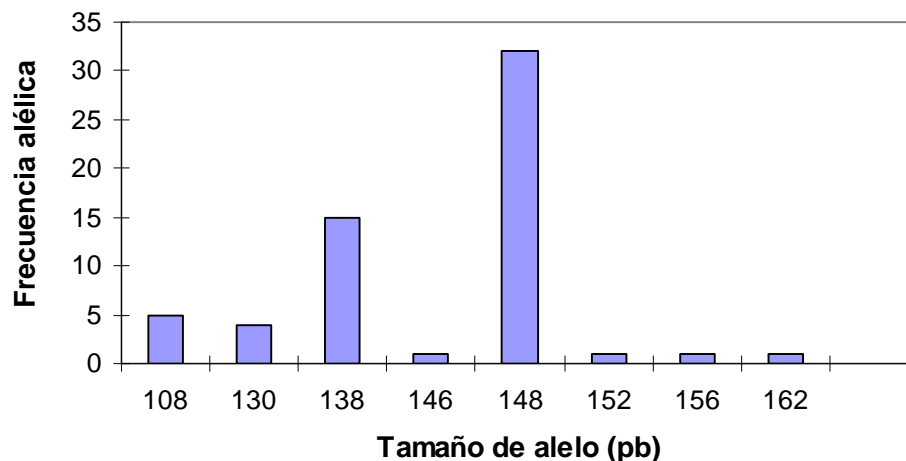


Figura 22. Frecuencia alélica para locus NP94F (Allelogram, 2003). Para este locus se obtuvieron 8 alelos, siendo el de 148 pb el alelo más frecuente, utilizando un punto de corte de 0.30 pb.

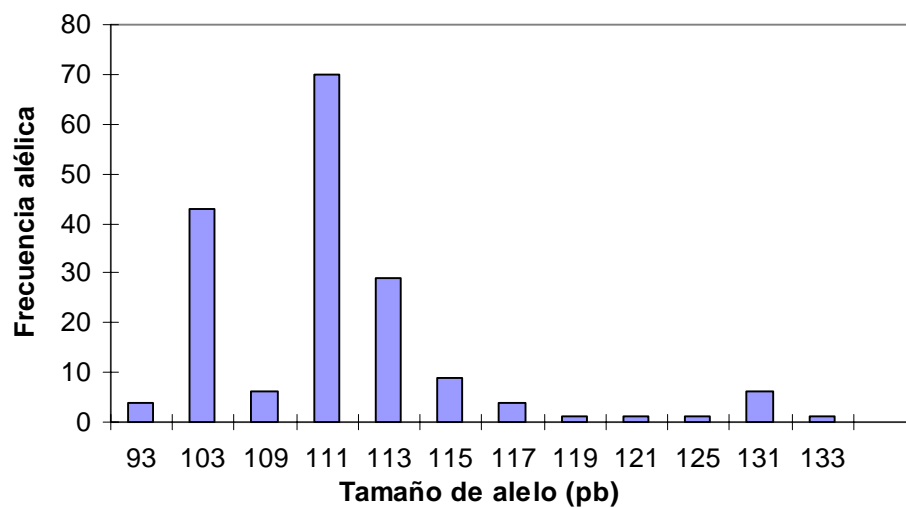


Figura 23. Frecuencia alélica para locus NP113F (Allelogram, 2003). Para este locus se obtuvieron 12 alelos, siendo el de 111 pb el alelo más frecuente, utilizando un punto de corte de 0.40 pb.

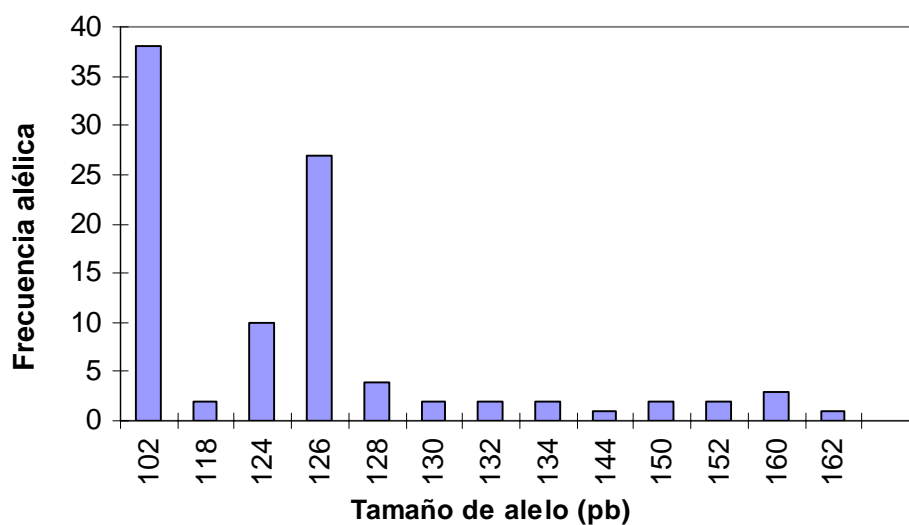


Figura 24. Frecuencia alélica para locus NP128F (Allelogram, 2003). Para este locus se obtuvieron 13 alelos, siendo el de 102 pb el alelo más frecuente, utilizando un punto de corte de 0.40 pb.

Para el locus NP81R se utilizó 0.50 pb como punto de corte. A pesar que el rango de variabilidad permitido era mayor que los anteriores, tres alelos quedaban afuera (Apéndice J). Se analizaron los electroferogramas (Apéndice M) de estas muestras (45, 200 y 205) y se decidió incluir el alelo de la muestra 45, ya que el pico estaba bien definido con una emisión de fluorescencia de 2736 uf. El alelo de la muestra 200 no se incluyó en el análisis ya que aunque tenían una altura de 168 uf, el pico no estaba bien definido. El alelo de la muestra 205 tampoco se incluyó en el análisis, ya que el pico no estaba definido y tenía una altura baja de 53 uf. En el histograma, Figura 25, y los datos en los archivos de información sobre cada *bin* (Apéndice K) se puede observar la información de este locus. Se pudo observar que la asignación de los alelos fue exacta ya que las desviaciones estándar de cada *bin* son menores de 0.3, excepto la del alelo de 104 pb que fue de 0.41, lo que indica que los alelos en este *bin* estaban dispersos.

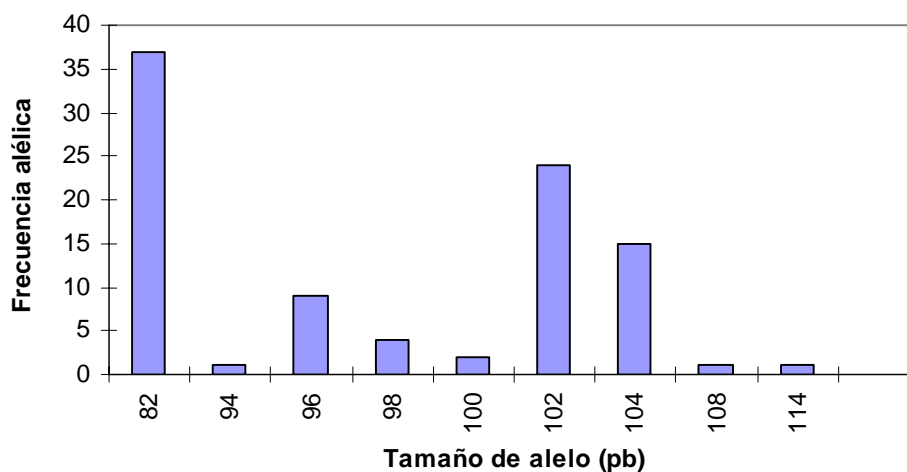


Figura 25. Frecuencia alélica para locus NP81R (Allelogram, 2003). Para este locus se obtuvieron 9 alelos, siendo el de 82 pb el alelo más frecuente, utilizando un punto de corte de 0.50 pb.

Para definir el tamaño de los alelos para el locus Aa1-90 se utilizó 0.45 pb como punto de corte. Aunque la variabilidad permitida era grande, 51 muestras quedaban afuera del rango permitido para cada *bin*. Al observar los archivos de información de este locus (Apéndice K) se observó que cinco datos de las desviaciones estándar eran mayores a 0.45, lo cual de acuerdo con Idury and Cardon, 1997, refleja problemas severos de genotipificación ya que el tamaño de los alelos forma una distribución uniforme a través de todos los *bins* en lugar de una serie de distribuciones normales, contrario a lo descrito por Schoua, 2000 y Mills, 2001. El programa identifica que el locus Aa1-90 es de baja calidad y que se debe volver a genotipificar. Por lo anterior este marcador se dejó fuera del análisis genético.

En el Cuadro 12, se presenta el rango de alelos determinado para cada locus analizado, utilizando el programa *Allelogram*.

Locus	Repeticiones	Tamaño esperado (pb)	Número de alelos	Rango de alelos (pb)
NP76consA	(AC) ₃ CCAT(AC) ₁₆	144	19	110 – 156
NP38F	(GA) ₇ AA(GA) ₈	116	23	94 – 168
Aa2-25	(TC) ₂₀	114	18	90 – 154
NP94F	(CA) ₄ T(AC) ₂ (GC) ₅	143	8	108 – 162
NP113F	(AC) ₅ GCAT(AC) ₁₀	115	12	93 – 133
NP128F	(CT) ₁₅ TTCTCC(CT) ₂	138	13	102 – 162
NP81R	(GA) ₁₂	100	9	82 – 114

Cuadro 12. Alelos determinados para cada locus utilizando poblaciones naturales de mosquitos *Anopheles albimanus* del municipio de Ixcán

Dos buenos criterios para seleccionar loci para el diseño de iniciadores son:

1) que no hayan alteraciones presentes en la unidad repetitiva y

2) deben haber más de 12 repeticiones presentes (Schlötterer and Pemberton, 1994). Las interrupciones en las secuencias parecen estabilizar los arreglos de repeticiones, lo que hace a los microsatélites interrumpidos menos variables que los puros. Los loci compuestos e interrumpidos tienden a ser menos polimórficos (Jarne and Lagoda, 1996). Lo anterior explica porque es posible que los loci NP113F y NP128F tengan menor número de alelos, ya que los arreglos de estas repeticiones tienen más interrupciones que los otros loci. También se espera que las repeticiones largas sean más polimórficas (Jarne and Lagoda, 1996). Esto explica por qué el locus NP81R, a pesar de ser un dinucleótido puro, tiene menor número de alelos que el locus Aa2-25. El locus NP94F es el que menor número de repeticiones tiene, 11, por lo que también fue el que menor número de alelos presentó.

En base a todo el análisis anterior se seleccionaron los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 como marcadores útiles para estudios de genética de poblaciones ya que con éstos amplificaron más del 65% de las muestras analizadas y se obtuvieron entre 13 – 23 alelos por locus. Adicionalmente, estos loci tienen más de 12 repeticiones presentes y las interrupciones en las secuencias microsatélites de NP113F y NP38F son pequeñas.

H. Análisis genético de las secuencias microsatélites. A partir del registro de alelos reales en las 15 poblaciones del municipio de Ixcán, se analizó el polimorfismo de las tres secuencias

microsatélites, seleccionadas como buenos marcadores moleculares. Se calculó la frecuencia alélica, el número efectivo de alelos, la heterocigocidad observada y esperada y el índice de fijación. Estos parámetros se calcularon con el programa para genética de poblaciones GenAEx, versión 5.04. Para comparar el número de heterocigotos esperados y observados se calculó chi cuadrado (X^2), y la probabilidad (P) para establecer si la población estaba en equilibrio Hardy-Weinberg. También se calculó la distancia e identidad de Nei, para establecer si los grupos o poblaciones estaban relacionados entre sí. Por último se calculó el índice de fijación total, para examinar el nivel de divergencia genética entre subpoblaciones, y Nm para establecer si existía flujo de genes entre ellas. Estos parámetros se calcularon con el programa para genética de poblaciones PopGene, versión 1.31.

1. Diversidad genética en la población de *Anopheles albimanus* de Ixcán, Quiché.

Primero se analizó la frecuencia de cada locus tomando las 15 comunidades del municipio de Ixcán como una sola población. La frecuencia de alelos en los tres loci varía de 0.004 a 0.393, Cuadro 13. Se considera polimórfico un locus cuyo alelo predominante, o más común, tiene una frecuencia menor a 0.99 cuando la muestra es mayor a 100 individuos. En cuanto a los alelos, en sí mismo el número de alelos promedio por locus también es un grado de polimorfismo, mientras mayor sea más polimórfico (Hartl and Clark, 1997). Por lo tanto, los tres loci mencionados anteriormente son polimórficos en las 15 comunidades ya que la frecuencia del alelo predominante no sobrepasa el 0.393 (Cuadros 12-13).

Locus	N	Na	Ne	Frecuencia alelo predominante	Ho	He	F
NP38F	111	23	12.217	0.162	0.541	0.918	0.411
NP113F	136	12	3.651	0.393	0.279	0.726	0.615
Aa2-25	123	18	5.149	0.370	0.667	0.806	0.173

N: número de individuos que amplificaron con cada locus, Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados, F: índice de fijación.

Cuadro 13. Diversidad genética para cada locus en la población de *Anopheles albimanus* del municipio de Ixcán (GenAEx, 2002)

Como se observa en el Cuadro 13, los valores indican que el grado de diversidad depende de el locus. El locus NP38F fue el que mayor diversidad presentó, detectando 23 alelos y el alelo predominante con una frecuencia de 0.162. Con cada locus se observó que para la población, la heterocigosidad observada fue menor a la esperada. Posibles explicaciones para la deficiencia de heterocigotos pueden ser el efecto Wahlund, apareamiento en consanguinidad o apareamiento que no es al azar. El efecto Wahlund se da

cuando las poblaciones muestreadas no son la misma. Hay dos poblaciones unidas que no se mezclan y por lo tanto hay deficiencia de heterocigotos (Beaty and Marquardt, 1996; Oosterhout, C. *et al.*, 2004). Otra posible explicación son los errores de genotipificación, como la presencia de alelos nulos, la dominancia de alelos pequeños y la presencia de picos no esperados. Estos errores de genotipificación pueden identificarse, por lo que es posible discriminar entre desviaciones producidas porque no hay panmixia de aquellas producidas por errores de genotipificación. Para identificar que la deficiencia de heterocigotos se debe a errores de genotipificación como la presencia de alelos nulos, dominancia de alelos pequeños y la identificación de picos no esperados o *stutter bands* se sugiere buscar algún programa de computación que ayude a identificar estos errores. El número efectivo de alelos, N_e , se utiliza para comparar poblaciones entre sí y loci entre sí. El N_e nos puede indicar polimorfismo, ya que a medida que es más alto nos indica mayor número de alelos detectado con ese locus. A menor número de alelos mayor probabilidad de que un alelo se fije en la población, por lo que el locus NP38F es muy útil ya que tiene el valor de N_e más alto (Cuadro 13). El índice de fijación, F , es la frecuencia de homocigosidad para un alelo particular, en un locus dado. Nos indica si hay o no hay deficiencia de heterocigotos (Hoelzel and Dover, 1991). El locus NP113F es el que mayor número de homocigotos tiene, ya que el valor para el índice de fijación es el más alto y la diferencia entre el número de heterocigotos esperados y observados es mayor.

2. **Diversidad genética entre los cuatro grupos definidos para el estudio en Ixcán.** Luego de analizar los datos como una sola población se hicieron cuatro grupos (Cuadro 14) para comparar la diversidad genética de cada locus en grupos que se encontraban a una distancia entre 3 a 16 km. Se hizo el análisis en un escala microgeográfica ya que la información generada hasta la fecha ha demostrado que la distancia no necesariamente constituye una barrera genética importante (Rongnparut *et al.*, 1999; Simard *et al.*, 1999; Kamau, 1998; Mills, 2001; Schoua, 2000). Por ejemplo la forma sabana de *Anopheles gambiae* del oeste de Kenya presenta una ligera diferencia de las del occidente de África, 5000 km aparte, pero muestra un aislamiento genético significativo entre poblaciones de la costa de Kenya, 700 km aparte (Kamau *et al.*, 1998).

NP38F							
Grupo	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
1	43	17	11.929	0.151	0.605	0.916	0.340
2	23	15	9.618	0.217	0.435	0.896	0.515
3	30	16	7.860	0.267	0.633	0.873	0.274
4	15	9	6.081	0.300	0.333	0.836	0.601

NP113F							
Grupo	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
1	53	10	4.071	0.330	0.302	0.754	0.600
2	31	8	3.675	0.355	0.323	0.728	0.557
3	33	8	3.260	0.470	0.212	0.693	0.694
4	19	5	2.498	0.526	0.316	0.600	0.473
Aa2-25							
Grupo	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
1	43	16	5.479	0.360	0.674	0.817	0.175
2	28	8	4.653	0.375	0.714	0.785	0.090
3	30	12	5.341	0.333	0.600	0.813	0.262
4	22	10	4.084	0.432	0.682	0.755	0.097

* Se refiere a la frecuencia del alelo predominante

N: número de individuos que amplificaron con cada locus, Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados, F: índice de fijación.

Cuadro 14. Diversidad genética para cada locus calculada por grupo de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (GenAIEx, 2002). Cada grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 1 está formado por las comunidades: Cari, El Quetzal, Lorena, San Alfonso y Santa Rosa. El grupo 2 está formado por las comunidades: El Afán, Horizontes, Margaritas II y Santa Ana. El grupo 3 está formado por las comunidades: Carolina, El Peñón, Esija y Punto Chico. El grupo 4 está formado por las comunidades: Monterrey y Sonora.

Al comparar los datos obtenidos analizando las 15 comunidades como una sola población, y en cuatro grupos se observa que los datos son consistentes para cada locus. Los valores indican que el grado de diversidad depende de el locus ya que los grupos 1, 2 y 3 presentan el mayor número de alelos en el locus NP38F, mientras que el grupo 4 lo tiene en el locus Aa2-25. Con este análisis también se observó una deficiencia de heterocigotos ya que para cada grupo, con cada locus, la heterocigosidad observada fue menor a la esperada. Es necesario identificar a qué se debe el exceso de homocigotos, ya que esto podría estar indicando una estructuración, o un problema en el diseño de los iniciadores utilizados. Los índices de fijación para cada grupo con el locus NP113F son más altos, lo que también coincide con el análisis anterior, indicando que con este locus se detectó mayor número de homocigotos. También se observa que para el locus NP113F hay pocos alelos con la misma frecuencia, Ne, lo que nos indica que éste es el locus menos polimórfico, y en el cual existe un alelo que tiene una frecuencia muy alta.

Se calcularon los datos promedios para cada grupo con cada locus (Cuadro 15, Figura 26). Con estos resultados se observó que en el grupo 1 se detectó el mayor número de alelos, probablemente porque era el grupo que mayor número de muestras tenía (59 mosquitos). Con los grupos 2 y 3, se detectaron aproximadamente el mismo número de alelos, ya que ambos grupos tenían el mismo número de muestras (40 mosquitos). El grupo 4, fue en el que se detectó el menor número de alelos lo que coincide con que este grupo era el que menor número de muestras tenía (24 mosquitos). Para comparar el número de alelos entre los cuatro grupos se calculó el número de alelos efectivos o N_e . En la Figura 26, al comparar el número de alelos absolutos con los efectivos se observa que el grupo 1 hay mayor grado de polimorfismo.

Grupo	Na	Error estándar	Ne	Error estándar	Ho	He	Error estándar
1	14.33	2.19	7.16	2.42	0.53	0.83	0.05
2	10.33	2.33	6.03	1.81	0.48	0.81	0.05
3	12.00	2.31	5.49	1.33	0.48	0.79	0.05
4	8.00	1.53	4.22	1.04	0.44	0.73	0.07

Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados

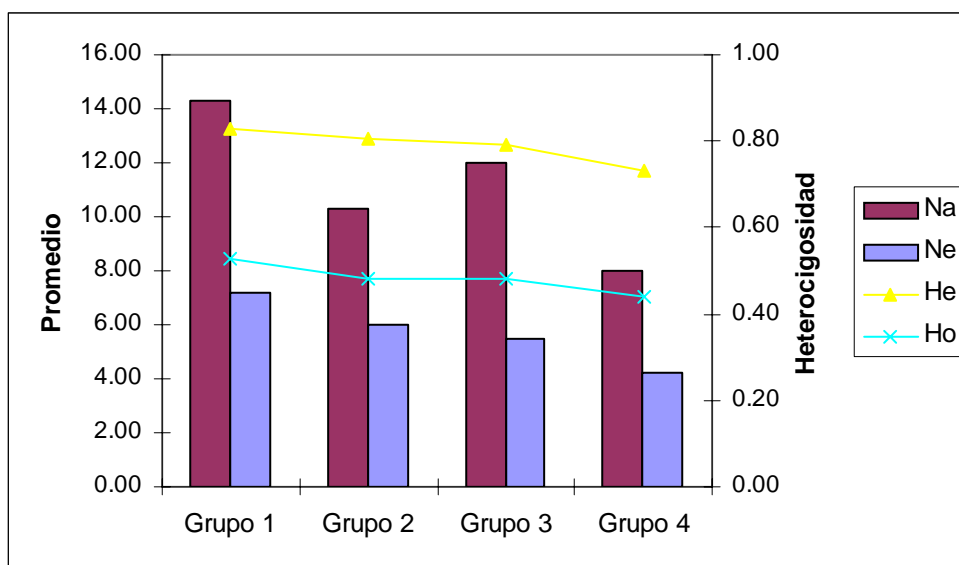
Cuadro 15. Datos promedio para cada grupo de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002). Cada grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 1 está formado por las comunidades: Cari, El Quetzal, Lorena, San Alfonso y Santa Rosa. El grupo 2 está formado por las comunidades: El Afán, Horizontes, Margaritas II y Santa Ana. El grupo 3 está formado por las comunidades: Carolina, El Peñón, Esija y Punto Chico. El grupo 4 está formado por las comunidades: Monterrey y Sonora.

También se observa que la heterocigosidad observada es menor a la esperada en los cuatro grupos (Figura 26), lo cual nos indica que los grupos no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. El modelo de Hardy-Weinberg es un modelo de referencia en el cual ninguna fuerza evolutiva actúa, mas que aquellas impuestas por el propio proceso de reproducción (Hartl and Clark, 1997). Los grupos bajo estudio deberían de estar en equilibrio Hardy-Weinberg, ya que según Hartl and Clark, 1997, para asumir este modelo se deben tener las siguientes características:

- 1) El organismo debe ser diploide,
- 2) La reproducción es sexual,
- 3) Las generaciones no se traslapan,
- 4) El gen bajo consideración tiene dos alelos,

- 5) Las frecuencias alélicas son idénticas en machos y hembras,
- 6) El apareamiento es al azar,
- 7) El tamaño de la población es bastante grande (en teoría, infinita),
- 8) La migración es despreciable,
- 9) La mutación se puede ignorar y,

10) La selección natural no afecta los alelos bajo consideración. Para corroborar que las población de cada grupo no estaban en equilibrio Hardy-Weinberg se calculó la prueba de chi-cuadrado (χ^2) y la probabilidad asociada, Cuadro 16.



Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados

Figura 26. Patrón alélico promedio para cada grupo de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán, utilizando los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 (GenAlEx, 2002). Cada grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 1 está formado por las comunidades: Cari, El Quetzal, Lorena, San Alfonso y Santa Rosa. El grupo 2 está formado por las comunidades: El Afán, Horizontes, Margaritas II y Santa Ana. El grupo 3 está formado por las comunidades: Carolina, El Peñón, Esija y Punto Chico. El grupo 4 está formado por las comunidades: Monterrey y Sonora.

Microsatélites			
Valores de P en la prueba de χ^2			
Grupo	NP113F	NP38F	Aa2-25
1	0.000000	0.000000	0.000000
2	0.000000	0.000000	0.466853
3	0.000000	0.000000	0.000150
4	0.074114	0.000000	0.796472

Cuadro 16. Análisis de Hardy-Weinberg para los grupos de *Anopheles albimanus* del municipio de Ixcán, estudiados con los microsatélites NP113F, NP38F y Aa2-25 (PopGene, 1999). Cada grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 1 está formado por las comunidades: Cari, El Quetzal, Lorena, San Alfonso y Santa Rosa. El grupo 2 está formado por las comunidades: El Afán, Horizontes, Margaritas II y Santa Ana. El grupo 3 está formado por las comunidades: Carolina, El Peñón, Esija y Punto Chico. El grupo 4 está formado por las comunidades: Monterrey y Sonora.

Con los resultados obtenidos, Cuadro 16, se observa que con el locus NP38F ninguna de las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg, ya que la probabilidad es menor a 0.05. Según Hartl and Clark, si la probabilidad es mayor a 0.05, las poblaciones están en equilibrio ya que la desviación entre los valores observados y esperados se debe únicamente al azar. Mientras que si la probabilidad es menor a 0.05, se considera que las poblaciones no están en equilibrio ya que alguna fuerza está actuando para producir una desviación alta entre los valores observados y esperados. El grupo 4 está en equilibrio Hardy-Weinberg para los loci NP113F y Aa2-25, mientras que el grupo 2 está en equilibrio únicamente con el locus Aa2-25.

La desviación del equilibrio Hardy-Weinberg se puede deber a varios factores. Primero, es importante recordar que con los tres loci se detectaron alelos nulos, Figura 18, lo cual pudo haber influido en el análisis de equilibrio Hardy-Weinberg, ya que pudieron haber algunos individuos que se tomaron como homocigotos, cuando en realidad eran heterocigotos, pero por poseer alelos nulos no fue posible detectarlos. En el Cuadro 14, se observa que con el locus NP38F fue con el que menor número de muestras amplificaron en cada grupo lo cual pudo influir en que se detectara un desequilibrio de Hardy-Weinberg en los cuatro grupos con este microsatélite. Otra posibilidad es que la muestra tomada no sea representativa y por lo tanto refleje frecuencias inadecuadas, ya que para este modelo se asume que la población es infinita. La variación de frecuencias alélicas debido a un error de muestreo en poblaciones pequeñas se denomina arrastre genético al azar. El arrastre genético al azar está presente a menos que la población tenga un

tamaño infinito, pero la magnitud de este efecto en la frecuencia alélica sobre un número pequeño de generaciones es comúnmente lo suficientemente pequeño que el proceso se puede ignorar si el tamaño de la población es mayor o igual a 500 (Hartl and Clark, 1997). Por lo anterior, no se descarta la posibilidad que la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg se esté dando por el tamaño de la muestra en estudio. Al modelo de Hardy-Weinberg se le llama el modelo nulo de la evolución, es decir, no hay evolución. Evolución no significa que mejora, significa que cambia. Por lo que se podría decir que estos grupos están cambiando.

Es importante asumir que los microsatélites utilizados son marcadores moleculares neutros, por lo que no deben estar bajo selección. Para esto hay que comprobar la neutralidad de los loci utilizados ya que dependiendo en el gen en el que se encuentren los microsatélites sí pueden estar bajo selección. No se conoce la localización de estas secuencias microsatélites en estudio en el genoma de *Anopheles albimanus* ya que éste todavía no ha sido secuenciado, por lo que este es un factor que no se puede descartar esté influyendo en el desvío del equilibrio Hardy-Weinberg. Para conocer si estos loci están bajo selección natural, se sugiere:

- 1) Hacer colectas en diferentes poblaciones por tres años consecutivos y realizar un análisis más profundo;
- 2) Realizar un análisis de hibridación in situ con fluorescencia, FISH (por sus siglas en inglés, «fluorescent in situ hybridization»), el cual es muy efectivo para localizar físicamente la posición cromosomal de secuencias de ADN utilizando sondas.

Dadas las limitaciones técnicas de los microsatélites, es importante identificar si alguno de los errores de genotipificación están causando desviaciones en las proporciones de Hardy-Weinberg, particularmente provocando una disminución de heterocigotos.

Para cuantificar, en base a las frecuencias alélicas, la divergencia entre los cuatro grupos se calculó la identidad y distancia genética de Nei *unbiased*, Cuadro 17 y Figura 27. Se utilizó el modelo *unbiased* ya que éste toma en cuenta el tamaño de la población, lo cual es importante cuando el tamaño de la muestra es pequeño.

Para interpretar estos resultados se toma que Identidad = 1, es decir, que mientras más cercano a 1 estén los resultados más se parecen los grupos. La identidad genética entre los grupos oscila entre 0.8716 y 0.9700, siendo el grupo 4 el más diferente respecto a los otros grupos. Para analizar la distancia genética, se asume que entre más cercano a cero sean los resultados, más relacionados están entre sí los grupos. Las distancias genéticas entre los grupos oscilan entre 0.0305 y 0.1374, siendo el grupo 4 el más diferente al resto. Con estos resultados se obtuvo un dendrograma, Figura 27, en donde se aprecia la similitud entre los cuatro grupos.

Grupos	1	2	3	4
1	***	0.9700	0.9519	0.8769
2	0.0305	***	0.9386	0.9064
3	0.0493	0.0634	***	0.8716
4	0.1314	0.0982	0.1374	***

Cuadro 17 Identidad y distancia genética de Nei para los cuatro grupos de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999). Arriba de la diagonal está la Identidad genética de Nei, debajo de la diagonal está la Distancia genética de Nei. Cada grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 1 está formado por las comunidades: Cari, El Quetzal, Lorena, San Alfonso y Santa Rosa. El grupo 2 está formado por las comunidades: El Afán, Horizontes, Margaritas II y Santa Ana. El grupo 3 está formado por las comunidades: Carolina, El Peñón, Esija y Punto Chico. El grupo 4 está formado por las comunidades: Monterrey y Sonora.

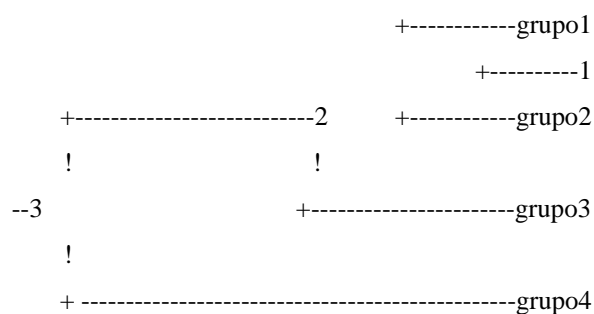


Figura 27. Dendrograma basado en la distancia genética de Nei para los grupos de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999). Cada grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 1 está formado por las comunidades: Cari, El Quetzal, Lorena, San Alfonso y Santa Rosa. El grupo 2 está formado por las comunidades: El Afán, Horizontes, Margaritas II y Santa Ana. El grupo 3 está formado por las comunidades: Carolina, El Peñón, Esija y Punto Chico. El grupo 4 está formado por las comunidades: Monterrey y Sonora.

En el dendrograma, Figura 27, se puede observar que los grupos o poblaciones 1 y 2 son los más parecidos y forman un grupo muy parecido al grupo o población 3. Mientras que el grupo 4, que es el que está más alejado geográficamente, es el que menos similitud tiene con los demás.

La asignación de estos grupos, es decir, la posible estructuración poblacional en Ixcán se estableció de manera arbitraria. Probablemente exista otra estructuración, y para verificar esta posible existencia se sugiere utilizar otro programa para comparar resultados.

Para establecer la diferenciación genética entre los cuatro grupos se calculó el índice de fijación total, F_{st} , y el flujo de genes, N_m , para cada locus, Cuadro 18. El índice de fijación F_{st} es un parámetro conveniente y ampliamente utilizado para medir el nivel de divergencia genética entre subpoblaciones ya que es la medida más inclusiva. El valor obtenido con los loci cae dentro del rango 0 – 0.05 que según Hartl and Clark, 1997, corresponden a una poca diferenciación genética. Estos resultados nos indican que las poblaciones son similares entre sí. Según Hartl and Clark, 1997, N_m se interpreta como el número absoluto de organismos que migran a cada subpoblación en cada generación. Se espera una diferenciación genética debido a un arrastre genético en loci que son neutros si $N_m < 1$ pero no si $N_m > 1$ (Slatkin M, 1987). De acuerdo a los resultados, 10 mosquitos en promedio migran cada generación, lo cual nos indica que los grupos no están aislados y que no existen barreras significativas para el flujo de genes en el municipio de Ixcán en esta escala microgeográfica. Lo anterior es consistente con lo encontrado al calcular la identidad y distancia de Nei entre los cuatro grupos establecidos. Con los análisis anteriores se descarta que en esta área se este dando el efecto Wahlund, ya que los mosquitos de los diferentes grupos sí se están mezclando.

Locus	F_{st}	N_m
NP113F	0.0183	13.4142
NP38F	0.0404	5.9393
Aa2-25	0.0107	23.0197
Promedio	0.0241	10.1238

Cuadro 18. Índice de fijación total y flujo de genes para los 4 grupos de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999)

Se construyeron gráficas con las frecuencias alélicas obtenidas con el programa GenAlEx, Figuras 28-30, para conocer cuales eran los alelos que se compartían entre los grupos debido al flujo de genes. En la Figura 28 se observa que los cuatro grupos o *clusters* comparten los alelos de 103 pb, 111 pb y 113 pb. Los alelos de 119pb y de 133 pb son alelos privados para el grupo 3, lo mismo con los alelos de 121 pb y 125 pb para el grupo 1.

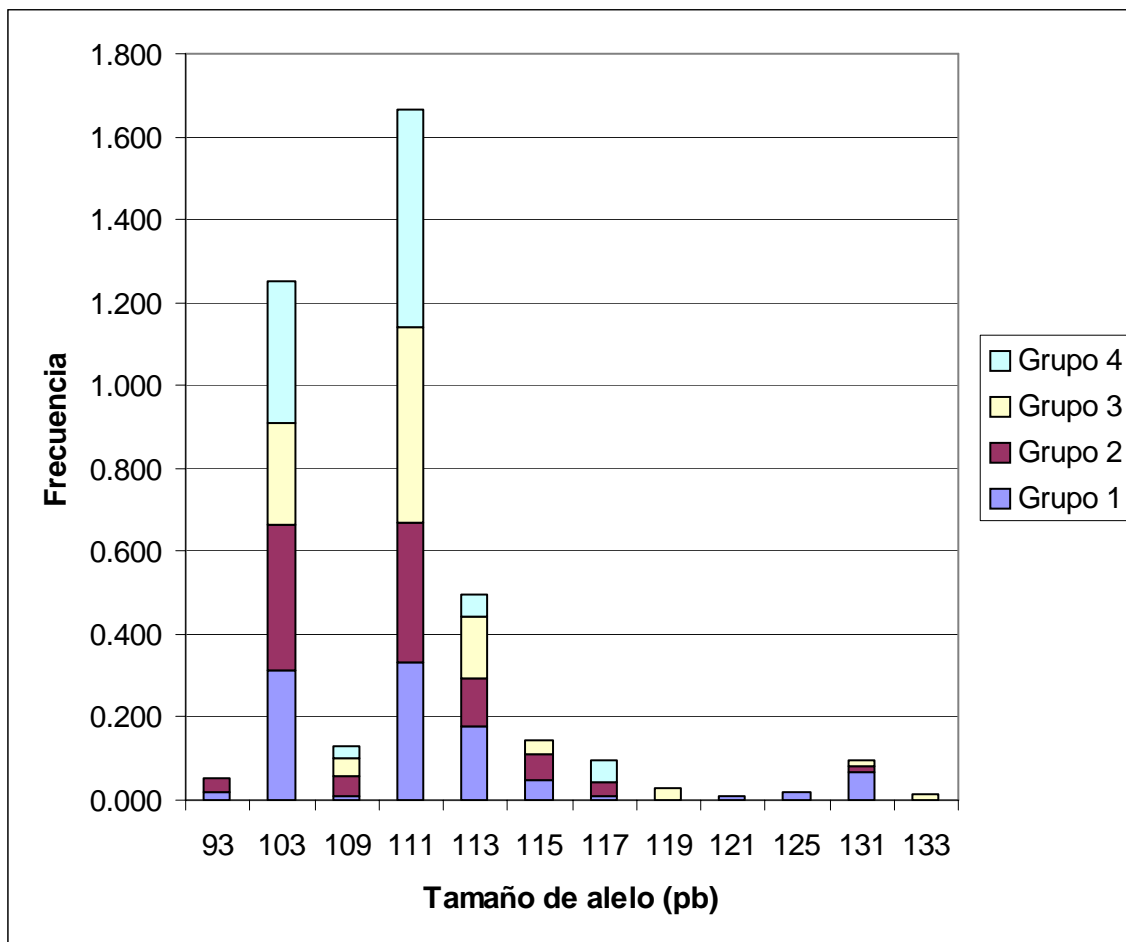


Figura 28. Frecuencia alélica en cada grupo de *Anopheles albimanus*, en el municipio de Ixcán, utilizando el locus NP113F. Cada grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 1 está formado por las comunidades: Cari, El Quetzal, Lorena, San Alfonso y Santa Rosa. El grupo 2 está formado por las comunidades: El Afán, Horizontes, Margaritas II y Santa Ana. El grupo 3 está formado por las comunidades: Carolina, El Peñón, Esija y Punto Chico. El grupo 4 está formado por las comunidades: Monterrey y Sonora.

En la Figura 29 se observa que los cuatro grupos o *clusters* comparten cinco alelos (120 pb, 124 pb, 126 pb, 130 pb y 132 pb). También se observa que hay alelos privados para cada grupo: 116pb para el grupo 1; 94 pb y 144 pb para el grupo 2; 138 pb para el grupo 3; y 104 pb y 168 pb grupo 4.

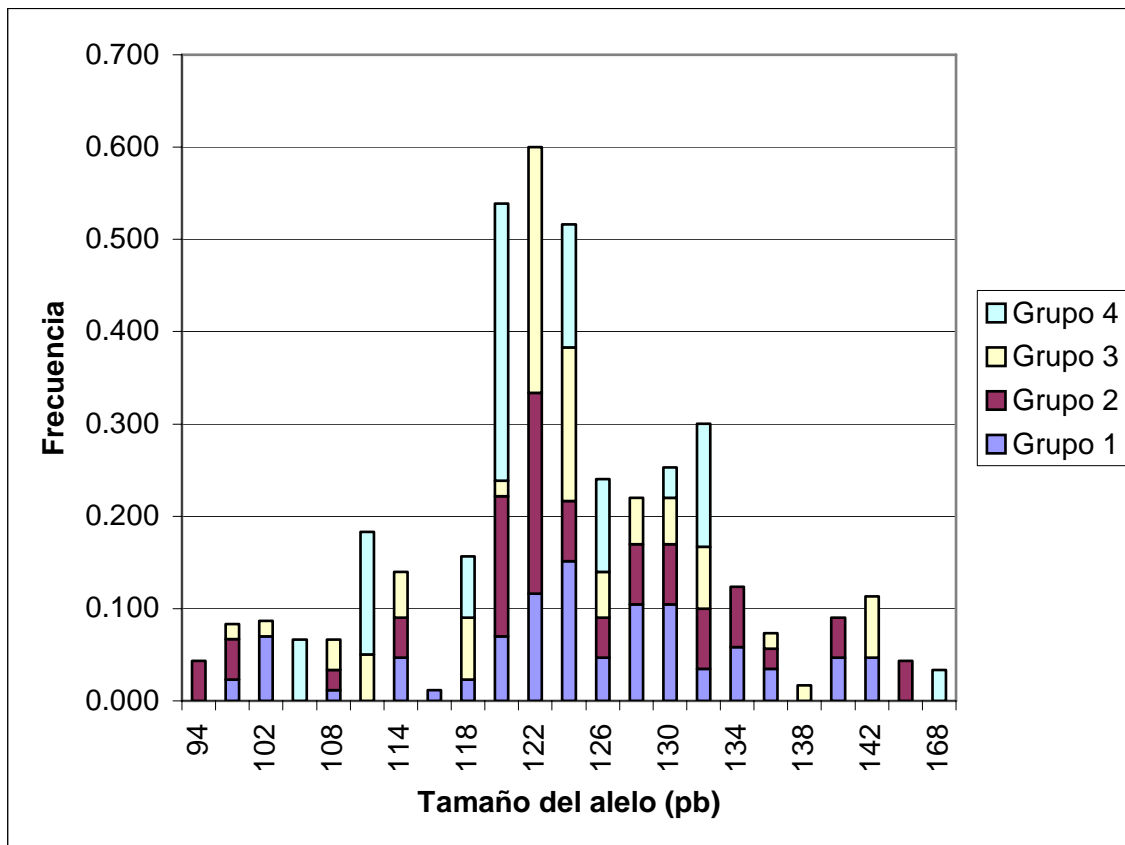


Figura 29. Frecuencia alélica en cada grupo de *Anopheles albimanus*, en el municipio de Ixcán, utilizando el locus NP38F. Cada grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 1 está formado por las comunidades: Cari, El Quetzal, Lorena, San Alfonso y Santa Rosa. El grupo 2 está formado por las comunidades: El Afán, Horizontes, Margaritas II y Santa Ana. El grupo 3 está formado por las comunidades: Carolina, El Peñón, Esija y Punto Chico. El grupo 4 está formado por las comunidades: Monterrey y Sonora.

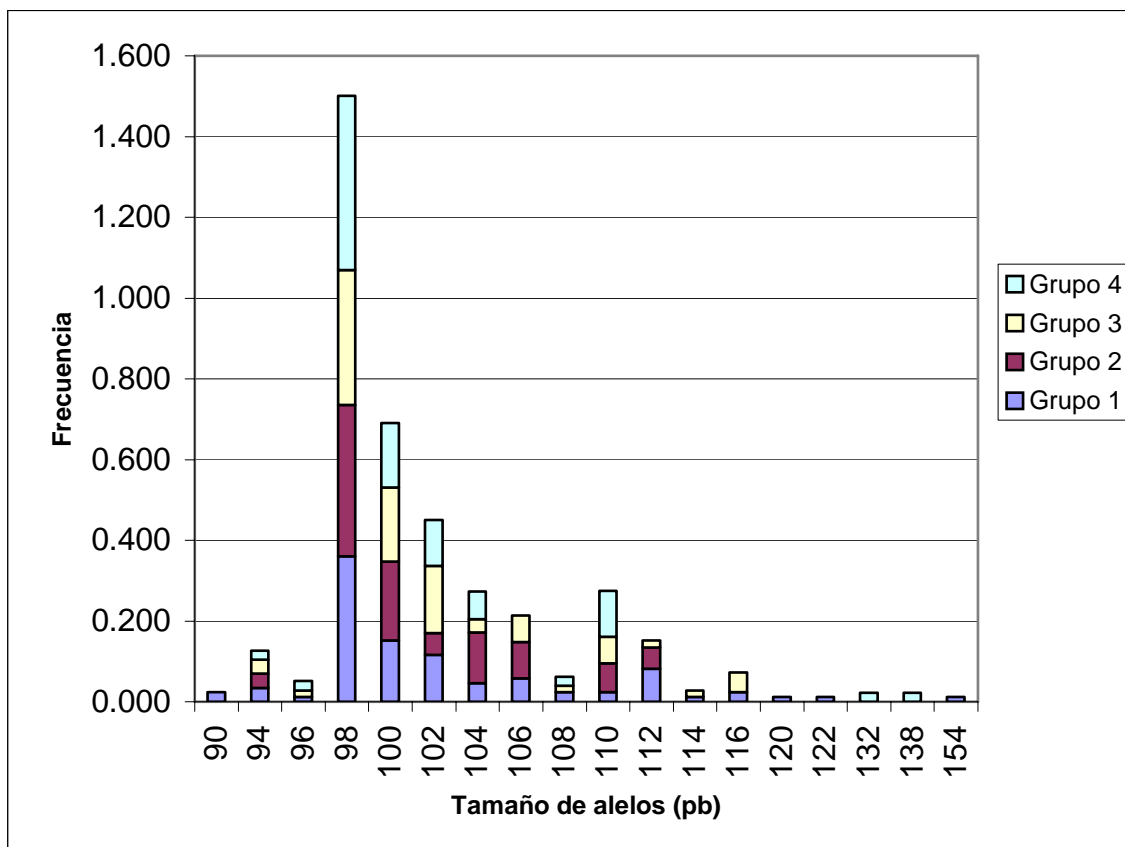


Figura 30. Frecuencia alélica en cada grupo de *Anopheles albimanus*, en el municipio de Ixcán, utilizando el locus Aa2-25. Cada grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 1 está formado por las comunidades: Cari, El Quetzal, Lorena, San Alfonso y Santa Rosa. El grupo 2 está formado por las comunidades: El Afán, Horizontes, Margaritas II y Santa Ana. El grupo 3 está formado por las comunidades: Carolina, El Peñón, Esija y Punto Chico. El grupo 4 está formado por las comunidades: Monterrey y Sonora.

En la Figura 30 se observa que los cuatro grupos o *clusters* comparten 6 alelos (94 pb, 98 pb, 100 pb, 102 pb, 104 pb y 110). También se observa que hay alelos privados para cada grupo: 4 alelos para el grupo 1 (94 pb, 120 pb, 122 pb y 154 pb); 1 alelo para el grupo 2 (114 pb); y 2 alelos para el grupo 4 (132 pb y 138 pb).

3. Diversidad genética dentro de cada grupo. Se ha sugerido que los miembros de una especie pueden no estar distribuidos homogéneamente porque, comúnmente, los hábitats naturales son desiguales con áreas favorables mezcladas con no favorables, por ejemplo en un bosque existen áreas sombreadas y soleadas (Hartl and Clark, 1997). En la sección anterior se encontró que no

existe diferenciación genética entre grupos. Para conocer si dentro de cada grupo existe diferenciación genética o subpoblaciones, se analizó la diversidad genética entre cada comunidad dentro de cada grupo o *cluster*.

a. **Diversidad genética dentro del grupo 1.** Al hacer el análisis dentro de cada grupo hay que tomar en cuenta que el tamaño de la muestra por cada comunidad es pequeño, en general menor de 20, lo que puede afectar los resultados. Dentro del grupo 1, Cuadro 18, se observa que con el locus NP38F fue con el que mayor diversidad genética se encontró, lo que concuerda con el análisis tomando las muestras como una población y entre grupos. Los resultados de N_e sugieren menor polimorfismo a este nivel que al comparar los grupos. Se observa una deficiencia de heterocigotos, $H_o < H_e$, con los loci NP38F y NP113F. Mientras menor sea el tamaño de la población, N , más rápido disminuye la heterocigosidad. Esta disminución o pérdida de heterocigosidad es debido a un aumento en la frecuencia de un alelo, que va en camino a ser fijado. La probabilidad de que un alelo se fije es igual a su frecuencia. El tiempo depende del tamaño de la población. Con el locus Aa2-25 se observa un exceso de heterocigotos, $H_o > H_e$, lo cual puede estar influenciado por el poco número de muestras que amplificaron con este locus. Los valores negativos de F para el locus Aa2-25 indican exceso de heterocigotos, el cual se puede estar dando por apareamiento asortativo, selección o simplemente por alelos nulos que no fueron detectados siendo la última opción la más probable.

NP113F								
Comunidad	Muestra†	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
Cari	2	2	2	2.000	0.500	0.000	0.500	1.000
El Quetzal	22	22	5	2.495	0.477	0.273	0.599	0.545
Lorena	6	4	5	4.571	0.250	0.500	0.781	0.360
San Alfonso	16	14	7	4.000	0.393	0.429	0.750	0.429
Santa Rosa	13	11	5	3.143	0.455	0.182	0.682	0.733
NP38F								
Comunidad	Muestra†	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
Cari	2	2	3	2.667	0.500	0.500	0.625	0.200
El Quetzal	22	17	13	9.966	0.176	0.706	0.900	0.215
Lorena	6	5	5	3.125	0.500	0.400	0.680	0.412
San Alfonso	16	12	10	7.784	0.167	0.583	0.872	0.331
Santa Rosa	13	7	9	6.533	0.286	0.571	0.847	0.325

Aa2-25								
Comunidad	Muestra†	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
Cari	2	2	3	2.667	0.500	1.000	0.625	-0.600
El Quetzal	22	15	12	7.500	0.233	1.000	0.867	-0.154
Lorena	6	3	5	4.500	0.333	1.000	0.778	-0.286
San Alfonso	16	5	7	5.556	0.300	1.000	0.820	-0.220
Santa Rosa	13	4	6	4.571	0.375	1.000	0.781	-0.280

* Se refiere a la frecuencia del alelo predominante † Se refiere al tamaño de la muestra

N: número de individuos que amplificaron con cada locus, Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados, F: índice de fijación.

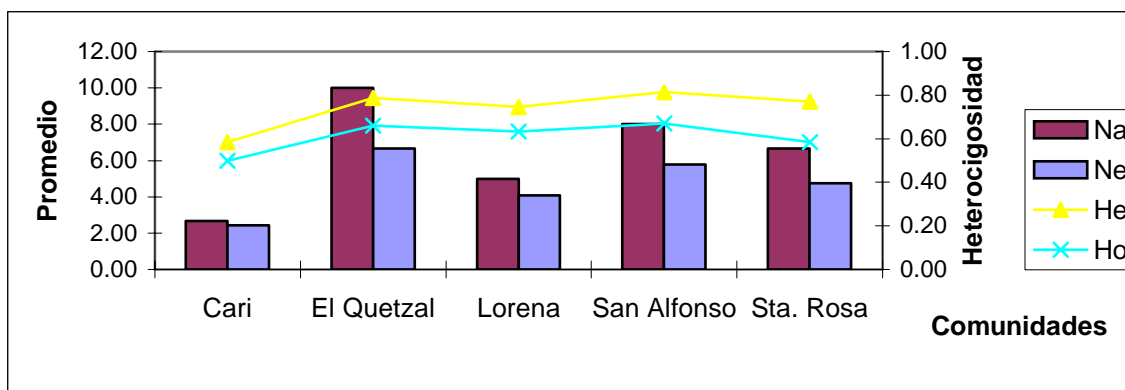
Cuadro 19. Diversidad genética para cada locus dentro del grupo 1 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002)

Se calcularon los datos promedios para cada grupo con cada locus (Cuadro 20, Figura 31). Con estos resultados se observó que en El Quetzal se detectó el mayor número de alelos, probablemente porque era el grupo que mayor número de muestras tenía (22 mosquitos), contrario a Cari (2 mosquitos). Lo anterior sugiere que el tamaño de la muestra está relacionado con el número de alelos detectados. Con el valor de Ne se observa que la comunidad El Quetzal es la comunidad más polimórfica.

Comunidad	Na	Error estándar	Ne	Error estándar	Ho	He	Error estándar
Cari	2.67	0.33	2.44	0.22	0.50	0.58	0.04
El Quetzal	10.00	2.52	6.65	2.20	0.66	0.79	0.10
Lorena	5.00	0.00	4.07	0.47	0.63	0.75	0.03
San Alfonso	8.00	1.00	5.78	1.10	0.67	0.81	0.04
Santa Rosa	6.67	1.20	4.75	0.98	0.58	0.77	0.05

Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados

Cuadro 20. Datos promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 1 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002)



Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados

Figura 31. Patrón alélico promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 1 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002). Un grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 1 está formado por las comunidades: Cari, El Quetzal, Lorena, San Alfonso y Santa Rosa. En la Figura las abreviaciones tienen el siguiente significado: Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados

Se observa que hay una deficiencia de heterocigotos, Figura 31, en todas las comunidades excepto Cari. Al comparar los resultados de la Figura 31 y Cuadro 21, se sugiere que únicamente Cari y Lorena están en equilibrio Hardy-Weinberg, lo cual puede estar influenciado por el poco número de muestras analizadas y no ser real. Estos resultados concuerdan con los del Cuadro 16 para el grupo 1.

Microsatélites			
Valores de P en la prueba de χ^2			
Comunidad	NP113F	NP38F	Aa2-25
Cari	0.045500	0.261464	0.261464
El Quetzal	0.023655	0.000000	0.000000
Lorena	0.074364	0.048580	0.048580
San Alfonso	0.000006	0.000042	0.000042
Santa Rosa	0.002363	0.029346	0.029346

Cuadro 21. Análisis de Hardy-Weinberg con cada uno de los microsatélites dentro del grupo 1 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999)

Se sugiere que dentro del grupo 1 existe una diferenciación genética moderada, F_{st} promedio menor de 0.15 (Cuadro 22), por lo que dentro de este grupo existe alguna barrera que impide el flujo de genes.

Locus	Fst	Nm
NP113F	0.1418	1.5126
NP38F	0.1333	1.6259
Aa2-25	0.1333	1.6259
Promedio	0.1358	1.5914

Cuadro 22. Índice de fijación total y flujo de genes para cada uno de los microsatélites dentro del grupo 1 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999)

Un grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 1 está formado por las comunidades: Cari, El Quetzal, Lorena, San Alfonso y Santa Rosa.

b. **Diversidad genética dentro del grupo 2.** Dentro del grupo 2, (Cuadro 23), se observa que con el locus NP38F fue con el que mayor diversidad genética se encontró, lo que concuerda con los análisis anteriores. Los resultados de N_e sugieren que la comunidad Margaritas 2 es la más polimórfica.

NP113F								
Comunidad	Muestra†	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
El Afán	8	5	3	1.852	0.700	0.200	0.460	0.565
Horizontes	10	6	4	3.130	0.417	0.500	0.681	0.265
Margaritas 2	14	13	5	2.704	0.538	0.308	0.630	0.512
Santa Ana	8	7	7	4.900	0.286	0.286	0.796	0.641
NP38F								
Comunidad	Muestra†	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
El Afán	8	6	8	7.200	0.167	0.333	0.861	0.613
Horizontes	10	5	6	4.167	0.400	0.400	0.760	0.474
Margaritas 2	14	10	9	7.143	0.200	0.600	0.860	0.302
Santa Ana	8	2	2	2.000	0.500	0.000	0.500	1.000

Aa2-25								
Comunidad	Muestra†	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
El Afán	8	2	3	2.667	0.500	1.000	0.625	-0.600
Horizontes	10	6	6	4.800	0.333	1.000	0.792	-0.263
Margaritas 2	14	9	7	5.226	0.333	1.000	0.809	-0.237
Santa Ana	8	3	4	3.000	0.500	1.000	0.667	-0.500

* Se refiere a la frecuencia del alelo predominante † Se refiere al tamaño de la muestra

N: número de individuos que amplificaron con cada locus, Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados, F: índice de fijación.

Cuadro 23. Diversidad genética para cada locus dentro del grupo 2 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002)

Al igual que dentro del grupo 1, se observa una deficiencia de heterocigotos con los loci NP113F y NP38F, y un exceso de heterocigotos con el locus Aa2-25, Cuadro 23. Lo anterior puede estar influenciado con el poco número de muestras que amplificaron con Aa2-25, lo cual puede ser también una explicación para los valores negativos de F.

Se calcularon los datos promedios para cada grupo con cada locus (Cuadro 24, Figura 32). Con estos resultados se observó que en Margaritas II se detectó el mayor número de alelos, probablemente porque era el grupo que mayor número de muestras tenía (14 mosquitos), lo cual corrobora que el tamaño de la muestra está relacionado con el número de alelos detectados.

Comunidad	Na	Error estándar	Ne	Error estándar	Ho	He	Error estándar
El Afán	4.67	1.67	3.91	1.66	0.51	0.65	0.12
Horizontes	5.33	0.67	4.03	0.49	0.63	0.74	0.03
Margaritas 2	7.00	1.15	5.02	1.29	0.64	0.77	0.07
Santa Ana	4.33	1.45	3.30	0.85	0.43	0.65	0.09

Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados

Cuadro 24. Datos promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 2 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002)

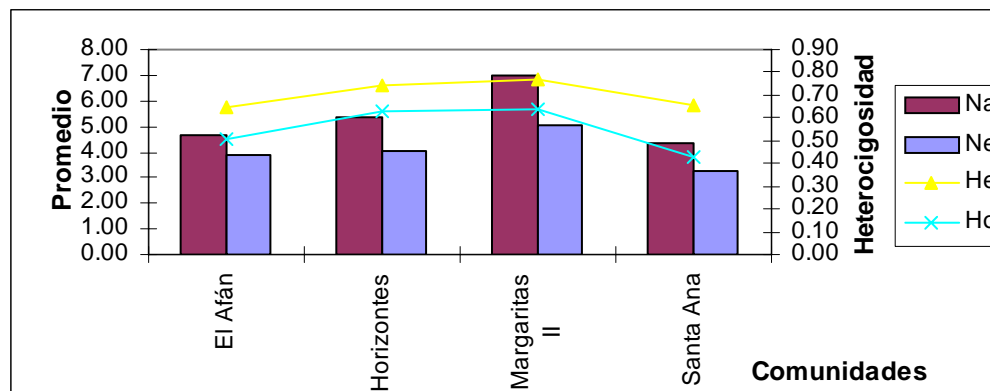


Figura 32. Patrón alélico promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 2 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002). Un grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 2 está formado por las comunidades: El Afán, Horizontes, Margaritas II y Santa Ana. En la Figura las abreviaciones tienen el siguiente significado: Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados

En todas las comunidades se observa una pequeña deficiencia de heterocigotos. Al comparar los resultados de la Figura 32 con el Cuadro 24 se concluye que las comunidades dentro del grupo 2 están en equilibrio Hardy-Weinberg lo cual concuerda con el resultado para el locus Aa2-25, Cuadro 15.

Microsatélites			
Valores de P en la prueba de χ^2			
Comunidad	NP113F	NP38F	Aa2-25
El Afán	0.027451	0.000407	0.074099
Horizontes	0.171712	0.021569	0.870891
Margaritas II	0.042947	0.019078	0.781813
Santa Ana	0.000451	0.045500	0.070366

Cuadro 25. Análisis de Hardy-Weinberg con cada uno de los microsatélites dentro del grupo 2 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999)

Se sugiere que existe una diferenciación genética moderada dentro del grupo 2, F_{st} promedio menor de 0.15 (Cuadro 26) por lo que al igual que dentro del grupo 1, debe existir alguna barrera para el flujo de genes en esta escala pero no entre el grupo 1 y 2.

Locus	Fst	Nm
NP113F	0.1208	1.8199
NP38F	0.1588	1.3240
Aa2-25	0.0262	9.2781
Promedio	0.1041	2.1510

Cuadro 26. Índice de fijación total y flujo de genes para cada uno de los microsatélites dentro del grupo 2 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999)

Un grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 2 está formado por las comunidades: El Afán, Horizontes, Margaritas II y Santa Ana.

c. **Diversidad genética dentro del grupo 3.** Al igual que dentro y en los grupos 1 y 2 se observa que con el locus NP38F fue con el que mayor diversidad genética se encontró, Cuadro 27. Los resultados de N_e sugieren que la comunidad de Punto Chico es la más polimórfica dentro de este grupo. Con el locus Aa2-25 se observa un exceso de heterocigotos observados que junto con los valores negativos de F se pueden deber a alelos nulos, ya que con este locus fue con el que menor número de muestras amplificaron.

NP113F								
Comunidad	Muestra†	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
Carolina	9	9	3	1.976	0.667	0.000	0.494	1.000
El Peñón	13	11	5	3.507	0.409	0.455	0.715	0.364
Esija	3	2	2	1.600	0.750	0.500	0.375	-0.333
Punto Chico	15	11	5	3.063	0.455	0.091	0.674	0.865
NP38F								
Comunidad	Muestra†	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
Carolina	9	7	7	4.900	0.357	0.857	0.796	-0.077
El Peñón	13	8	9	7.111	0.250	0.500	0.859	0.418
Esija	3	3	4	3.000	0.500	0.667	0.667	0.000
Punto Chico	15	12	13	4.234	0.458	0.583	0.764	0.236

Aa2-25								
Comunidad	Muestra†	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
Carolina	9	4	6	5.333	0.250	1.000	0.813	-0.231
El Peñón	13	8	7	4.571	0.375	1.000	0.781	-0.280
Esija	3	3	5	4.500	0.333	1.000	0.778	-0.286
Punto Chico	15	3	6	6.000	0.167	1.000	0.833	-0.200

* Se refiere a la frecuencia del alelo predominante † Se refiere al tamaño de la muestra

N: número de individuos que amplificaron con cada locus, Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados, F: índice de fijación.

Cuadro 27. Diversidad genética para cada locus dentro del grupo 3 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002)

Se calcularon los datos promedios para cada grupo con cada locus (Cuadro 28, Figura 33). Como se mencionó anteriormente el tamaño de la muestra está relacionado con el número de alelos detectados, por lo que en Punto Chico se detectó el mayor número de alelos. Se observa que en Esija hay exceso de heterocigotos lo cual se puede deber al pequeño tamaño de la muestra.

Comunidad	Na	Error estándar	Ne	Error estándar	Ho	He	Error estándar
Carolina	5.33	1.20	4.07	1.05	0.62	0.70	0.10
El Peñón	7.00	1.15	5.06	1.07	0.65	0.79	0.04
Esija	3.67	0.88	3.03	0.84	0.72	0.61	0.12
Punto Chico	8.00	2.52	4.43	0.85	0.56	0.76	0.05

N: número de individuos que amplificaron con cada locus, Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados

Cuadro 28. Datos promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 3 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002)

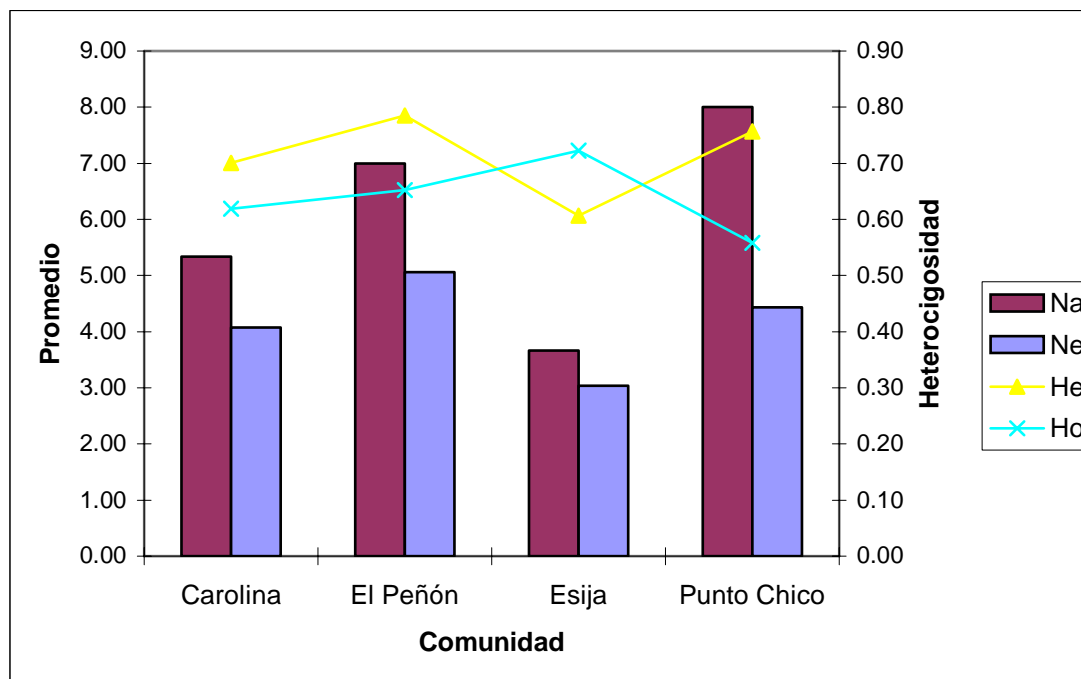


Figura 33. Patrón alélico promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 3 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002). Un grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 3 está formado por las comunidades: Carolina, El Peñón, Esija y Punto Chico. En la Figura las abreviaciones tienen el siguiente significado: Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados

La deficiencia de heterocigotos en Carolina y El Peñón no es muy significativa por lo que estas dos comunidades están en equilibrio Hardy-Weinberg, Cuadro 29. Esija parece estar también en equilibrio, pero por lo reducido del tamaño de muestra no se puede aseverar. A pesar que dos de las subpoblaciones dentro del grupo 3 están en equilibrio, el grupo 3 como un todo no lo está. La razón de la desviación del equilibrio en la población como un todo, es que la frecuencia alélica en las subpoblaciones es diferente por lo que el apareamiento al azar dentro de cada subpoblación no es equivalente al apareamiento al azar de todos los organismos en la población entera (Hartl and Clark, 1997).

Microsatélites			
Valores de P en la prueba de χ^2			
Comunidad	NP113F	NP38F	Aa2-25
Carolina	0.000003	0.058550	0.369973
El Peñón	0.051285	0.004521	0.977682
Esija	1.000000	0.501825	0.725445
Punto Chico	0.000000	0.003434	0.000199

Cuadro 29. Análisis de Hardy-Weinberg con cada uno de los microsatélites dentro del grupo 3 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999)

Al igual que dentro de los otros dos grupos, se sugiere que dentro del grupo 3 la diferenciación genética es moderada, F_{st} promedio menor de 0.15 (Cuadro 30), y que hay menor flujo de genes, N_m promedio = 2, dentro del grupo 3 que entre éste y los otros grupos.

Locus	F_{st}	N_m
NP113F	0.1421	1.5099
NP38F	0.1074	2.0787
Aa2-25	0.0824	2.7854
Promedio	0.1089	2.0451

Cuadro 30. Índice de fijación total y flujo de genes para cada uno de los microsatélites dentro del grupo 3 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999)

Un grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 3 está formado por las comunidades: Carolina, El Peñón, Esija y Punto Chico.

d. **Diversidad genética dentro del grupo 4.** Al igual que entre los cuatro grupos y dentro de los otros tres grupos se obtuvo mayor diversidad genética con el locus NP38F. Se observa un exceso de heterocigotos con el locus Aa2-25 y en Monterrey con el locus NP113F lo cual puede deberse al número de alelos nulos. Dentro de cada grupo se ha observado que la frecuencia del alelo predominante es menor a 0.95, lo cual según Hartl and Clark, 1997, con un tamaño de muestra menor a 100 indica que los loci son polimórficos.

NP113F								
Comunidad	Muestra†	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
Monterrey	9	5	5	2.500	0.600	0.800	0.600	-0.333
Sonora	15	14	4	2.292	0.500	0.143	0.564	0.747
NP38F								
Comunidad	Muestra†	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
Monterrey	9	7	7	5.444	0.286	0.429	0.816	0.475
Sonora	15	8	6	3.879	0.438	0.250	0.742	0.663
Aa2-25								
Comunidad	Muestra†	N	Na	Ne	Frecuencia*	Ho	He	F
Monterrey	9	5	6	5.000	0.300	1.000	0.800	-0.250
Sonora	15	10	9	6.897	0.200	1.000	0.855	-0.170

* Se refiere a la frecuencia del alelo predominante † Se refiere al tamaño de la muestra

N: número de individuos que amplificaron con cada locus, Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados, F: índice de fijación.

Cuadro 31. Diversidad genética para cada locus dentro del grupo 4 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002)

Se calcularon los datos promedios para cada grupo con cada locus (Cuadro 32, Figura 34). Con los resultados se vuelve a verificar que el tamaño de la muestra está relacionado con el número de alelos detectados. Al comparar los valores de Ne entre las dos comunidades, se observa que ambos tienen el mismo grado de polimorfismo.

Comunidad	Na	Error estándar	Ne	Error estándar	Ho	He	Error estándar
Monterrey	6.00	0.58	4.31	0.92	0.74	0.74	0.07
Sonora	6.33	1.45	4.36	1.35	0.46	0.72	0.08

Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigotos observados, He: heterocigotos esperados

Cuadro 32. Datos promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 4 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002)

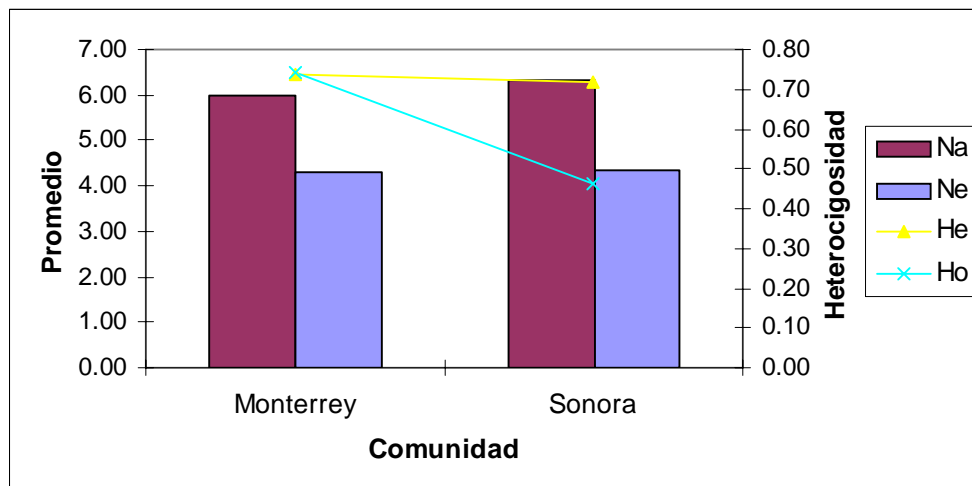


Figura 34. Patrón alélico promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 3 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002). Un grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 4 está formado por las comunidades: Monterrey y Sonora. En la Figura las abreviaciones tienen el siguiente significado: Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, Ho: heterocigositos observados, He: heterocigositos esperados

En Monterrey no hay deficiencia de heterocigositos mientras que en Sonora sí hay, Figura 34. Ambas comunidades están en equilibrio Hardy-Weinberg, Cuadro 33, y al ser comparado el grupo como un todo también está en equilibrio, Cuadro 15.

Microsatélites			
Valores de P en la prueba de χ^2			
Comunidad	NP113F	NP38F	Aa2-25
Monterrey	0.998589	0.020053	0.285288
Sonora	0.018288	0.000006	0.672484

Cuadro 33. Análisis de Hardy-Weinberg con cada uno de los microsatélites dentro del grupo 4 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999)

Se sugiere que dentro del grupo 4 la diferenciación genética es moderada, F_{st} promedio menor de 0.15 (Cuadro 34), aunque menor que dentro de los otros tres grupos ya que el flujo de genes es mayor dentro de éste grupo, N_m promedio = 4 (Cuadro 34).

Locus	Fst	Nm
NP113F	0.0553	4.2714
NP38F	0.0704	3.3001
Aa2-25	0.0400	5.9940
Promedio	0.0558	4.2300

Cuadro 34. Índice de fijación total y flujo de genes para cada uno de los microsatélites dentro del grupo 4 de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999)

Un grupo está definido como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. El grupo 4 está formado por las comunidades: Monterrey y Sonora.