

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE  
*Anopheles albimanus* DE AMÉRICA LATINA, MEDIANTE EL USO DE  
SECUENCIAS MICROSATÉLITES COMO MARCADORES MOLECULARES

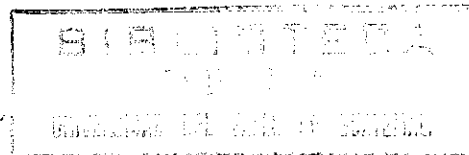
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica

Estudio de la variabilidad genética de poblaciones de *Anopheles albimanus* de América Latina, mediante el uso de secuencias microsatélites como marcadores moleculares

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



Guatemala

2001

Vo.Bo.



(f)

Dr. Alvaro Molina Cruz  
Asesor


Tribunal:



(f)

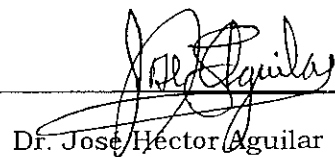
Dr. Alvaro Molina Cruz

(f)



Licda. Ana María Peralta de Mérida

(f)



Dr. José Héctor Aguilar

Fecha de aprobación: 13 de septiembre de 2001

## CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE GRÁFICAS	x
RESUMEN	xii
Capítulos	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTEDECENTES	3
A. La Malaria	3
1. Parásito causante	3
2. Diagnóstico, sintomatología y tratamiento	5
3. Distribución e incidencia	6
4. Vector	8
B. Vectores de Malaria	9
1. Generalidades	9
2. Distribución geográfica	11
3. Fluctuación temporal de la densidad	13
4. Genética de insectos	13
C. Genética de poblaciones	14
1. Poblaciones naturales	17
2. Variación genética	17
a. Equilibrio de Hardy-Weinberg y los factores que afectan la variación	17
b. Métodos utilizados para el estudio de variaciones genéticas	19
c. Microsatélites	20
d. Cómo medir la variación genética entre poblaciones	23
D. Estudios de genética de poblaciones del mosquito <i>Anopheles albimanus</i> realizados en Guatemala y América Latina	26
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	27
A. Objetivos generales	27
B. Objetivos específicos	27

C. Hipótesis	27
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	28
A. Métodos	28
1. Extracción de ADN	28
2. Reconstitución de ADN	28
3. Amplificación del ADN	31
4. Electroforesis en gel de agarosa	32
5. Electroforesis en gel de secuenciación	32
B. Materiales	37
1. Materiales y equipo	37
2. Reactivos	37
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
A. Estandarización de la metodología	39
B. Frecuencias alélicas por población de los individuos estudiados	45
C. Análisis estadístico	85
VI. CONCLUSIONES	103
VII. RECOMENDACIONES	105
VIII. LITERATURA CITADA	106
IX. ANEXOS	109

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Investigación epidemiológica de 21 países con programas de malaria activos, 1994	8
2	Distribución geográfica de las principales especies de <i>Anopheles</i> vectores de malaria	12
3	Características de los marcadores moleculares más utilizados en biología de poblaciones	20
4	Región de colección y número de individuos según la colecta	31
5	Programa BLACK para el termociclador	32
6	Tiempos de corrida para cada microsatélite	34
7	Marcadores de tamaño utilizados para cada microsatélite	35
8	Iniciadores usados para la reacción de PCR	38
9	Región de cada sitio de colecta, fecha de colección, número de individuos por microsatélite positivos para PCR y a los que fue posible determinarles el genotipo y tamaño de los alelos	47
10	Alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90	50
11	Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90	53
12	Alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14	59
13	Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14	61
14	Alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-25	69
15	Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-25	71
16	Alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41	78
17	Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41	79
18	Análisis de Hardy-Weinberg para las poblaciones estudiadas con cada uno de los microsatélites	86

19	Equilibrio de ligamiento de los loci por parejas de las poblaciones estudiadas	88
20	Equilibrio de ligamiento de los loci por parejas para los países estudiados	88
21	Distribución de los grupos analizados por AMOVA	89
22	Análisis de AMOVA, para todas las poblaciones con los cuatro microsatélites	90
23	Índices de fijación de Wright	90
24	Matriz para los valores $F_{st}$ de todas las poblaciones estimadas por parejas	92
25	Valores de P para los $F_{st}$ obtenidos del cuadro 24	93
26	Matriz de significancia de los valores P de $F_{st}$	95
27	Análisis de Mantel, correlación entre la distancia geográfica (en km) y la distancia genética según $F_{st}/(1-F_{st})$ entre las poblaciones estudiadas	99
28	Matriz de valores de Migrantes donde $M=2Nm$	101
29	Composición alélica para las poblaciones de Bananito y Batán	109
30	Composición alélica para la población de San Alfredo	111
31	Composición alélica para las poblaciones de San Diego y Santa Lucía	113
32	Composición alélica para las poblaciones de Champona y El Mango	115
33	Composición alélica para las poblaciones de Cuto y El Motor	116
34	Composición alélica para las poblaciones de Lauro 27/3/1996 y Lauro 7/6/1995	118
35	Composición alélica para las poblaciones de Nahuá y Ruperto 27/3/1996	119
36	Composición alélica para las poblaciones de Ruperto 4/10/1995 y Puente Blanco	120
37	Composición alélica para las poblaciones de San Luis Petén y San Luis Petén Buenaventura	122
38	Composición alélica para la población de Tallado	123

39	Composición alélica para las poblaciones de Cosalapa y Nueva Independencia	124
40	Composición alélica para la población de Zapata	126
41	Composición alélica para las poblaciones de Corral 1 y Corral 2	128
42	Composición alélica para la población de Corral 3	130
43	Individuos utilizados como estándares internos para el locus 1-90	133
44	Individuos utilizados como estándares internos para el locus 2-14	133
45	Individuos utilizados como estándares internos para el locus 2-25	134
46	Individuos utilizados como estándares internos para el locus 6-41	134
47	Matriz de $F_{st}$ linearizado con la transformación de Slatkin, según $t/M = F_{st}/(1 - F_{st})$ donde $M = 2Nm$	135
48	Matriz de la distancia en km entre parejas de localidades de las poblaciones estudiadas	136

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida del <i>Plasmodium vivax</i>	4
2	Mapa de distribución mundial de la malaria, para 1987, según la Organización Mundial de la Salud	7
3	Vista dorsal de un mosquito hembra adulto	10
4	Regiones de distribución de <i>Anopheles</i>	13
5	Sitios de recolección de <i>Anopheles albimanus</i> para el estudio	29
6	Sitios de colecta en México, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica	30
7	Electroforesis de secuenciación para Cosalapa con el microsatélite 4-54	41
8	Electroforesis de secuenciación para Cosalapa con el microsatélite 4-54 con temperatura de hibridización 57°C	42
9	Electroforesis de secuenciación para Santa Lucía y San Alfredo con el microsatélite 2-25	43
10	Electroforesis de secuenciación para la población Corral 1 con los microsatélites 2-14 y 2-25	44
11	Dendrograma realizado a partir de un cluster análisis formulado con los valores de $F_{st}/(1-F_{st})$ con el programa Phylip (Felsenstein et al 2001)	97

## LISTA DE GRAFICAS

Gráfica		Página
1	Frecuencias obtenidas para todos los países con el microsatélite 1-90	54
2	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de México, microsatélite 1-90	55
3	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de Guatemala, microsatélite 1-90	55
4	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de El Salvador, microsatélite 1-90	56
5	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de Nicaragua, microsatélite 1-90	56
6	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de Costa Rica, microsatélite 1-90	57
7	Comparación de las frecuencias alélicas para los países México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica, microsatélite 1-90	58
8	Frecuencias obtenidas para todos los países con el microsatélite 2-14	63
9	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de México, microsatélite 2-14	64
10	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de Guatemala, microsatélite 2-14	64
11	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de El Salvador, microsatélite 2-14	65
12	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de Nicaragua, microsatélite 2-14	66
13	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de Costa Rica, microsatélite 2-14	66
14	Comparación de las frecuencias alélicas para los países México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica, microsatélite 2-14	67
15	Frecuencias obtenidas para todos los países con el microsatélite 2-25	73
16	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de México, microsatélite 2-25	74

17	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de Guatemala, microsatélite 2-25	74
18	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de El Salvador, microsatélite 2-25	75
19	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de Nicaragua, microsatélite 2-25	75
20	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de Costa Rica, microsatélite 1-90	76
21	Comparación de las frecuencias alélicas para los países México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica, microsatélite 2-25	77
22	Frecuencias obtenidas para todos los países con el microsatélite 6-41	80
23	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de México, microsatélite 6-41	81
24	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de Guatemala, microsatélite 6-41	82
25	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de El Salvador, microsatélite 6-41	82
26	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de Nicaragua, microsatélite 6-41	83
27	Comparación de las frecuencias alélicas para las poblaciones de Costa Rica, microsatélite 6-41	83
28	Comparación de las frecuencias alélicas para los países México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica, microsatélite 6-41	84
29	Análisis de Mantel, correlación entre la distancia geográfica (en km) y distancia genética según $F_{st}/(1-F_{st})$ entre las poblaciones estudiadas	99
30	Análisis de Mantel, correlación entre $\ln$ [distancia geográfica (en km)] y distancia genética según $F_{st}/(1-F_{st})$ entre las poblaciones estudiadas	99

## RESUMEN

El presente trabajo consiste en un estudio de genética de poblaciones del mosquito *Anopheles albimanus*, para los países de México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica. Se utilizaron cuatro secuencias microsatélites (1-90, 2-14, 2-25 y 6-41) distintas como marcadores moleculares, para comparar las estructuras genéticas entre las colectas o poblaciones de los distintos países, y determinar si existe una diferencia genética significativa entre ellas.

El ADN de los mosquitos se reconstituyó, ya que había sido utilizado para estudios anteriores, para amplificarlo por PCR para cada una de las secuencias microsatélites. El producto de la amplificación se corrió en electroforesis de secuenciación, se leyó el tamaño de los alelos para cada individuo y se determinó su genotipo. Estos datos fueron analizados con el uso de un programa de estadística para genética de poblaciones.

El primer análisis estadístico efectuado fue el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada una de las poblaciones con cada uno de los microsatélites. Los resultados de este análisis indicaron que la mayoría de poblaciones se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg. También se realizó el análisis de ligamiento por parejas de loci, tanto para las poblaciones individuales como para los países completos. Este análisis mostró que únicamente Nicaragua se encuentra fuera de equilibrio de ligamiento para la pareja de loci 1-90 y 2-14.

Al analizar las frecuencias alélicas obtenidas por población y por país se notó que Costa Rica presentaba varias diferencias en los patrones de frecuencias alélicas, comparado con México, Guatemala, El Salvador y Nicaragua. Por esta razón se decidió hacer el análisis de varianza molecular, AMOVA, al separar los cinco países en dos grupos, dejando a Costa Rica en un grupo aparte de los demás países. Los resultados del AMOVA mostraron que existe una diferencia genética moderada entre Costa Rica y la agrupación de México, Guatemala, El Salvador y Nicaragua. Esto quiere decir que

parece haber un buen flujo genético entre México, Guatemala, El Salvador y Nicaragua, pero no así con Costa Rica.

En relación con estudios anteriores de genética de poblaciones para *Anopheles albimanus* se puede decir que los resultados parecen ser muy consistentes, en especial con el estudio realizado por Mérida et al. (1999) al utilizar ADN mitocondrial como marcador molecular.

# I. INTRODUCCIÓN

El *Anopheles albimanus* es el principal vector de la malaria en Guatemala (Aguilar, 1997), una enfermedad que afecta al 40% de la población total en los más de 90 países afectados mundialmente (Organización Mundial de la Salud, 1998). La mortalidad de las infecciones por *Plasmodium vivax* es baja, sin embargo, estas infecciones son responsables de una alta morbilidad, ya que tiene un impacto económico y social de gran importancia (Padilla, 1997).

El mosquito *Anopheles albimanus* se extiende desde los Estados Unidos de América hasta Perú (PAHO, 1996), pero se encuentra principalmente desde la región sur de México hasta Perú en Sur América (AnoDB, 2000). Debido a que la transmisión del parásito causante de la malaria depende en gran parte del vector, el presente estudio se hizo para entender la genética de las poblaciones del mosquito *Acópeles albimanus* en la región. La genética de poblaciones genera información útil para comprender la transmisión de la enfermedad, su epidemiología y desarrollar métodos de control (Black y Tabachnick, 1995).

Anteriormente se realizó un estudio de genética de poblaciones para establecer la variabilidad temporal de poblaciones de *A. albimanus* en Guatemala, al utilizar espaciadores intergénicos (IGS) de ADN ribosomal, el cual mostró que existen barreras geográficas entre las regiones de la costa del Pacífico y la costa del Caribe de Guatemala (Ovalle, 1994). En un estudio posterior de poblaciones de *A. albimanus* se utilizó como marcador molecular el ADN mitocondrial de estos mosquitos, para poblaciones de Guatemala, El Salvador, México, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia y Venezuela. En este estudio no se notó una diferencia significativa en frecuencia para las costas del Pacífico y del Caribe de Guatemala, pero sí se encontró que para poblaciones separadas por más de 200km existe un aislamiento que está correlacionado con la distancia (Mérida et al. 1999). Los resultados derivados de este segundo estudio son solamente preliminares, ya que se contaba con un número limitado de muestras para las poblaciones fuera del territorio de Guatemala.

En seguimiento con esta línea de investigación, se realizó la presente tesis. Uno de los objetivos de este estudio es determinar la relación genética, es decir, el flujo genético existente entre poblaciones de Guatemala, México, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica, y buscar la existencia de barreras que pudieran interrumpir el flujo de genes entre

poblaciones de Latinoamérica. La forma en que se realizó el análisis fue por medio de la comparación de las frecuencias de alelos y genotipos de cuatro secuencias microsatélites para cada uno de los individuos que conforman las distintas poblaciones bajo estudio. Las principales características de los microsatélites que los hace útiles para estudios de genética de poblaciones son su alto polimorfismo, su capacidad de ser heredada de forma simple y la codominancia que presentan (Ashley y Dow, 1994). Las cuatro secuencias microsatélites estudiadas fueron identificadas como 1-90, 2-14, 2-25 y 6-41. El polimorfismo de los microsatélites presentados por los individuos en las distintas poblaciones se distinguió al utilizar electroforesis de acrilamida en cámaras de secuenciación.

Se encontró que existe flujo de genes entre las poblaciones de *A. albimanus* desde México hasta Costa Rica. Sin embargo, el flujo de genes es mejor en la región desde México hasta Nicaragua, y de esta región hacia Costa Rica se ve una pequeña disminución del flujo genético. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Mérida et al. (1999) con el ADN mitocondrial.

## II. ANTECEDENTES

### A. La Malaria

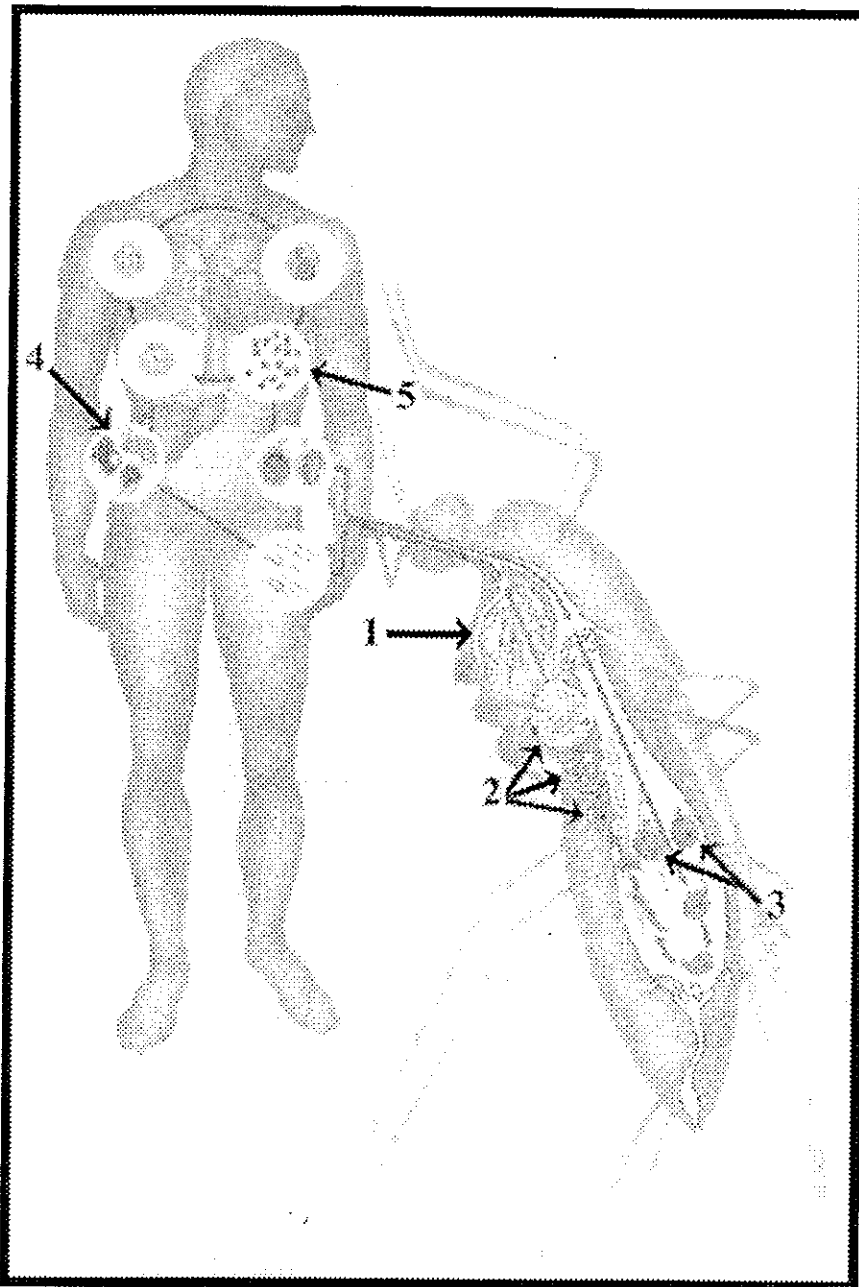
La malaria o paludismo es una enfermedad que ha afectado al hombre desde épocas muy remotas, caracterizándose por fiebres intermitentes (Aguilar, 1997). Esta enfermedad es causada por cuatro especies de protozoarios intracelulares del género *Plasmodium*; cada una de las cuales posee su propia morfología, biología y características clínicas. La malaria es transmitida por las hembras del mosquito *Anopheles* (Miller y Warrell, 1990).

#### 1. Parásito Causante

El ciclo de vida del parásito de la malaria (ver figura 1) comienza cuando un esporozoito entra al torrente sanguíneo humano por la picadura de un mosquito hembra infectado, del género *Anopheles*. Los esporozoitos migran rápidamente hacia las células hepáticas, donde sufren múltiples divisiones asexuales durante un período de 7 a 10 días. La ruptura de los hepatocitos lleva a la liberación de miles de merozoitos al torrente sanguíneo donde son capaces de invadir los eritrocitos. Dentro de los eritrocitos, los trofozoitos primarios se desarrollan a trofozoitos maduros con un citoplasma agrandado. El núcleo se divide asexualmente múltiples veces para producir un esquizonte multinucleado. Éste luego se divide y produce merozoitos mononucleados. Eventualmente el eritrocito se lisa liberando los merozoitos al torrente sanguíneo para infectar otros eritrocitos. Una fracción de los merozoitos sufre diferenciación sexual a gametocitos, los cuales se fertilizan y forman un cigoto luego de ser ingeridos por un mosquito (Rogers, 1999).

Los microgametocitos y macrogametocitos formados por los merozoitos no son capaces de lisar el eritrocito. Únicamente cuando son ingeridos por el mosquito se desarrollan a la formación de un gameto masculino y femenino, respectivamente. Dentro del intestino del mosquito los eritrocitos infectados se lisan y los gametos se fusionan para formar el cigoto llamado ooquineto. Éste migra hacia la pared del intestino, la penetra y forma el ooquiste en la superficie externa. El ooquiste sufre meiosis, durante un proceso conocido como esporogonia, formando esporozoitos que migran hacia las glándulas salivares del mosquito. El ciclo se completa finalmente cuando el mosquito pica un nuevo hospedero humano (Prescot *et al*, 1996).

Figura 1  
Ciclo de vida del *Plasmodium vivax*



1. Esporozoitos en las glándulas salivares
2. Ooquistes en la pared del estómago
3. Gametocitos femenino y masculino
4. Fase hepática
5. Liberación de merozoitos del hígado (estos entran en los eritrocitos donde continúan los ciclos sexual y asexual)

(RPH, 2000)

## 2. Diagnóstico, Sintomatología y Tratamiento

El diagnóstico clínico, en áreas endémicas de la enfermedad, puede ser caracterizado por los accesos agudos de “fríos y calenturas”. En el laboratorio se emplean métodos directos para demostrar la presencia de parásitos en un frote sanguíneo usando tinción con Giemsa, Field, Wright o Leishman. El momento más adecuado de la toma de muestra debe hacerse después del paroxismo febril. Además, existen métodos indirectos que utilizan la fijación del complemento, entre los cuales se pueden mencionar las técnicas de hemaglutinación indirecta (HIA), anticuerpos fluorescentes (AFT) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés) (Aguilar, 1997).

Los síntomas de la malaria incluyen fiebre, escalofríos, dolor en las articulaciones, vómitos repetidos, convulsión generalizada y coma. La causa atribuida a la muerte en regiones de alta transmisión de malaria es la anemia severa (Organización Mundial de la Salud, 1998). Los síntomas clásicos se desarrollan durante la liberación sincronizada de merozoitos al torrente sanguíneo. Al lisarse los eritrocitos se liberan toxinas y restos de eritrocitos, los cuales son la causa de escalofríos y fiebre, características de la malaria. Los síntomas clínicos se presentan primero como escalofríos y sensación de frío intensa; y luego se procede a una fase con cefalea, seguido de un período de fase febril, con rubefacción facial, piel seca y temperaturas que pueden alcanzar los 41°C, finalmente se da un período de sudoración, con descenso de la temperatura corporal, abatimiento y somnolencia (Sponsler, 2000).

Entre las drogas antimaláricas utilizadas se pueden mencionar seis grupos principales, los cuales actúan sobre las formas asexuales que previenen la esquizogonia eritrocítica:

- a) Alcaloides de la corteza de quina (quinina)
- b) Aminoacridina (atebrina)
- c) Aminoquinolina (cloroquina-amidiaquina)
- d) Aminoquinolina (primaquina), es el único que actúa sobre las formas exoeritrocíticas; representa la forma más tóxica
- e) Biguanida (cloroguanida)
- f) Pirimidina (pirimetamina) (Aguilar, 1997)

La cloroquina es el medicamento más utilizado en el tratamiento de la malaria por su disponibilidad y bajo precio; pero por esta misma razón actualmente se ha encontrado

resistencia del *Plasmodium falciparum* a la cloroquina en regiones de América del Sur y en el suroeste de Asia (Sponsler, 2000).

Para el tratamiento de personas infectadas con el agente *P. vivax*, se utiliza una combinación de cloroquina con primaquina. La primaquina, por ser eficaz contra las formas exoeritrocíticas, ha probado ser satisfactoria y la única droga que actúa sobre las formas latentes que se alojan en el hígado. En los últimos años se ha presentado resistencia a primaquina (Sponsler, 2000).

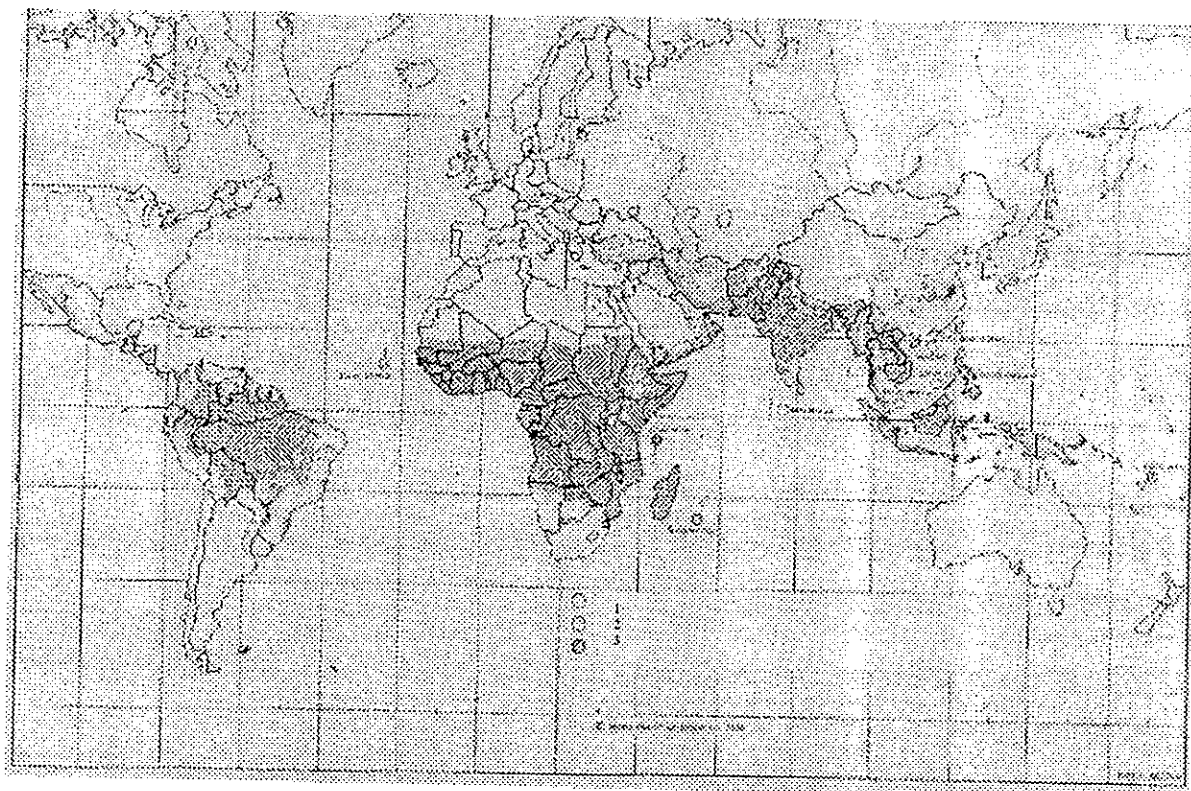
En Guatemala, y en otros países de Centro América, se utiliza principalmente una combinación de cloroquina con primaquina para tratar los casos de malaria. Esto debido a su seguridad y disponibilidad (Padilla, 1995).

### 3. Distribución e Incidencia

La malaria parece haberse originado en África, desde donde el *Plasmodium vivax* y el *Plasmodium malariae* fueron traídos al Nuevo Mundo por los primeros marineros que cruzaron el Pacífico. Este parásito es altamente específico para el hombre, ya que éste es su único hospedero vertebrado, y el mosquito *Anopheles* su único vector; mostrándose con esto una relación evolutiva con dichas especies (Bradley, 1996).

Hoy en día la malaria es la enfermedad tropical más importante mundialmente. Su distribución geográfica actual comprende más de 90 países, siendo un problema de salud pública en estos, pues 40% de los habitantes totales (alrededor de 2,400 millones de personas) son afectados. Se estima que alrededor de 300 millones de personas mundialmente son afectadas por la malaria cada año; y, entre 1 y 1.5 millones mueren a causa de esta enfermedad anualmente (Bradley, 1996). La malaria es endémica en 101 países y territorios, 45 países en África, 21 en las Américas, 4 en Europa, 14 en la región este del Mediterráneo, 8 en la región sur este de Asia y 9 en la región oeste del Pacífico. (Organización Mundial de la Salud, 1998). En la figura 2 se muestra un mapa de la distribución mundial de la malaria según la Organización Mundial de la Salud.

Figura 2  
 Mapa de la distribución mundial de la malaria, para 1987,  
 según la Organización Mundial de la Salud



<sup>1</sup>Región donde la malaria ha desaparecido, ha sido erradicada o nunca existió;  
<sup>2</sup>Área de baja incidencia de malaria; <sup>3</sup>Área de transmisión de malaria

En Centro América la malaria ocurre en áreas de baja altitud, especialmente en Honduras, Nicaragua y Guatemala, con una baja incidencia de casos en Panamá y Costa Rica (Sponsler, 2000). En Guatemala se han diferenciado tres regiones para el área malárica: zona norte, zona sur y zona centro-oriental. La zona norte se extiende desde la frontera mexicana con Belice hasta la costa del Caribe, y es responsable del 65% de los casos reportado en el país. La zona sur constituye la costa del Pacífico del país, mientras que la región centro-oriental se extiende desde el centro de Guatemala hasta la frontera con Honduras y El Salvador. Esta última es la región de menor incidencia de malaria debido al clima seco y caliente (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 1988).

Aproximadamente el 30% de la población en América vive en regiones adecuadas para la transmisión de malaria. De estas regiones se realizaron preparaciones sanguíneas y se encontraron los datos listados en el cuadro 1 (PAHO, 1997).

Cuadro 1  
Investigación epidemiológica en 21 países con  
programas de malaria activos, 1994 (PAHO, 1997)

País	Pob. en riesgo	Placas examinadas	Placas positivas	(%)	Casos de * <i>Plasmodium falciparum</i>	Casos de <i>P. Vivax</i>	Casos de <i>P. Malariae</i>
México	45,248	1,923,575	12,864	0.7	63	12,801	0
Belice	210	49,179	9,957	20.2	400	9,557	0
Costa Rica	1,015	143,721	4,445	3.1	3	4,442	0
El Salvador	4,951	139,587	2,803	2.0	5	2,798	0
Guatemala	4,220	133,611	22,057	16.5	423	21,634	0
Honduras	2,319	315,893	52,110	16.5	568	52,110	0
Nicaragua	4,264	355,661	41,490	11.6	1,427	40,063	0
Panamá	313	220,062	684	0.3	18	666	0
Haití	5,500	54,973	23,140	42.1	23,140	0	0
Rep. Dominicana	7,550	316,182	1,670	0.5	1,664	5	1
Guayana fran.	55	48,242	4,241	8.8	3,809	415	17
Guyana	132	168,127	39,566	23.5	22,503	16,985	0
Suriname	42	29,148	4,704	16.1	4,389	240	75
Brasil	18,600	2,671,953	564,406	21.1	197,009	367,251	146
Bolivia	3,009	128,580	34,749	27.0	4,806	29,916	0
Colombia	24,620	572,924	127,218	22.2	34,070	93,108	40
Ecuador	6,095	301,546	30,006	9.9	10,241	19,765	0
Perú	11,171	295,824	122,039	41.3	21,203	100,801	35
Venezuela	756	123,953	13,727	11.1	3,416	10,294	17
Argentina	5,366	14,070	948	6.7	1	947	0
Paraguay	1,270	96,885	583	0.6	12	571	0
<b>Total</b>	<b>146,698</b>	<b>8,103,696</b>	<b>1,113,407</b>	<b>13.7</b>	<b>329,170</b>	<b>784,369</b>	<b>331</b>

(-) población en miles; (\*) incluye infecciones mixtas

#### 4. Vector

A pesar de que se conocía que el mosquito *Anopheles* jugaba un papel importante en la transmisión de la malaria, no fue hasta 1948 que se elucidaron todos los pasos en el ciclo de vida de esta enfermedad. La hembra del mosquito requiere de sangre para madurar sus huevos, y es por esta razón que pica a los humanos (RPH, 2000).

De las 380 especies de mosquitos del género *Anopheles*, únicamente 60 poseen la capacidad vectorial para transmitir la malaria (Bradley, 1996). Los dos determinantes más importantes para la capacidad vectorial son la propensión de alimentarse en un hospedero humano y la longevidad media. Muchos mosquitos son incapaces de transmitir la malaria debido a que son fisiológicamente incapaces de mantener eficientemente el desarrollo del parásito (Gwadz y Collins, 1996).

En la siguiente sección se ampliará más en detalle acerca de los vectores de malaria específicos para Guatemala y América Latina.

## B. Vectores de Malaria

### 1. Generalidades

Todos los mosquitos son miembros de la familia Culicidae, perteneciente al orden Díptera. La familia Culicidae se subdivide típicamente en 3 subfamilias: Culicinae, Toxorhynchitinae, y Anophelinae. A esta última pertenecen los miembros del género *Anopheles*. La forma de alimentación de estos mosquitos es por la sangre, una característica de gran importancia en cuanto al punto de vista de salud humana. Muchos patógenos responsables de la mortalidad y morbilidad humana son transmitidos por mosquitos. Todos los parásitos causantes de la malaria son transmitidos por mosquitos del género *Anopheles* (Gwadz y Collins, 1996).

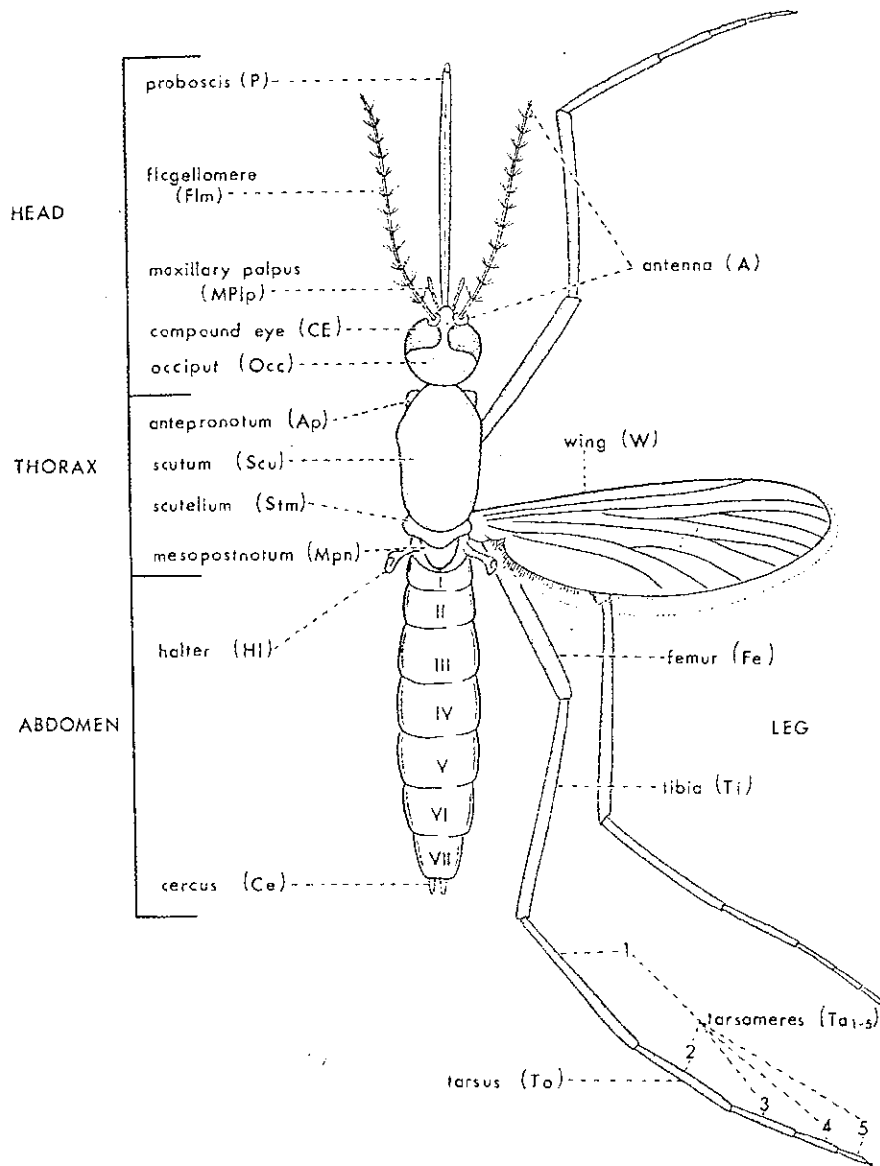
Desde 1977, cuando fueron descritas las primeras 375 especies de mosquitos *Anopheles*, el número ha incrementado a casi 500 especies clasificadas. El ciclo de vida básico del desarrollo de los mosquitos comienza cuando la hembra produce entre 50 y 200 huevos después de su alimentación sanguínea. Los huevos son depositados directamente sobre el agua o en lugares húmedos propensos a ser inundados. Todos los mosquitos presentan cuatro etapas larvales, y una etapa pupal acuática que tarda 2 a 4 días para que la metamorfosis a adulto se complete (Gwadz y Collins, 1996).

Los mosquitos adultos presentan un dimorfismo sexual marcado. Las hembras generalmente son más grandes y poseen partes bucales adaptadas para picar; mientras que los machos presentan partes bucales adaptadas para alimentarse de néctar de plantas y además poseen antenas plumosas que les sirven para detectar la presencia de las hembras para la copulación (Gwadz y Collins, 1996).

Entre las características morfológicas principales de los mosquitos del género *Anopheles* se pueden mencionar: la presencia de manchas en las nervaduras de las alas, los palpos maxilares en las hembras son de la misma longitud que la trompa picadora; y al descansar forman una línea recta cabeza, tórax y abdomen, con el cuerpo dispuesto perpendicularmente en un ángulo de 40° a 90° con relación al plano que los soporta (Aguilar, 1997).

Para diferenciar la hembra de *A. albimanus* del resto de mosquitos de este género se utilizan ciertas características morfológicas (ver figura 3), siendo la más importante y discriminatoria la presencia de un anillo basal en el tarsómero posterior 5 (Clark-Gil y Darsie, 1983).

Figura 3  
Vista dorsal de un mosquito hembra adulta (Clark-Gil y Darsie, 1983)



Head-cabeza, thorax-tórax, abdomen-abdomen, leg-pata; A - antena, Ap - anteropronoto, CE - ojo compuesto, Ce - cerco, Fe - fémur, Flm - flagelómnero, HI - halter, MPip - palpo maxilar, Mpn - mesopostnoto, Occ - occipicio, P - proboscis, Scu - escuto, Stm - escutelo, Ta - tarso, Ta<sub>1-5</sub> - tarsómeros, Ti - tibia, W - ala.

En Guatemala se reconocen como vectores de paludismo al *Anopheles albimanus*, *A. pseudopunctipennis*, *A. dalingi*, *A. vestitipennis*, y *A. puñctimacula*, siendo estos últimos descritos como vectores potenciales (Aguilar, 1997). La especie de *Anopheles albimanus* es considerada la principal responsable de transmisión de malaria en la región de las costas de México, Centro América y parte del norte de América del Sur, así como también en las Antillas (Frederickson, 1993).

## 2. Distribución Geográfica

Los mosquitos del género *Anopheles* se encuentran distribuidos mundialmente. De igual forma los mosquitos del género *Anopheles* que son específicamente vectores de malaria pueden ser encontrados en todas las regiones del mundo, pero únicamente ciertas especies son vectores principales, mientras que otras especies pueden ser vectores locales o casuales. A continuación se presenta un cuadro (cuadro 2) en el cual se muestran las principales especies de *Anopheles* que son vectores de malaria (AnoDB, 2000).

Los mosquitos de la especie *Anopheles albimanus* se extienden desde Florida y Texas, en los Estados Unidos de América, hasta la región norte del Perú, y además, se encuentran a lo largo del Caribe. Específicamente *A. albimanus* puede ser ubicado en los siguientes países: Estados Unidos de América, México, Guatemala, Belice, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Perú, Venezuela, Antigua, las Bahamas, Barbados, las Islas Caimán, Cuba, Guadalupe, la República Dominicana, Haití, Jamaica, Puerto Rico, San Martín y las Islas Vírgenes. Dentro de estas regiones el *A. albimanus* se encuentra en las regiones costeras, en altitudes de 100msnm, preferentemente (PAHO, 1996).

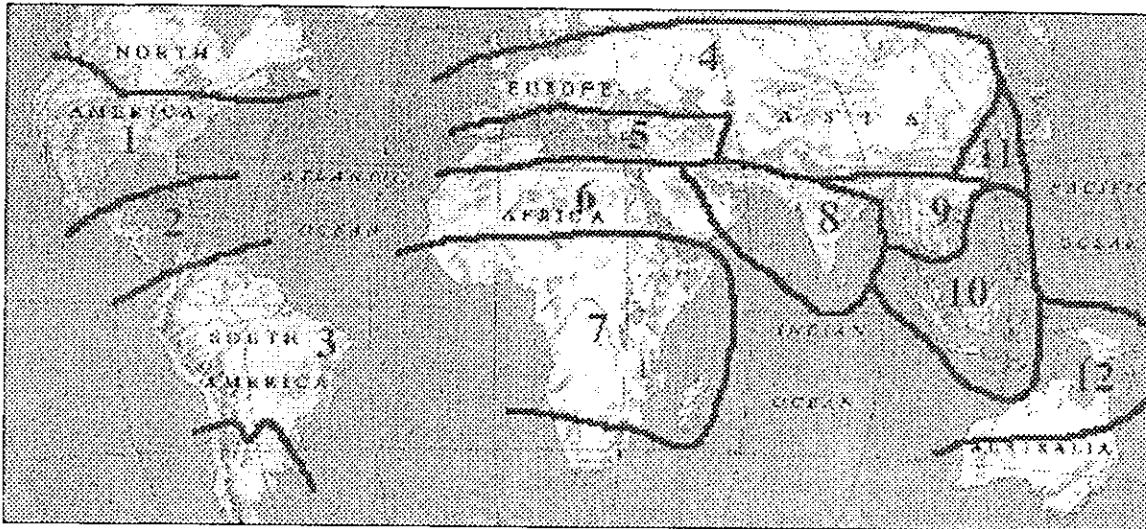
Debido a su amplia distribución, es de esperarse que el *A. albimanus* esté adaptado a una diversidad de hábitats, que van desde regiones con estaciones climáticas marcadas hasta regiones en las que la precipitación anual es de 3,000mm; aunque por lo general tiende a localizarse en áreas de alta temperatura. Aun más evidencia de su distribución ecológica tan variada se obtiene de la diversidad de localidades para la reproducción de larvas, que van desde canales de drenaje, pequeñas pozas con o sin vegetación, canales de irrigación, lagunas, reservorios, etc (PAHO, 1996).

Cuadro 2  
Distribución geográfica de las principales especies de  
*Anopheles* vectores de malaria (AnoDB, 200)

Especie de <i>Anopheles</i>	Región donde se encuentra
• <i>A. acconitus</i>	10
• <i>A. albimanus</i>	2, 3
• <i>A. albitarsis</i>	3
• <i>A. anthropophagus</i>	11
• <i>A. aquasalis</i>	2, 3
• <i>A. arabiensis</i>	7
• <i>A. argyritarsis</i>	2
• <i>A. atroparvus</i>	4, 5
• <i>A. balabacensis</i>	10
• <i>A. culicifacies</i>	8
• <i>A. darlingi</i>	2, 3
• <i>A. dirus</i>	9, 10
• <i>A. farauti</i> tipo 1	12
• <i>A. farauti</i> tipo 2	12
• <i>A. flaviatilis</i>	8, 9
• <i>A. flavirostris</i>	10
• <i>A. freeborni</i>	1
• <i>A. funestus</i>	7
• <i>A. gambiae</i>	7
• <i>A. koliensis</i>	12
• <i>A. labranchiae</i>	5
• <i>A. leucosphyrus</i>	10
• <i>A. lundlowae</i>	10
• <i>A. maculatus</i>	10
• <i>A. minimus</i>	10
• <i>A. pharoensis</i>	6
• <i>A. pseudopunctipennis</i>	3
• <i>A. punctimacula</i>	3
• <i>A. punctulatus</i>	12
• <i>A. quadrimaculatus</i>	1
• <i>A. sacharovi</i>	5
• <i>A. sergentii</i>	6
• <i>A. sinensis</i>	11
• <i>A. subpictus</i>	10
• <i>A. sundaicus</i>	10
• <i>A. superpictus</i>	5

Para numeración de regiones ver figura 4

Figura 4  
Regiones de distribución del *Anopheles* (AnoDB, 2000)



1. Norte Americana; 2. Centro Americana; 3. Sur Americana; 4. Eurasia del Norte; 5. Mediterráneo; 6. Afro-Arabe; 7. Afrotropical; 8. Indo-Iraní; 9. Montes Indo-Chinos; 10. Malasia; 11. China; 12. Australo-asiática;

### 3. Fluctuación Temporal en la Densidad

Se ha encontrado que la densidad poblacional de *A. albimanus* es mayor durante la época de lluvia. La observación más detallada de este fenómeno fue realizada en un estudio en El Salvador, en el cual se reportó que no existe una región en la cual se produzcan larvas a lo largo del año, sino que varía el criadero conforme las estaciones del año. Los esteros de los ríos son las regiones más importantes durante el inicio de la época de lluvia, mientras que los pastizales, los pantanos, las cunetas y los márgenes de los lagos son las regiones más importantes durante la mayor parte de la época lluviosa. Por otro lado, los lugares permanentes de agua como lagos y lagunas producen *A. albimanus* durante la época de sequía (Frederickson, 1993).

El *A. albimanus* no es un vector competente. Para que la especie pueda sostener la transmisión de malaria es necesario que la densidad poblacional de la especie sea alta (Sponsler, 1999).

### 4. Genética de Insectos

Los genomas de organismos eucariotas son complejos, y consisten de secuencias que sólo se observan una vez, de secuencias medianamente repetitivas y las

que son altamente repetitivas. El tamaño del genoma de los principales vectores de enfermedades se encuentra en un rango de 0.2 a 2pg, siendo el genoma de los mosquitos anofelinos de los más pequeños, es decir, que corresponden a los valores más bajos del rango. Una característica notoria de organismos con genomas pequeños, es que poseen grandes tramos de secuencias únicas (por lo menos 13kb) flanqueadas por secuencias largas de elementos repetitivos (generalmente >5kb de largo); a diferencia de organismo con genomas más grandes, que poseen secuencias únicas de 1-2kb en una forma alternada con secuencias medianamente repetitivas de 1-4kb o altamente repetitivas de 200-600pb (Knudson et al. 1996).

En la mayoría de mosquitos se encuentran 3 pares de cromosomas metacéntricos que conforman el genoma. Además, en los mosquitos anofelinos se presenta un dimorfismo sexual de cromosomas. (Knudson et.al. 1996)

Hasta la fecha se han clonado, caracterizado y secuenciado mayormente los genes involucrados en la aptitud vectorial de muchos insectos, es decir, las secuencias únicas. Como por ejemplo, genes involucrados en la especificidad del hospedero o genes expresados en las glándulas salivares. (Knudson et.al. 1996)

En cuanto a secuencias mediana y altamente repetitivas, éstas se refieren a secuencias que se repiten entre una docena de veces hasta varios miles dentro del genoma. Pueden encontrarse dispersas dentro de regiones que serían de otro modo de secuencias únicas o en bloques largos, estos últimos comprenden de 5-15% del ADN total de genoma de muchos animales. Las secuencias repetitivas comprenden entre 20 y 84% del genoma de los mosquitos, lo cual puede ser el factor responsable de la gran diferencia en variación intraespecífica del tamaño genómico. Las secuencias medianamente repetitivas se encuentra en un número de copias que varía entre 10 y 300, mientras que las copias del ADN altamente repetitivo pueden estar en números que van desde 5,000 hasta 15,000 (Knudson et.al. 1996).

### C. Genética de Poblaciones

Al estudio de las variaciones genéticas en una población natural y de los factores que influyen sobre estas variaciones, se le conoce como genética de poblaciones. La genética de poblaciones es un área de estudio de gran importancia en cuanto a vectores artrópodos de enfermedades, ya que provee información crítica para

el entendimiento de los factores que influyen sobre la variación genética y de capacidad vectorial (Tabachnick y Black, 1996).

Existe una necesidad para el entendimiento de los patrones de flujo genético y velocidades de dispersión de genes entre una población para desarrollar estrategias específicas de control sobre las especies que son vectores de enfermedades. Este flujo de genes puede ser medido respecto de varios factores como serían la capacidad vectorial (por ejemplo, localización de alimentación, densidad poblacional y competencia vectorial). Se ha sugerido que una forma para controlar las poblaciones vectoras puede ser por medio de la introducción de individuos manipulados genéticamente con capacidad vectorial reducida. Pero esta visión ambiciosa sólo puede ser alcanzada con la adquisición del conocimiento necesario sobre el control genético de características vectoriales específicas, los efectos ambientales sobre ésta, y la información sobre la genética de estas poblaciones (Tabachnick y Black, 1995).

Las técnicas utilizadas para la identificación de variaciones genéticas en poblaciones naturales han ido evolucionando, y gracias a esto actualmente los estudios ya no son teóricos. Las primeras técnicas utilizadas fueron las de la identificación de mutantes morfológicos, por medio de los cuales se hacían evidentes las características heredadas en forma recesiva; el estudio de las variaciones cromosómicas estructurales, conocida como inversión cromosomal; y la del uso de isozimas. Esta última técnica ha generado un extenso repertorio de información acerca de la genética de poblaciones (Tabachnick y Black, 1996).

Los métodos para el análisis de las variaciones genéticas en poblaciones naturales de vectores actualmente están basados en el análisis de marcadores moleculares de ADN. Entre las técnicas que caen dentro de este grupo se pueden mencionar principalmente tres (Tabachnick y Black, 1996). La primera es el estudio de fragmentos de restricción de largo polimórfico (RFLP por sus siglas en inglés), en la cual se utilizan enzimas de restricción para generar fragmentos de ADN, que son detectados por medio de la hibridización de sondas, luego de que el ADN ha sido separado por electroforesis. Esta técnica presenta limitaciones para cuando se desean estudiar dos individuos que están cercanamente relacionados. La segunda técnica es el estudio de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD por sus siglas en inglés), la cual utiliza la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) con un solo iniciador (*primer*) de 10 bases de largo para amplificar una colección de fragmentos de ADN específicos

para el genoma en cuestión. Con esta técnica no se pueden diferenciar individuos homocigotos de los que son heterocigotos. La ventaja en cuanto a la utilización de este método es que no es necesario conocer la secuencia de nucleótidos del ADN en cuestión para lograr una amplificación. La tercera es el estudio de repeticiones de secuencias simples (SSR, por sus siglas en inglés) o secuencias microsátélites. Estas secuencias han comprobado ser marcadores moleculares excelentes, debido a que son altamente polimórficos, ampliamente distribuidos a lo largo del genoma, y codominantes (Knudson et.al., 1996). Acerca de los microsátélites se ampliará más adelante, debido a que son los que se utilizarán en el presente estudio.

Entre algunos proyectos realizados con marcadores microsátélites para estudios de genética de poblaciones se pueden mencionar el estudio realizado por Walton y colaboradores (1998), para determinar el flujo genético entre poblaciones de *Anopheles* vectoras de malaria en África, y un segundo estudio en *Aedes*, realizado por Huber y colaboradores (1999).

Walton y colaboradores encontraron que existe una variación genética entre especies de *An. gambiae* y *An. arabiensis*, al utilizar cuatro loci de microsátélites como marcadores moleculares. Esta primera parte del estudio mostró la importancia y capacidad de detección de barreras al flujo genético que muestran los microsátélites (Walton et.al. 1998). En cuanto al mosquito *Aedes aegypti*, vector del dengue, se han realizado también estudios de aislamiento de marcadores microsátélites con el fin de poder utilizar estos para determinar el flujo genético dentro de las poblaciones y en última instancia poder utilizar esta información de los patrones de dispersión de genes para poder emplear estrategias de control vectorial adecuadas (Huber et.al. 1999).

Gracias a un estudio de flujo genético realizado en *An. gambiae*, se pudo establecer que el patrón distinto de alimentación entre individuos que parecían morfológicamente iguales se debía a una diferencia en especie, por lo que se identificó esta segunda especie como *An. quadrimaculatus*. Esto se hizo debido a que se demostró que había un flujo genético reducido entre ambas especies con patrones de alimentación distinto, es decir, que se demostró que eran en realidad especies crípticas (Tabachnick y Black, 1995).

## 1. Poblaciones Naturales

La palabra población, utilizada en el sentido de genética de poblaciones, se refiere a un grupo de individuos de la misma especie que viven dentro de un área geográfica suficientemente restringida como para que cualquier miembro dentro de ella pueda aparearse al azar con otro miembro. Llegar a una definición precisa se dificulta, pues existe una diferencia entre especies dada por alguna forma de estructura geográfica, es decir, algún patrón específico no al azar que distribuye a los organismos espacialmente. Rara vez se encuentra que los miembros de una especie estén distribuidos de forma uniforme u homogénea en el espacio; esta subdivisión poblacional generalmente es provocada por ambientes dispares, como por ejemplo áreas secas o empantanadas dentro de un llano, regiones de poca y de mucha profundidad dentro de un lago, etc. (Hartl, 1988).

Las unidades fundamentales de estudio en la genética de poblaciones son las poblaciones locales, es decir, unidades dentro de una población en las cuales ocurre cruzamiento entre parientes; ya que es dentro de estas unidades o poblaciones donde ocurren los cambios en las frecuencias de alelos que son tan importantes para la evolución adaptativa de una característica. Como se verá más adelante, existen factores que afectan la frecuencia genotípica dentro de una población. En general el modelo más utilizado para determinar la estabilidad de un genotipo es el de Hardy-Weinberg, el cual asume que el organismo que se está estudiando es diploide y se reproduce sexualmente, que no existe un traslape entre generaciones, y el apareamiento es al azar dentro de una población muy grande, que la migración es imprescindible y la mutación puede ignorarse, y que la selección natural no afecta los alelos que se están considerando (Hartl, 1988).

## 2. Variación Genética

### a. Equilibrio de Hardy-Weinberg y los factores que afectan la variación

El equilibrio de Hardy-Weinberg indica que en una población grande, con apareamiento al azar en ausencia de selección, migración y mutación, las frecuencias genotípicas y fenotípicas permanecen constantes de generación en generación. Es decir, que los factores que provocan cambios en las frecuencias genotípicas son principalmente cinco:

- i) **Apareamiento al azar:** cuando dos genotipos dentro de una población no se aparean al azar, se dice que es una clasificación de apareamiento positiva, y tendrá como consecuencia la reducción en la frecuencia de heterocigotos dentro de la población. La frecuencia con la que aumentan los homocigotos dentro de una población es una función del grado de relación entre los individuos que se aparean; es decir, que esta frecuencia aumentará rápidamente cuando existe un apareamiento entre padres e hijos o entre los mismo hijos (Tabachnick y Black, 1996).
- ii) **Tamaño de la población:** el tamaño de la población afecta grandemente al equilibrio de Hardy-Weinberg, ya que en una población muy pequeña está sujeta a un mayor efecto sobre la frecuencia genotípica y fenotípica, como consecuencia de selección natural o muestreo. En teoría las poblaciones deben ser grandes y constantes en tamaño, pero en la realidad el tamaño de una población puede variar (Tabachnick y Black, 1996) según la época del año o la estación, por ejemplo para *Anopheles albimanus* se nota un incremento en la densidad poblacional durante la época lluviosa (Frederickson, 1993). A los cambios en frecuencia debidos al azar se le conoce como deriva genética. La deriva genética afecta la heterocigocidad observada en una población, de manera que puede llegar a reducirse de tal forma que un solo alelo podría llegarse a fijar en la población (Tabachnick y Black, 1996).
- iii) **Migración:** la inmigración de individuos introduce genes nuevos a una población, así como la emigración puede ser responsable de cambios en frecuencia de genes especiales. Si ocurre migración entre dos poblaciones que difieren en frecuencia genética, las frecuencias genéticas de cada población cambiarán; si este intercambio es constante, la migración provocará eventualmente que ambas poblaciones tengan frecuencias genéticas similares. A este apareamiento entre emigrantes entre poblaciones se le conoce como flujo genético (Tabachnick y Black, 1996).
- iv) **Mutación:** la tasa de mutación afecta la frecuencia de genes. Una mutación es fuente de material genético completamente nuevo. La tasa de mutación está estimada en el orden de  $10^{-6}$  por locus por

generación, aunque para regiones no codificadas esta tasa es mayor (Tabachnick y Black, 1996).

- v) **Selección:** la selección es un factor determinante, ya que en distintos individuos varía la aptitud de los genes, y por lo tanto la aptitud que le confieren al individuo que los porta (Tabachnick y Black, 1996).

Una población se encuentra en el equilibrio de Hardy-Weinberg cuando ninguno de los cinco factores mencionados anteriormente afecte significativamente la frecuencia genotípica. Suponiendo que en una población hay dos alelos (A1 y A2) para un locus en específico, y sus frecuencias son  $p$  y  $q$ , respectivamente. Cuando las frecuencias de cada alelo son equivalentes en ambos sexos, al haber apareamiento al azar entre organismos, el resultado será una unión al azar de los gametos. Tenemos que las frecuencias genotípicas en la siguiente generación serán:

		Esperma	
		$p(A1)$	$q(A2)$
Ov	$p(A1)$	$p^2$	$pq$
	$q(A2)$	$pq$	$q^2$

Note que  $p + q = 1$ , y que la frecuencia genotípica esperada para cualquier generación se puede obtener por medio de una expansión binomial de las frecuencias alélicas  $(p + q)^2$ . Lo mismo ocurre para una población en la que se tienen más de dos alelos para un locus:  $(p + q + r...)^2$  (Tabachnick y Black, 1996).

#### b. Métodos utilizados para el estudio de variación genética

Anteriormente se mencionaron las principales técnicas utilizadas hasta hace poco y las actuales para el estudio de genética de poblaciones. Estas técnicas son: mutantes polimórficos, inversión cromosómica, isozimas y marcadores de ADN (RFLP, RAPD y microsatélites). En esta sección se ampliará más acerca de las técnicas que involucran ADN. A continuación se presenta el cuadro 3 en el cual se resumen las principales técnicas utilizadas.

Cuadro 3  
Características de los marcadores moleculares  
más utilizados en biología de poblaciones (Sannucks, 2000)

	Utiliza PCR	Locus simple	Codominante	No. De loci disponibles	Transferible a otros taxones	Variabilidad general
<b>ADN de organelo</b>						
Secuencia	Sí	Sí	Sí	Simple	Sí	Baja-alta
RFLP	No, grande	Sí	Sí	Simple	Sí	Baja-moderada
<b>ADN nuclear multilocus</b>						
RAPD	Sí	No	No	Muchos	Sí	Alta
AFLP	Sí	No	No	Muchos	Sí	Alta
rADN	sí	No	No	Pocos	Sí	Moderada-alta
<b>ADN nuclear de locus simple</b>						
Mínisatélites	Sí	Sí	Sí	Moderado	Pocos	Alta
Microsatélites	Sí	Sí	Sí	Muchos	Algunos	Alta
rADN	Sí	En efecto	Sí	Pocos	Sí	Baja-moderada

RFLP -fragmento de restricción de largo polimórfico; RAPD -ADN polimórfico amplificado al azar; AFLP -ADN de largo polimórfico de fragmento amplificado; rADN -ADN ribosomal

En general, las técnicas que pueden ser acopladas a PCR presentan una ventaja sobre las que no, pues se puede utilizar una pequeña cantidad de material genético inicialmente. Además otras características deseables de estas técnicas utilizadas para el análisis de genética de poblaciones son que sean caracteres heredables de forma simple y que cuentan con varias formas o alelos para ese locus; aunque un solo organismo diploide puede contar únicamente con dos alelos dentro de su genoma (Sannucks, 2000).

Otra característica deseable es que sean técnicas de un solo locus, ya que presentan ventajas sobre las técnicas multilocus, que suelen ser convenientes pero no son muy precisas. Además, con las técnicas multilocus únicamente se puede identificar un alelo, mientras las técnicas de locus simple son capaces de generar resultados para ambos alelos por lo que se pueden obtener datos acerca del haplotipo, y por lo tanto un análisis más preciso. Por último, también se busca que el marcador sea de desarrollo y de transferencia rápida a nuevos taxones (Sannucks, 2000).

### c. Microsatélites

Los microsatélites son repeticiones de secuencias cortas, de 2 a 6 bases de largo, alineadas una tras otra cabeza con cola (Chambers y McAvoy, 2000). Estas secuencias son buenos marcadores genéticos debido a su alto polimorfismo y a

su secuencia larga e ininterrumpida, es decir, que no poseen otra secuencia de bases intercalada entre las secuencias repetitivas. Se han encontrado secuencias microsatélites dentro de los genomas de todos los organismos estudiados hasta el momento, tanto en procariotas como en eucariotas (Hancock, 1999).

Las secuencias microsatélites más comunes son las poli(A)/poli(T), pero no son muy adecuadas como marcadores moleculares para estudios de poblaciones debido a su inestabilidad (Hancock, 1999). Aunque para algunos autores como Chambers y MacAvoy (2000), las secuencias mononucleótidas ya no caen dentro de lo que se considera como un microsatélite. En cuanto a las secuencias dinucleótidas, las más comunes son CA/TG, mientras que para las trinucleótidas las repeticiones más encontradas son las de GAC y AAT. La frecuencia de estas secuencias fue estimada en un genoma humano, pero otros estudios en genomas de mamíferos muestran ser comparables con los del genoma humano. Para *Drosophila melanogaster* se encontró que el microsatélite más común era el de CA, mientras que para bacterias las más comunes son igualmente poli(A)/poli(T). Los orígenes para estas diferencias aún no están claros (Hancock, 1999).

La característica que hace que loci que contienen microsatélites sean tan útiles para estudios de poblaciones es su inestabilidad inherente. La capacidad de mutación de un microsatélite generalmente es de órdenes de magnitud mayor que otros loci. Esta mutación elevada es provocada principalmente por un tipo de mutación en específico, que es el cambio en la longitud del trecho repetitivo. Los principales factores que afectan la estabilidad de un microsatélite son el tamaño de la unidad repetitiva, el número de copias repetidas, la presencia de repeticiones variantes, y la cantidad de transcripción en la región de ADN que contiene la repetición (Eisen, 1999).

Existen principalmente dos modelos, que no son necesariamente excluyentes, que explican la inestabilidad de los microsatélites, los cuales son:

- El modelo del entrecruzamiento desigual (UCO por sus siglas en inglés): el cual plantea que como resultado de un apareamiento imperfecto entre los cromosomas homólogos se da una recombinación desigual durante el entrecruzamiento; este fenómeno es más probable que ocurra en microsatélites debido a que la presencia de repeticiones aumenta la posibilidad de una alineación inexacta entre homólogos (Hancock, 1999; Eisen, 1999).

- El segundo modelo se basa en un elevado apareamiento incorrecto por resbalarse sobre la hebra ("slip-strand mispairing" -SSM, por sus siglas en inglés): esto ocurriría durante la replicación del ADN. La ADN polimerasa se 'resbala' sobre la banda de ADN durante la replicación provocando que la banda original (o templete) y la nueva se desalineen temporalmente; las bandas deben alinearse nuevamente para que la replicación continúe. Si esta realineación es imperfecta, se generará una mutación (Hancock, 1999; Eisen, 1999).

Según varios estudios realizados, el modelo de SSM es el más adecuado para soportar la elevada razón de mutación de los microsatélites, aunque como se mencionó anteriormente este modelo por sí solo no es capaz de explicar todos los errores que se convierten en mutaciones, y por lo tanto se debe tomar en cuenta también el modelo de UCO. Además, el hecho de que muchos de los errores son 'reparados' por mecanismos de corrección que posee la célula. Entre los mecanismos de reparación se encuentra la actividad exonucleolítica correctora de secuencias, el cual es un mecanismo que examina los errores en las bandas nuevas sintetizadas por la ADN polimerasa, y si encuentra un error, degrada la banda para que la ADN polimerasa regrese y sintetice nuevamente el segmento que contenía el error. Sin embargo, esta actividad se ve limitada por dos factores. El primero es que esta actividad únicamente es significativa sobre microsatélites con un tamaño de unidad pequeña y que contienen pocas copias de la repetición, ya que las exonucleasas únicamente pueden verificar el ADN que se encuentra a unas pocas bases de distancia del sitio activo de la polimerasa. El segundo es que la estabilidad del microsatélite se ve mejorada únicamente por un factor de cinco a diez en sistemas que contiene esta actividad (Eisen, 1999).

Los microsatélites, como herramienta, son unos marcadores moleculares de muy alta versatilidad. La principal razón se debe a los altos niveles de variabilidad característicos de los loci de microsatélites; además de que se puede obtener información de una forma rápida y confiable (Chambers y McAvoy, 2000). Por otro lado, son fáciles de utilizar debido a que pueden acoplarse a la técnica de PCR, por lo que no se requiere de una gran cantidad inicial de ADN genómico y se pueden realizar análisis sobre la base de un locus (Sunnucks, 2000).

Una característica que hace que los microsatélites sean altamente deseables para realizar estudios poblacionales o identificación de individuos, es que son marcadores altamente discriminantes, heredados por ambos padres y codominantes. La ventaja de

este último aspecto, codominancia, es que se puede hacer una distinción entre un homocigoto y un heterocigoto, lo cual es de suma importancia para un análisis de poblaciones (Schlötterer y Pemberton, 1994). Una ventaja adicional, es que muchos de los modelos y teorías estadísticas aplicadas a otras metodologías, pueden ser utilizadas para analizar microsátélites (Chambers y McAvoy, 2000).

d. Cómo medir la variación genética entre poblaciones

Antes de poder realizar el análisis de datos de la estructura poblacional de los microsátélites es importante saber acerca de las suposiciones básicas sobre las cuales se hace la teoría. Las tres suposiciones principales que se evalúan son:

- 1) *La selectividad neutra de cada locus*: Este factor es clave. Todos los análisis de datos subsecuentes se basan en la interacción de las fuerzas de la deriva genética, mutación y/o migración. Una selección fuerte a favor de algún alelo provocará la estabilización de las frecuencias de alelos de subpoblaciones, y no permitirá observar las estructuras poblacionales ni la distancia genética entre las subpoblaciones. Por otro lado, si las fuerzas de selección son distintas entre dos regiones, en dos subpoblaciones distintas se fijarán alelos distintos y por lo tanto se sobre estimará la variación genética (Murray, 1996).

La mayoría de microsátélites son considerados como alelos neutros, pero si estuvieran ligados a un gen bajo selección, este locus no puede ser utilizado. Por esta razón es importante determinar la neutralidad del locus antes de comenzar a trabajar con él. Una forma fácil de determinar la presión por selección es realizar una comparación de frecuencias genotípicas esperadas y observadas (Murray, 1996).

- 2) *La presencia de alelos nulos*: es decir, alelos que no son detectados por análisis de PCR (Murray, 1996).
- 3) Antes de poder combinar los datos de varios loci, es necesario evaluar el rearreglo independiente de los mismos (Murray, 1996).

Al calcular la distancia genética entre dos poblaciones se obtiene un estimado del tiempo que ha pasado desde que la población existía como una sola unidad. En algunos casos las estimaciones de estas distancias pueden indicar que existen estructuras secundarias dentro de una población, pero en otros casos pueden indicar aislamiento entre poblaciones que han estado separadas por muy poco tiempo. Al estar dos poblaciones aisladas genéticamente, los procesos de mutación y deriva genética llevan a

una diferenciación en la frecuencia de alelos que pertenecen a locus selectivamente neutros. El tiempo de separación entre dos poblaciones aisladas es directamente proporcional a la diferencia entre las frecuencias alélicas, y debe alcanzar un punto en el cual los alelos fijados en cada población son distintos (Murray, 1996).

Las estadísticas  $F$  son una medida de la correlación entre alelos dentro de individuos y la relación del coeficiente de endogamia –una medida de la asociación que no es al azar de alelos dentro de un individuo. Las estadísticas  $F$  describen la cantidad del efecto similar a la endogamia dentro de una subpoblación,  $F_{IS}$ , entre poblaciones,  $F_{ST}$ , y dentro de la población entera,  $F_{IT}$ . Estos parámetros también pueden ser clasificados como IAM y SMM/TPM (Murray, 1996).

Uno de los estimadores de distancia genética más simples, IAM, se basa en la proporción de alelos compartidos. La medida de distancia puede ser calculada entre individuos o entre poblaciones. La comparación apareada individual de la proporción de alelos compartidos se estima por medio de la siguiente fórmula:

$$P_{SN} = \frac{\sum u S}{2u}$$

donde el número de alelos compartidos,  $S$ , es la suma de todos los loci  $u$ . La distancia entre individuos ( $D_{SN}$ ) se estima por,

$$D_{SN} = 1 - P_{SN}$$

Por medio de esta fórmula y el uso de dendrogramas se puede calcular la correlación entre la similitud genética y la localización geográfica (Murray, 1996).

Debido a que las subdivisiones de poblaciones llevan a la endogamia, un parámetro que se utiliza para medir este efecto es la proporción de individuos que presentan un genotipo heterocigoto. Se pueden distinguir tres niveles de complejidad en una población, y por lo tanto existen tres medidas para la heterocigocidad:

- 1) Organismo *individual*. La medida en que se reduce la heterocigocidad en un individuo debido a apareamiento que no es al azar, dentro de su subpoblación, se conoce como el *coeficiente de endogamia*. La forma matemática de medir este índice es la siguiente:

$$F_{IS} = \frac{H_s - H_I}{H_s}$$

(Hartl, 1987)

Donde:

$H_I$  = la heterocigocidad de un individuo en una subpoblación

$H_S$  = la heterocigocidad esperada de un individuo en apareamiento al azar dentro de la sub población

$H_T$  = heterocigocidad esperada de un individuo en apareamiento al azar dentro del total de la población

- 2) *Subpoblación*. El índice de fijación es utilizado para medir la reducción en la heterocigocidad de una sub población debido a deriva genética al azar. Su medición se define como:

$$F_{IS} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

(Hartl, 1987)

- 3) *Población total*. El coeficiente de endogamia global para un individuo incluye los efectos causados por apareamiento no al azar dentro de las sub poblaciones, y por la deriva genética al azar. Por lo tanto el *coeficiente global* se define como:

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$$

(Hartl, 1987)

En cuanto se refiere a microsatélites, la mayoría de autores coinciden en que aún falta y es necesario desarrollar nuevos modelos matemáticos para el análisis de datos generados por microsatélites, ya que las teorías actuales no toman en consideración el ciclo de vida biológica de un microsatélite. Es necesario generar modelos matemáticos que consideren los procesos de mutación en los loci de microsatélites, que llevan a la evolución de los mismos (Chambers y McAvoy, 2000).

Actualmente se ha utilizado la estadística de Wright (o su estimador  $\theta$ ) para medir la diferenciación en una población, aunque su aplicación es más adecuada para una población que no está muy diferenciada. Mientras que una medida equivalente que se ha derivado específicamente para microsatélites,  $R_{ST}$ , toma en consideración la mutación discriminatoria hacia un largo mayor, es más adecuada cuando las distancias genéticas son grandes (Chambers y McAvoy, 2000).

Un modelo muy popular es el "Modelo de Mutación en un solo paso", el cual permite un incremento simétrico de una unidad para cambios mutacionales. Sin embargo, el modelo más conveniente es una variante,  $\delta\mu^2$ , que se calcula como el cuadrado de las

diferencias entre la media del tamaño de los alelos entre dos poblaciones (Chambers y McAvoy, 2000).

#### D. Estudios de Genética de Poblaciones del Mosquito *Anopheles* Realizados en Guatemala y América Latina

Un estudio realizado para evaluar la variabilidad temporal y geográfica de las poblaciones de *A. albimanus* en Guatemala, utilizando espaciadores intergénicos (IGS) de ADN ribosomal mostró que existen barreras geográficas entre las regiones de la costa del Pacífico y la costa del Caribe de Guatemala. Esto tiene como consecuencia un flujo genético restringido entre las poblaciones de dichas regiones (Ovalle, 1994).

En un estudio posterior de poblaciones de *A. albimanus* se utilizó como marcador molecular el ADN mitocondrial de estos mosquitos. El objetivo principal era saber si existía un buen flujo genético entre las poblaciones de Guatemala, El Salvador, México, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia y Venezuela. La secuencia del ADN mitocondrial amplificada, utilizando la técnica de PCR, fue una región de la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa. Las muestras fueron analizadas por medio de la técnica de polimorfismo conformacional de banda simple (SSCP, por sus siglas en inglés). Se detectaron 45 haplotipos distintos, para los cuales no se notó una diferencia significativa en frecuencia para las costas del Pacífico y del Caribe de Guatemala, pero sí se encontró que para poblaciones separadas por más de 200km, existe un aislamiento que está correlacionado con la distancia (Mérida et al 1999).

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### A. Hipótesis

Existe flujo genético entre las poblaciones de mosquito *Anopheles albimanus* desde México hasta Costa Rica, por lo que los países presentarán patrones genéticos de secuencias microsatélites significativamente similares.

#### B. Objetivos generales

- Estudiar la genética de poblaciones de mosquito *Anopheles albimanus* en distintas regiones de Guatemala, México, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica, por medio del análisis de cuatro marcadores microsatélites.

#### C. Objetivos específicos

- Determinar el polimorfismo genético entre los distintos individuos de las poblaciones de Guatemala incluidas en el estudio, pertenecientes a distintas regiones del país, al utilizar como base el tamaño de las secuencias microsatélites de cada uno. Las poblaciones a usar son: Champona, Cuto, El Motor, Lauro, Nahuá, Puente Blanco, Ruperto, San Luis Buenaventura, San Luis Petén y Tallado.
- Estimar la variación genética existente entre las poblaciones de un mismo país, es decir, entre las poblaciones del México (Cosalapa, Zapata y Nueva Independencia), Guatemala (Champona, Cuto, El Motor, Lauro, Nahuá, Puente Blanco, Ruperto, San Luis Buenaventura, San Luis Petén y Tallado), El Salvador (San Alfredo, San Diego y Santa Lucía), Nicaragua (Corral 1, Corral 2 y Corral 3) y entre las de Costa Rica (Bananito y Batán).
- Estimar la variación genética existente entre los cinco países, incluidos en este estudio, para cada una de las cuatro secuencias microsatélites estudiadas.
- Comparar la estructura genética de las dos regiones delimitadas en este estudio. La primera región comprende desde México hasta Nicaragua, y la segunda región comprende las poblaciones de Costa Rica.
- Determinar el polimorfismo del tamaño de las secuencias microsatélites de los distintos individuos de las poblaciones de México y Centro América, que incluyen muestras de los siguientes países: México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica.
- Calcular la variación y comparar la estructura genética que existe entre las poblaciones de los distintos países latinoamericanos.



## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. MÉTODOS

Las muestras provenientes de Guatemala que se utilizaron para este estudio fueron recolectadas durante los años 1995 y 1996, en las regiones que se presentan en el mapa en la siguiente página.

Además, se trabajó con muestras provenientes de distintos países de América Latina, que fueron recolectadas a través del período que comprende desde 1998 hasta 1999. Los países con los cuales se trabajó son los siguientes: México, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Guatemala.

#### 1. Extracción de ADN

Este paso fue realizado anteriormente al trabajo relacionado con esta tesis, por lo que se trabajó a partir del ADN almacenado en etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El procedimiento de extracción llevado a cabo fue el siguiente:

1. Se colocó en un vial  $100\mu\text{L}$  de buffer de extracción.
2. En cada vial se colocó un mosquito.
3. Se maceró completamente el mosquito con un pistilo.
4. Luego se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.
5. A cada vial se adicionó  $14\mu\text{L}$  de acetato de potasio 8M y se colocó en hielo por 30 minutos.
6. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos.
7. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.
8. Por último se agregaron  $200\mu\text{L}$  de etanol absoluto frío, y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2. Reconstitución de ADN

A partir de este punto el procedimiento fue estandarizado por Schoua (2000).

1. Se tomó la muestra almacenada en etanol y se centrifugó a 10000rpm y  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.
2. Luego se decantó la solución o se extrajo con una micropipeta.
3. Se agregaron  $100\mu\text{L}$  de etanol al 70% frío, y se decantaron. Inmediatamente se agregaron  $100\mu\text{L}$  de etanol absoluto frío y se decantaron. Con esto se lavó el ADN.
4. Se dejó secar al aire por un lapso mínimo de 1 hora, o se podía secar con un 'speed vac' por unos 10 minutos.
5. Se resuspendió el ADN en  $100\mu\text{L}$  de buffer TE.
6. Se dejó reposar un mínimo de 8 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ .
7. Se hicieron las diluciones con una proporción de 1:50. Se agitó bien la muestra reconstituida y luego se tomaron  $2\mu\text{L}$  de esta y se agregaron a  $98\mu\text{L}$  de buffer TE en un tubo limpio.

Figura 5  
 Sitios de recolección de *Anopheles albimanus* para el estudio

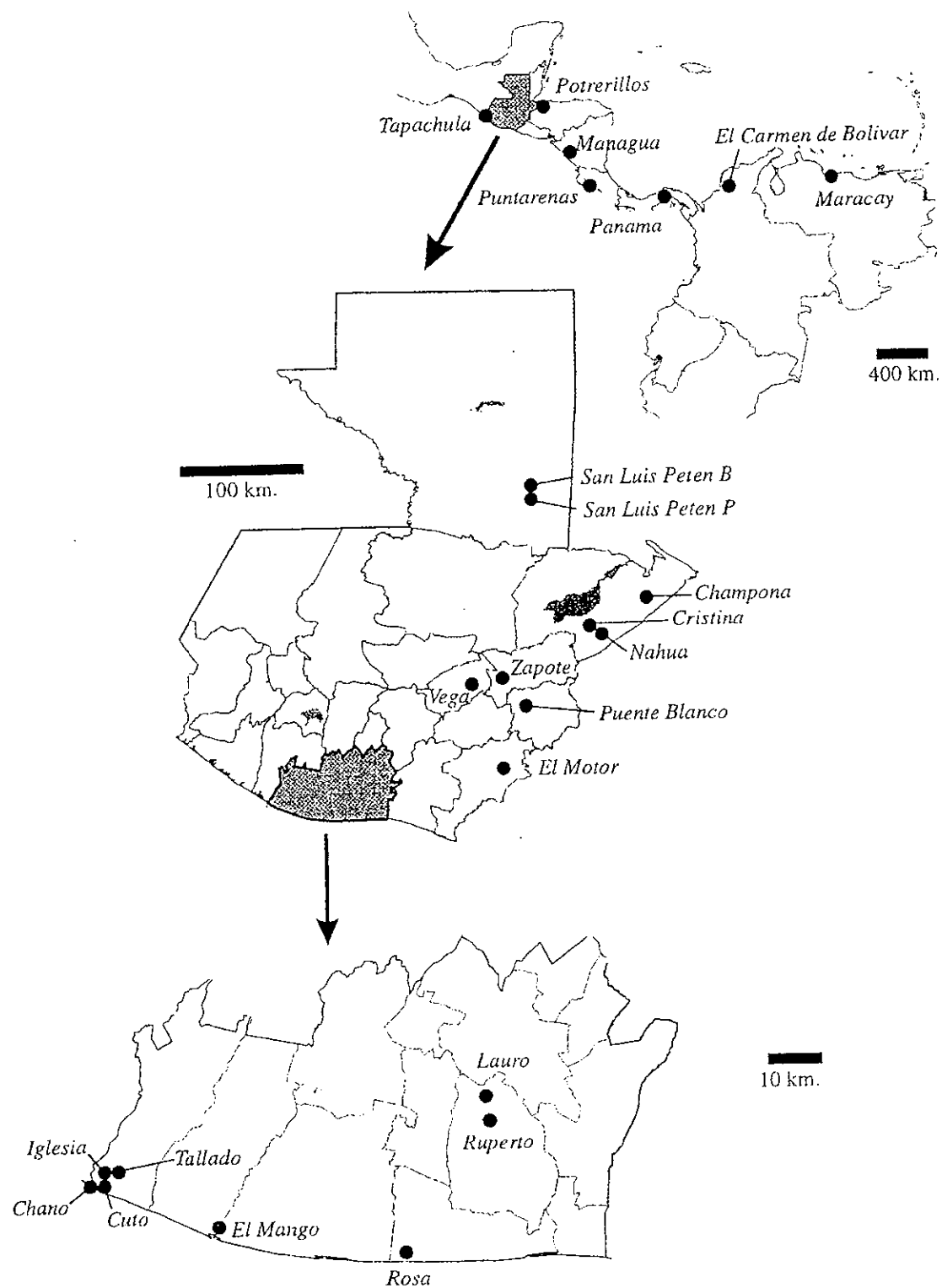
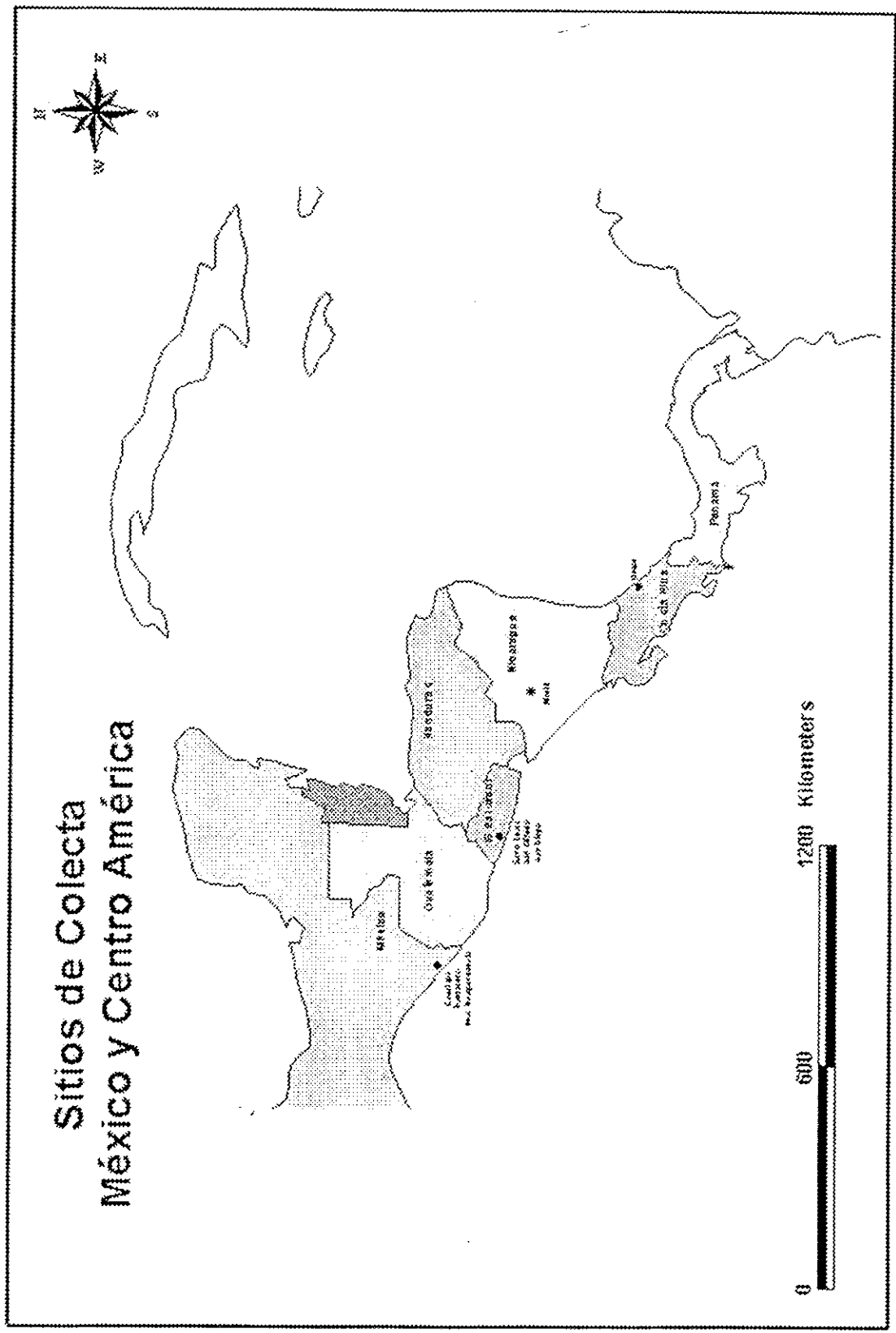


Figura 6  
Mapa de los sitios de colecta en México, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica



A continuación se presenta un cuadro que contiene el número de individuos por población según la región de colección de los mosquitos *Anopheles albimanus*.

Cuadro 4  
Región de colección y número de individuos según la colecta

País y sitio de colección		Fecha de colección	No. de individuos
Guatemala	<b>Región Norte</b>		
	Champona	11/3/1996	37
	Nahuá	13/3/1996	24
	San Luis Petén	12/3/1996	31
	San Luis Petén Buenaventura	12/3/2001	23
	<b>Región Sur</b>		
	Cuto	27/3/1996	48
	El Mango	28/2/1996	32
	Lauro	27/3/1996	14
	Lauro	7/6/1996	13
	Ruperto	4/10/1995	48
	Ruperto	27/3/1996	16
	Tallado	7/2/1995	40
	<b>Región Este</b>		
	El Motor	20/2/1996	48
	Puente Blanco	21/2/1996	48
México	Cosalapa	1/12/1998	50
	E. Zapata	1/12/1998	50
	Nueva Independencia	19/11/1998	50
El Salvador	San Alfredo	21/10/1998	50
	Santa Lucía	21/10/1998	50
	San Diego	21/10/1998	49
Nicaragua	Corral 1	24/9/1998	50
	Corral 2	24/9/1998	50
	Corral 3	30/9/1998	50
Costa Rica	Bananito	13/4/1999	60
	Batán	13/4/1999	60
<b>Total de individuos estudiados</b>			<b>991</b>

### 3. Amplificación del ADN

La amplificación del ADN de la muestra implica la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Antes de comenzar a trabajar se debió esterilizar todo el equipo y el área de trabajo con cloro al 20%, para evitar contaminación.

1. Se preparó la cantidad de buffer de reacción necesaria para el número de muestras que se amplificaron ( $MgCl_2$ , buffer 1X y dNTP 0.2mM, iniciador 2.5pmol y agua destilada desmineralizada). El volumen total del buffer de reacción debía ser de 25 $\mu$ L incluyendo la muestra.
2. Se colocaron 23.75 $\mu$ L de buffer de reacción en cada tubo de 0.5 $\mu$ L.
3. Se agregaron dos gotas de aceite mineral estéril.
4. Estos tubos se expusieron a una fuente de luz ultravioleta por 10 minutos.
5. Aquí fue necesario cambiarse de guantes, para poder agitar vigorosamente las muestras.
6. Se agregó 1 $\mu$ L de muestra (dilución 1:50) por tubo.

7. Se colocaron los tubos en el termociclador y se agregó 0.25µl de Taq polimerasa (o el volumen que sea necesario para una concentración final de 0.5U) cuando la temperatura alcanzaba los 80°C ('Hot start' en el programa). Era importante volverse a cambiar los guantes antes de agregar la Taq polimerasa.
8. Se utilizó el programa BLACK

Cuadro 5  
Programa BLACK para el termociclador

Paso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1 Desnaturalización inicial	5	95
2 Hot start	20	80
3 Desnaturalización	1	95
4 Hibridización	1	48/55
5 Elongación	1	72
6 Repetición de ciclo	39 veces al paso 3	
7 Elongación final	7	72
8 Finalización	Indefinido	4°C
9 FINAL		

Nota: la temperatura de hibridización es distinta según la secuencia que se desea amplificar: para los microsátélites 1-90 y 2-14 se utilizan 48°C, mientras que para el microsátélite 6-41 se utilizan 55°C.

#### 4. Electroforesis en Gel de Agarosa

1. Se pesaron 1.9g de agarosa y se le agregaron 160mL de buffer TBE 1X.
2. Se agitó constantemente mientras la solución alcanzaba la ebullición.
3. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 60°C.
4. Luego se agregaron 5µl de bromuro de etidio (CUIDADO: cancerígeno!)
5. La mezcla se vertió en el molde con el peine y se dejó polimerizar (aproximadamente 45 minutos).
6. Se llenó la cámara con buffer TBE 1X (se utilizaron aproximadamente 1200mL)
7. Sobre un pedazo de papel parafilm se punteó una gota de 2µl de buffer de montaje por cada muestra.
8. A esto se le agregaron 8µl de producto de PCR a los 2µl del buffer de montaje y se homogeneizó bien. Luego se cargó esta mezcla en el pozo del gel.
9. En los pozos de los extremos se cargaron 5µl del marcador de tamaño 1kb.
10. Se conectó la cámara a la fuente de poder y se corrieron las muestras por 2 horas a 60V.
11. Para visibilizar las bandas de ADN en el gel se irradió con luz ultravioleta.
12. Por último se fotografió el gel (mientras se irradiaba con UV).
13. El gel de agarosa podía ser cortado en pedazos y guardado en la refrigeradora. Este gel podía ser derretido y polimerizado nuevamente.

#### 5. Electroforesis en Gel de Secuenciación

##### a. Preparación del gel y del sistema

1. Se colocaron en un beaker con agitación:
  - 42g Urea
  - 32mL ddH<sub>2</sub>O
  - 20mL TBE 5X
  - 17mL de Acrilamida (disolver 285g Poliacrilamida y 15g Bis-acrilamida y llevar a 1L con ddH<sub>2</sub>O; esta solución puede ser almacenada a 4°C y servir de solución 'stock')

2. Esta solución se filtró al vacío, a través de 2 filtros Whatman #1 durante 30 minutos, para desoxigenarla.
3. El Bind Silando se preparó agregando 5µl de BS (metacriloxi-propil-trimetoxisilano) en 1ml de una solución de etanol:ácido acético glacial con una proporción de 995:5.
4. Se restregó la placa de vidrio exterior con una esponja plástica y jabón de cocina. Se colocó una cantidad abundante de la solución limpiador "Uncle Bill's" (10M NaOH, 0.2M SDS) sobre la placa y se dejó reposar de 5 a 15 minutos. Al finalizar este tiempo se restregó la placa vigorosamente con la esponja, y luego se enjuagó con abundante agua corriente. Por último se enjuagó dos veces con 1L de agua destilada por vez, y luego con etanol al 70% (utilizando una pizeta y Kimwipes para esparcir el etanol). Se dejó secar al aire.
5. La placa de vidrio adherida a la cámara superior se restregó con Alconox al 2% para una esponja suave. Se enjuagó con abundante agua corriente, luego con agua destilada y por último con etanol al 70% (igual que con la placa anterior).
6. La solución de BS (inciso 3) se distribuyó sobre la placa de vidrio exterior y se utilizaron dos paños Kimwipe. Se dejó reposar 5 minutos. El exceso de BS se limpió tres veces con etanol al 95% (usando la misma técnica que con etanol al 70%).
7. Aquí se cambiaban los guantes (ahora contaminados con BS) para trabajar la placa adherida a la cámara superior. Se agregaron 2mL de Sigmacote, 1mL a la vez, dispersándolo bien con dos Kimwipe.
8. Para ensamblar la unidad superior se colocaron las placas de vidrio con los espaciadores (0.4mm) de por medio y se ajustaron con los clamps. Los espaciadores y las placas debían quedar bien alineados antes de asegurar los clamps.
9. Se preparó la solución de persulfato de amonio (APS), se agregó 250µl de ddH<sub>2</sub>O a 62.5mg de APS.
10. Se agregaron 107µl de TEMED y 107µl de APS a la mezcla del gel (inciso 2) y se agitó por un momento. Esta mezcla se cargó rápidamente a una pipeta volumétrica de 100mL y luego se inyectó entre las placas tratando de evitar burbujas.
11. Inmediatamente se colocó el lado del revés de un peine de 0.4mm de grosor para hacer un solo pozo de 7 a 8mm de profundidad en el inicio del gel. Se ajustaron las dos placas, en la parte superior, con clips metálicos de papel. El gel debía polimerizar en 1 hora como mínimo y no más de 12 horas, antes de ser usado.

#### b. Preparación precorrida

1. Se calentó un bloque calentador a ~95°C (en él se colocaban los tubos con el producto de PCR)
2. Se colocó agua caliente (aproximadamente a 60°C) en la cámara superior del gel para calentar el sistema, dejándole el agua caliente 5 minutos. Esto se repitió.
3. Para prepara el buffer TBE 1X se diluyeron 100mL de buffer TBE 5X a 500mL con dH<sub>2</sub>O y se pusieron en la cámara inferior del sistema.
4. También se necesitó buffer TBE 0.5X para la cámara inferior. Éste se preparaba diluyendo 150mL de buffer TBE 5X a 1500 con dH<sub>2</sub>O. Luego se calentaba hasta ~60°C. El agua corriente que se colocó en la cámara superior del sistema se descartó e inmediatamente se llenó con el buffer caliente.
5. Se encendió la fuente de poder, se quitó el espaciador que formaba el pozo grande en el inicio del gel y se lavó el gel que no había polimerizado con una pipeta pasteur.
6. Para medir la temperatura de la corrida se colocó un termómetro dentro de la cámara superior y se conectaron los electrodos. Se corrió a 105 Watts constantes

durante 15 minutos, sin dejar que la temperatura excediera los 60°C, ni que bajara de 50°C.

- La muestra se preparó mezclando 6µl del producto de PCR (tanto de los estándares internos como de los individuos nuevos) con 4µl de buffer de montaje (10mM NaOH, 95% formamida, 0.05% azul de bromofenol y 0.05% xilen cianol). El marcador de tamaño se preparó agregando 5µl del mismo buffer a 5µl de marcador de tamaño pBR322 HaeIII digest. Esto se colocó en el bloque calentador por 5 minutos antes de cargarlos.

Nota: Un estándar interno es un individuo cuyos alelos ya tienen un valor asignado. Este valor sirve de referencia para futuros geles en los cuales se carga este individuo junto con otros nuevos para los cuales se desconoce su composición y tamaño de alelos. Vea cuadros (50, 51, 52 y 53) de estándares internos utilizados en este estudio en sección de anexos.

#### c. Corrida del gel

Es necesario trabajar rápidamente para evitar que el gel se enfríe.

- Una vez el sistema había alcanzado los 60°C, y los tubos hubieran permanecido en el bloque calentador casi los 5 minutos, se apagó la fuente de poder, fueron quitados los electrodos y lavó el pozo grande con la pipeta pasteur. Se empujó el peine con los dientes hacia abajo hasta apenas pinchar el gel. Se ajustaron los clips metálicos mientras se colocaron las muestras dentro de los pozos.
- Se cargaron tres marcadores de tamaño, uno en cada uno de los extremos y uno en el centro, y luego 5µl de la mezcla que contenía el producto de PCR, en los pozos formados por el peine.
- Media vez el gel estaba cargado, se removían los clips metálicos, y se volvían a conectar los electrodos y correr el gel a 105 Watts constantes durante:

Cuadro 6  
Tiempos de corrida para cada microsatélite

Microsatélite	Tiempo de corrida
1-90	2 horas 35 minutos
2-14	2 horas 45 minutos
2-25	1 hora 40 minutos
6-41	2 horas 35 minutos
2-14 y 2-25	2 horas 10 minutos

- Se apagó la fuente de poder y se desconectaron los electrodos. El sistema se colocó en el lavamanos y se corrió agua fría a través de la cámara superior durante 15 minutos.
- Se desarmó el sistema y se colocó el gel (ahora adherido a la placa de vidrio) en 2L de ácido acético al 10%.

#### d. Tinción con nitrato de plata

El siguiente procedimiento es una leve modificación del indicado por Black IV y Du Teau (1997). La primera modificación consistió en lavar 6 veces el gel con agua, en lugar de tres, luego de la incubación con ácido acético. La segunda es que se utilizó agua destilada únicamente en la preparación de las soluciones de trabajo (carbonato de sodio, plata y lavado con agua fría), el resto de lavados se realizaron con agua desionizada. **Importante: las soluciones de trabajo deben ser preparadas pocos**

**minutos antes de usarlas** (la solución de carbonato de sodio debe estar fría, pero los demás constituyentes deben agregarse inmediatamente antes de utilizarla).

1. El gel que se encontraba en la solución de ácido acético al 10% se agitó por un mínimo de 30 minutos. Este paso se realizó para fijar el ADN.
2. La solución de ácido acético se recuperó y se lavó el gel 6 veces con 2L de agua desionizada durante 2 minutos, con agitación suave.
3. Después de que se descartara el agua del último lavado se agregaron 2L de solución de coloración (3.0g de  $\text{AgNO}_3$  aforado a 2L + 8mL de formaldehído al 37%), y se agitó durante 30 minutos.
4. La solución de nitrato de plata se desechó y se lavó el gel con 2L de agua destilada desionizada ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) helada durante 18 segundos.
5. El agua del lavado se descartó e inmediatamente se sumergió el gel en la solución reveladora helada (60g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 2L de  $\text{ddH}_2\text{O}$  + 8mL de formaldehído al 37% + 400 $\mu\text{l}$  de una solución que contiene 0.01g de tiosulfato de sodio en 1mL de agua). El gel se mantuvo en agitación suave hasta que aparecieron las bandas teñidas de un color café oscuro o negro (esto sucedía alrededor de 3 a 5 minutos, dependiendo del microsatélite). La reacción se detuvo antes de que el fondo se oscureciera mucho al agregar los 2L de ácido acético al 10% que habían sido recuperados en el inciso 2.
6. Se agitó suavemente el gel hasta que la reacción entre el ácido acético y el carbonato de sodio cesara. Esta solución se desechó y se lavó el gel dos veces más, durante 2 minutos, empleando 2L de agua desionizada por vez.
7. La placa se colocó sobre una superficie plana inclinada con algún absorbente (papel o paño) y se dejó secar antes de leerlo (aproximadamente 24 horas). Después de 24 horas, el gel ya no estaba pegajoso.

e. Lectura del gel

1. El vidrio se rotuló en la parte superior al gel: se colocó el nombre, fecha de realización y se indicó el microsatélite, y la población que se trabajó.
2. Cada uno de los pozos se identificó según la forma en que las muestras, marcadores y estándares internos habían sido cargados.
3. Los marcadores de tamaño que se utilizaron se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7  
Marcadores de tamaño utilizados para cada microsatélite

Microsatélite	Marcadores de tamaño	
	Identificados en el gel	Utilizados para la regresión
1-90 y 6-41	587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104	267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104
2-14 solo	587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104	267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104
2-25 solo	587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89	192, 184, 124, 123, 104, 89
2-14 y 2-25	587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89	Para cada uno se utilizan los fragmentos mencionados arriba

4. Las bandas que se leyeron se marcaron con un punto en el centro vertical de la banda, en uno de los extremos horizontales.
5. Se utilizó un formato de lectura para apuntar sus resultados.

6. Se colocó el “cero” de una regla metálica en el inicio del pozo, y se leyó la distancia migrada por el centro vertical de la banda correspondiente a los fragmentos del marcador de tamaño necesarios.
7. Luego se pasó a medir la distancia migrada por la banda principal de los alelos del microsatélite. La banda principal era la que se presentaba con un color más negro (las bandas se encontraban en parejas, con una banda más negra y la otra un poco más café), que por lo general era la inferior del doblete. Al igual que con los fragmentos del marcador de tamaño, se leyó el centro horizontal y vertical de la banda.
8. Cada vez que se leía una banda se anotaba su valor en el formato adecuado. Simultáneamente con la migración de las bandas, se debió indicar si el individuo era homocigoto o heterocigoto.

#### f. Uso del escáner e impresión del gel

1. Se abrió el programa adecuado para usar el escáner.
2. El vidrio se colocó sobre el escáner de manera que el gel quedara centrado. Se hacía una marca en el extremo inferior donde se terminaba la región utilizable del escáner (NOTA: el gel completo no cabía en la región de uso del escáner, por lo que se debía escanear el gel en tres fragmentos).
3. Primero se realizaba el barrido preliminar, asegurándose que la marca fuera visible, y que el gel estuviera correctamente alineado.
4. Luego se realizaba el barrido final y se guardaba esta imagen como un documento \*.bmp
5. Se movía el vidrio de manera que la primera marca quedara en el extremo superior del área de uso del escáner. Se hacían nuevas marcas en la parte inferior del vidrio y se repetían los pasos 3 a 4.
6. Por último se realizaba la misma operación para el tercer fragmento.
7. Al tener los tres fragmentos por separado, era necesario juntarlos en una imagen. Para ello se abrió el programa “Microsoft Photo Editor”, y luego cada uno de los tres fragmentos.
8. Se abría una hoja nueva, y en ella se pegaba el primero de los fragmentos.
9. Luego se activaba la ventana para el segundo fragmento. A éste se le cortaban secciones de manera que las marcas quedaran a ras del margen. Este nuevo fragmento se seleccionaba, copiaba y pegaba en la hoja nueva, junto al primer fragmento, asegurándose que la marca encajara adecuadamente.
10. El procedimiento se repetía con el tercer fragmento.
11. El gel completo se imprimía y, además, hacía una impresión del fragmento del gel que contenía las bandas del microsatélite (cuando se corrían los microsatélites 2-14 y 2-25 juntos, era necesario imprimir dos fragmentos).

#### g. Descarte del gel

1. Cuando ya se tenía la impresión del gel se podía descartar.
2. El vidrio con el gel adherido se colocaba en una solución de NaOH al 10% (aproximadamente 1.5L).
3. Se dejaba reposar como mínimo 7 horas.
4. Después de este tiempo, el gel se rehidrataba y desprendía completamente del vidrio. Al utilizar guantes se recogía el gel y descartaba, envuelto en una servilleta de papel, en un basurero.

#### h. Análisis de datos

1. Se abría una hoja de Microsoft Excel con un formato ya preparado.

2. Se realizaba una gráfica de la migración de las bandas (en cm) en función del logaritmo del tamaño (en bases), y se le aplicaba regresión lineal.
3. Esta ecuación resultante se utilizaba para conocer el tamaño de los alelos de los microsátélites.
4. Debido a que existía cierta variación entre un gel y otro, era necesario realizar una corrección del tamaño de los alelos encontrados en este gel respecto del tamaño asignado a los distintos alelos. Para ello se comparaba el tamaño de los alelos de los estándares internos de este gel, con el tamaño asignado a los alelos de cada uno de estos individuos. El valor que se asignaba a los individuos nuevos se corregía sobre la base del valor asignado para los estándares internos.
5. El programa que se utilizó para calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg, el equilibrio de ligamiento y los Fst fue el Arlequin ver 2000. Para utilizar este programa fue necesario crear archivos específicos para cada análisis que se deseaba hacer.

## B. MATERIALES

### 1. Materiales y equipo

Agitador magnético  
 Autoclave  
 Balanza analítica  
 Beakers y balones de 250mL, 500mL, 1000mL y 2000mL  
 Bloques calentadores para tubos  
 Cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa  
 Cámara de electroforesis vertical para geles de secuenciación, 'BioRad'  
 Cámara fotográfica (para fotografiar geles)  
 Clips metálicos para papel grandes  
 Congeladores (uno a  $-70^{\circ}\text{C}$  y otro a  $-20^{\circ}\text{C}$ )  
 Destilador de agua  
 Filtros Whatman #1  
 Fuente de luz ultravioleta  
 Fuente de poder 'BioRad'  
 Guantes  
 Microcentrífuga  
 Micropipetas de 2 $\mu\text{l}$ , 10 $\mu\text{l}$ , 20 $\mu\text{l}$ , 100 $\mu\text{l}$ , 200 $\mu\text{l}$  y 1000 $\mu\text{l}$   
 Paños Kimwipe  
 Pipeta pasteur  
 Pizetas  
 Puntas para micropipetas  
 Refrigeradora  
 Relojes timer  
 Termociclador, 'Programmable Thermal Controller, M.J.Research, Inc. Peltier Effect Cycling. PTC-100'  
 Termómetro  
 Tubos de 1.5 y 0.5mL para microcentrífuga

### 2. Reactivos

Aceite mineral para biología molecular (Sigma)  
 Ácido acético glacial (Merck)

Ácido bórico, para biología molecular (Sigma)  
 Acrilamida, grado biología molecular (Sigma)  
 Agarosa, Routine Use, grado biología molecular (Sigma)  
 Alconox  
 Azul de bromofenol grado electroforesis (BioRad)  
 Bind Silane (Sigma)  
 Bisacrilamida, pureza de reactivo para electroforesis (BioRad)  
 Bromuro de etidio (Sigma)  
 Buffer para reacción de PCR 10X con MgCl<sub>2</sub> (Promega)  
 Carbonato de sodio anhidro, reactivo ACS (Sigma)  
 Cloro comercial  
 Cloruro de sodio (Merck)  
 Detergente Extrán (Merck)  
 dNTP (Promega)  
 Dodecil sulfato de sodio (Sigma)  
 EDTA para biología molecular (Sigma)  
 Etanol absoluto y etanol al 95% (Merck)  
 Formaldehído al 37% (Merck)  
 Formamida (sigma)  
 Hidróxido de sodio en lentejas (Merck)  
 Marcador de tamaño de ADN para geles de agarosa: Escalera de 1kb, Gibco-RBL  
 Marcador de tamaño de ADN para geles de secuenciación: pBR322 HaeIII, Sigma  
 Nitrato de plata (Merck)  
 Persulfato de amonio, grado electroforesis (BioRad)  
 Sigma Cote (Sigma)  
 Taq polimerasa (Promega)  
 TEMED (BioRad)  
 Tiosulfato de sodio (Sigma)  
 Trizma HCl y Trizma Base para biología molecular (Sigma)  
 Urea, grado electroforesis (Sigma)  
 Xilen cianol (Sigma)

Cuadro 8  
Iniciadores usados para la reacción de PCR

Nombre del iniciador	Secuencia	Tamaño en pb	Peso molecular	Temperatura de hibridización
Aams 1-90+	5' -GCATAAATAATA GGC GAA CA- 3'	20	6128.05	54°C
Aams 1-90-	5' -GTCACA CTTCCGACTACAAA- 3'	20	6030.95	58°C
Aams 2-14+	5' -GCCGTTGCCAAGATA AAA TGG AAA- 3'	24	7379.85	61°C
Aams 2-14-	5' -TCA AAT AAT CCT AAA ACA CCGTCC- 3'	24	7249.77	59°C
Aalb 2-25+	5' -GGT TTC CAG CCT CCA TTC TC- 3'	20	5994.89	62°C
Aalb 2-25-	5' -CCT TAC TGT GCT GGA ACA CG- 3'	20	6092.97	62°C
Aams 6-41+	5' -CGGCATCCA TCC TTTT CTC TG- 3'	20	5995.89	62°C
Aams 6-41-	5' -GACCTC GCG CCTTGT CATAA- 3'	20	6053.94	62°C

**NOTA:** Estos iniciadores fueron diseñados por María Marta Yurrita y colaboradores. Fueron adquiridos de 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 500pmol/μl. Las alícuotas de 10μl se almacenan a -70°C.



## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Estandarización de la metodología

La estandarización del método, descrito anteriormente, para los microsatélites fue desarrollada por Schoua (2000). En esta estandarización se determinaron las condiciones necesarias para los PCRs de los locus 1-90, 2-14 y 6-41. Además, se adecuó una metodología para las corridas de las muestras en los geles de secuenciación, para los mismo 3 locus anteriores.

Debido a que se buscaba trabajar con una cuarta secuencia microsatélite fue necesario optimizar el procedimiento para éste. Inicialmente se trabajó con el microsatélite descrito con el nombre de 4-54. Los primeros PCRs se corrieron con el mismo programa establecido en el cuadro 5, exceptuando la temperatura de hibridización, la cual se cambió a 52°C, y una concentración de iniciadores de 11.5 pmol/25µl y 10.8 pmol/25µl, para el 4-54L y 4-54R, respectivamente.

Bajo estas condiciones se hicieron los PCRs de las poblaciones de Cosalapa y Zapata, México, y se obtuvo unos resultados poco útiles, ya que en total de 85 individuos o 170 alelos posibles, se obtuvieron 38 alelos de distintos tamaños. El rango de estos alelos también fue muy grande, ya que iniciaba en 190pb y alcanzaba los 290pb. Este alto grado de polimorfismo se evidencia claramente en el gel que se presenta en la figura 7.

Se intentó disminuir el alto grado de polimorfismo, por lo que se decidió aumentar la temperatura de hibridización a 57°C, pero no se obtuvo alguna mejoría (ver figura 8). Por lo tanto se concluyó que este locus era demasiado polimórfico como para ser utilizado en este estudio, debido a la reducción en la eficiencia del trabajo, ya que en cada gel de secuenciación se podría correr únicamente un número reducido de muestras por la alta cantidad de estándares internos que se necesitarían.

Se cree que la razón por la cual este microsatélite presentó un mayor grado de polimorfismo puede deberse a que contiene un mayor número de repeticiones, más de 40 repeticiones, que los otros tres microsatélites utilizados (ver secuencias de microsatélites en anexos).

Aun cuando se contaba con individuos estándares internos, fue necesario realizar un gel de corrección para cada microsatélite. La idea de este gel es poder cargar todos aquellos individuos cuya identidad no sea certera, ya sea porque las bandas que presentaba estaban muy tenues o porque se carecía de un estándar interno adecuado para identificarlo con certeza. Estos geles de corrección fueron necesarios principalmente para individuos con alelos muy poco frecuentes, o alelos que surgieron después de que los estándares ya estuvieran asignados. En la mayoría de los casos, estos alelos tardíos correspondían también a los alelos poco frecuentes.

Como una segunda opción para el cuarto microsatélite que se buscaba se utilizó el 2-25. Al igual que con el anterior, lo primero fue optimizar y adaptar la metodología en la mejor forma posible a este nuevo locus. El primer paso consistió en adaptar el programa BLACK de PCR. La temperatura inicial de hibridización que se utilizó fue 55°C.

Al realizarse las primeras pruebas con los individuos amplificados para el 2-25 se notó que éste poseía un menor tamaño (ver figura 9), comparado con los otros tres microsatélites, por lo que fue necesario correr el gel durante menor tiempo, 1 hora 40 minutos. Nótese que para el menor tamaño de los alelos presentados por este microsatélite hizo necesario leer otros fragmentos más pequeños del marcador molecular pBR322 Hae III, para que todos los alelos estuvieran dentro de los puntos extremos de la regresión lineal.

Para lograr aumentar la eficiencia en el procesamiento de los datos, se buscó correr dos microsatélites en un mismo gel. Se puede notar, de los cuadros 12 y 14 y en la figura 10, que existe muy poco o casi ningún traslape entre los alelos presentados para los microsatélites 2-14 y el 2-25. Esto promovió hacer pruebas para cargar individuos amplificados para el locus 2-14, junto con individuos amplificados para el 2-25. La prueba consistió en cargar un pozo con el producto de ambos microsatélites, luego un pozo con el producto del 2-14 y finalmente uno con el producto del 2-25. Esto se hizo para varios individuos en un mismo gel. El resultado fue satisfactorio, ya que no se notó ningún efecto adverso al correr ambos microsatélites en el mismo pozo. Al medir las distancias de migración para los loci individuales y para los que compartían un mismo pozo no se notó alguna diferencia. Gracias a esto fue posible correr la mayor parte de individuos amplificados para el 2-14 y 2-25 en un mismo pozo. Esto redujo la cantidad de geles necesarios para procesar todos los individuos con los 4 microsatélites en una cuarta parte.

Figura 7

Electroforesis para secuenciar para Cosalapa con el microsatélite 4-54, temperatura de hibridización 52°C

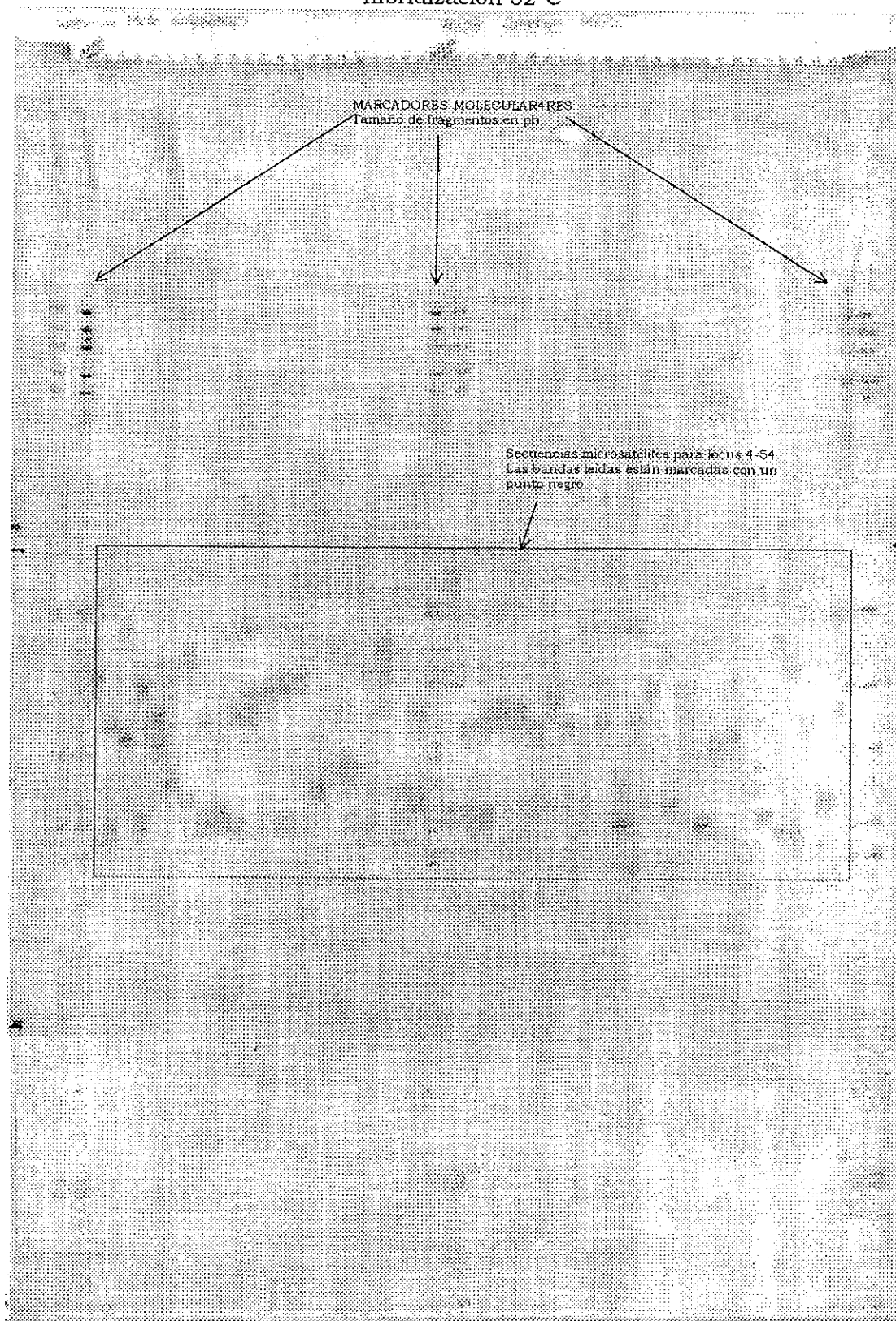


Figura 8  
Electroforesis para secuenciar para Cosalapa, microsatélite 4-54, con temperatura de  
hibridización 57°C

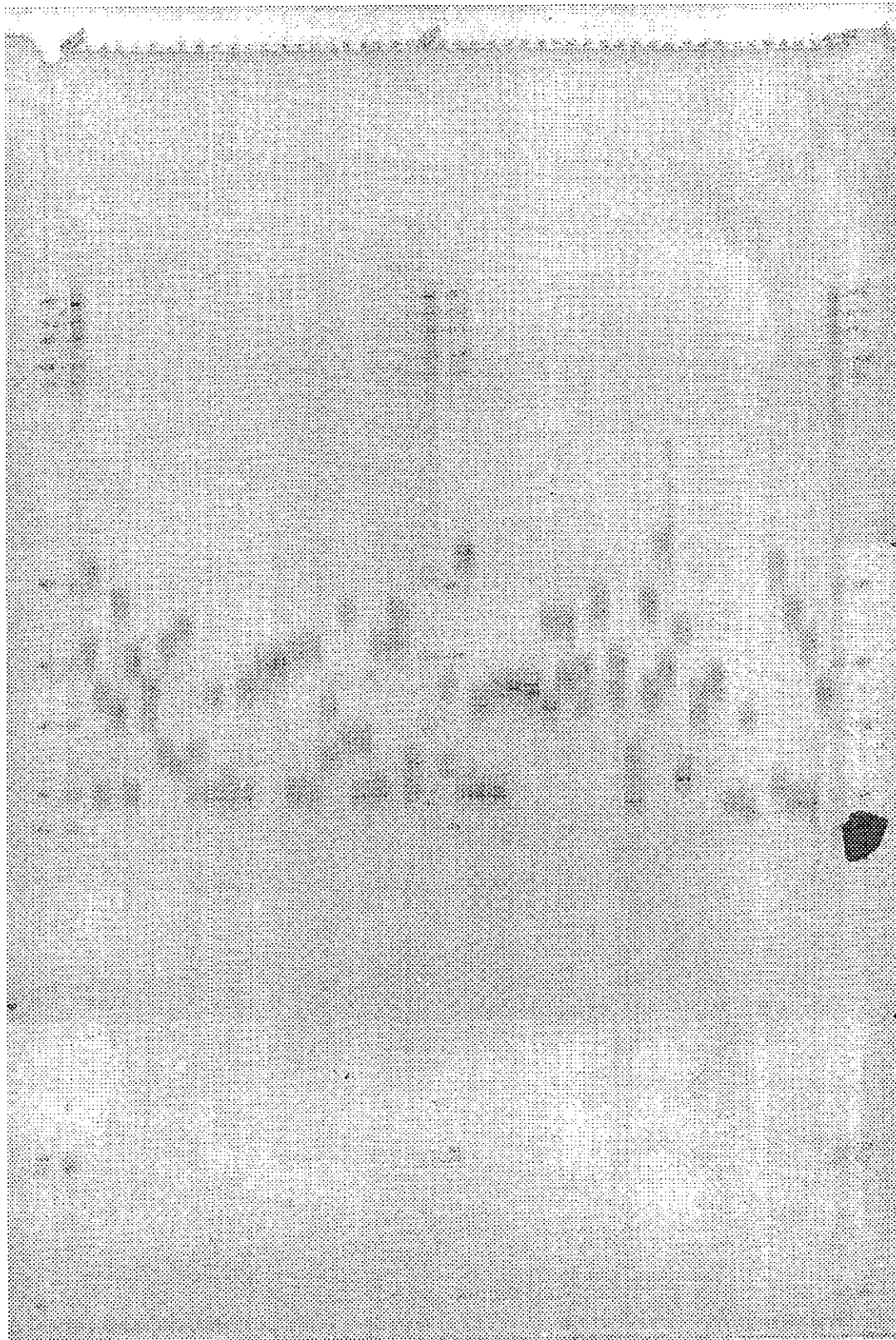


Figura 9  
Gel para secuenciar para las poblaciones Santa Lucía y San Alfredo,  
con el microsatélite 2-25

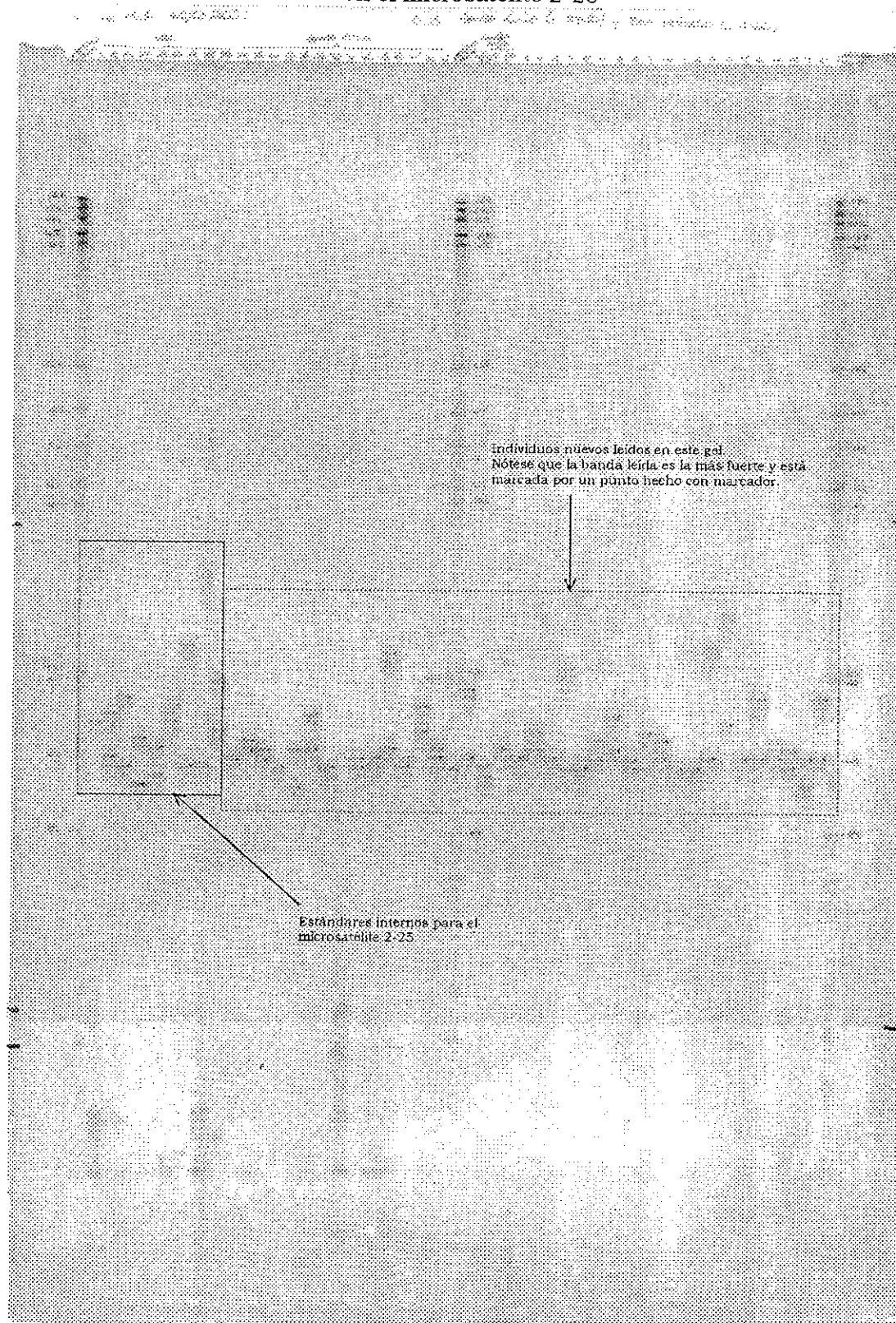
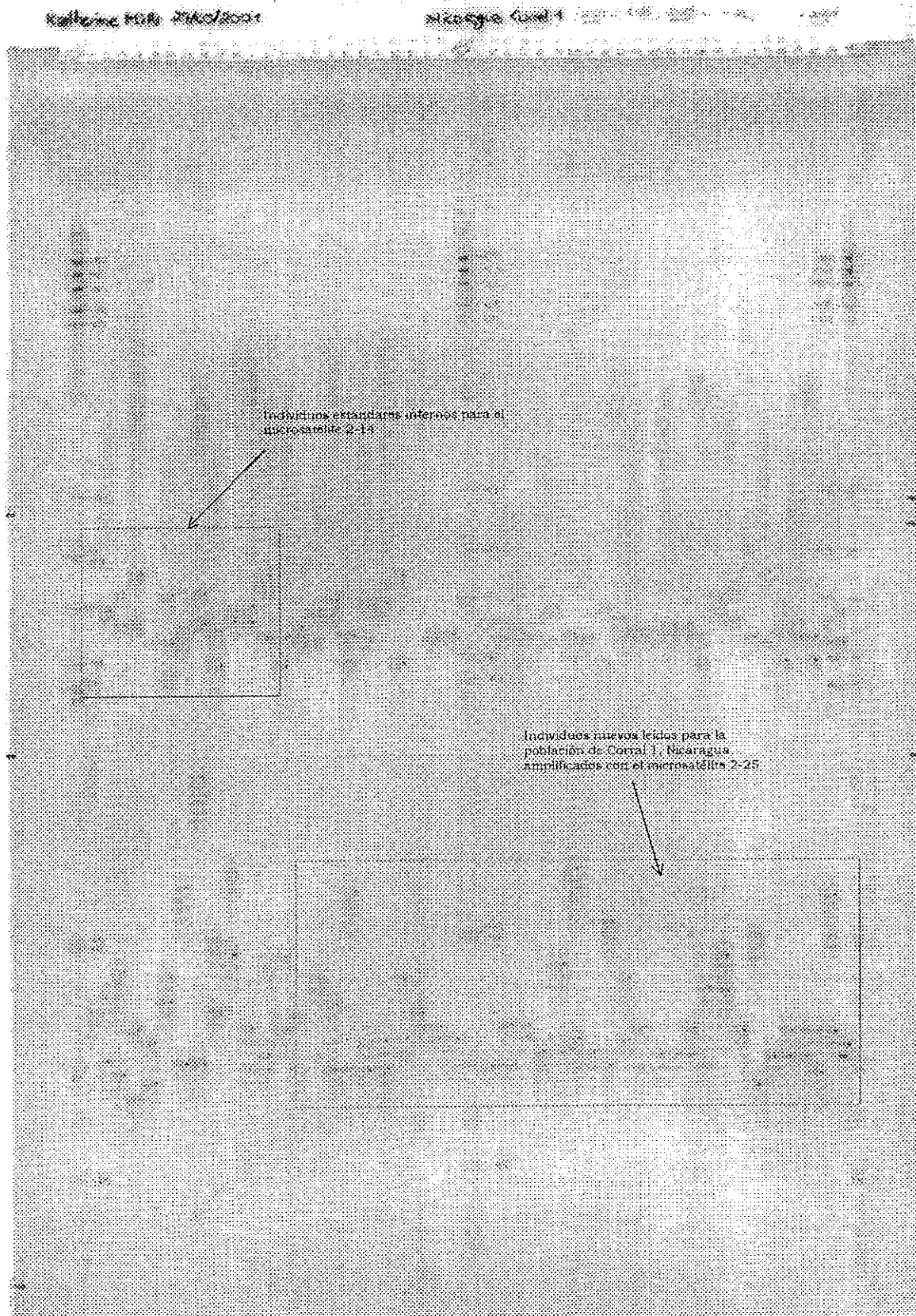


Figura 10  
Gel para secuenciar para la población Corral 1 para los microsátelites 2-14 y 2-25



## B. Frecuencias alélicas por población de los individuos estudiados

Es necesario determinar qué número de individuos pudieron ser amplificados y por lo tanto estudiados e incluidos en los análisis.

En el cuadro 9 se muestran las regiones de colecta, fecha de colección y número de individuos por colecta. Además, se presenta el número de individuos que se amplificaron con PCR y a los cuales le fue posible determinar el genotipo y tamaño de los alelos para cada uno de los microsatélites trabajados.

Es importante mencionar que los individuos de Guatemala, los microsatélites 1-90, 2-14 y 6-41, fueron procesados y analizados en su mayoría por Schoua (2000). En el presente trabajo se revisaron los datos, especialmente los individuos con alelos nulos y los homocigotos del 2-14. Se encontró que fue posible identificar la mayoría de alelos nulos, utilizando como base de comparación alelos conocidos, y que muchos de los individuos homocigotos eran en realidad heterocigotos.

Los alelos nulos son aquellos que no pueden ser amplificados por PCR, causados por mutaciones en el sitio de unión del iniciador. Esta mutación no permite una hibridización adecuada del iniciador con su secuencia complementaria, por lo que la amplificación no puede llevarse a cabo. Los alelos nulos pueden llevar a falsas suposiciones de una falta de heterocigotos o un exceso de homocigotos, lo cual puede desviar el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Además, se corrigieron algunos datos con el microsatélite 1-90, ya que se anuló el alelo 153.23, porque se comprobó que éste era igual al 153.85. Por esta razón todos los individuos que presentaban los alelos 153.23 y 153.85 se agruparon bajo el número 153.85. Para el microsatélite 6-41 también se corrigieron algunos datos. El alelo 189.4 se anuló, y los individuos que estaban asignados a este alelo se pasaron al alelo 190.19, para las poblaciones de Champona, El Motor, Nahuá, Puente Blanco, San Luis Petén y San Luis Petén, Buenaventura. En las poblaciones de Cuto y Tallado, los individuos con el alelo 189.4 se pasaron al alelo 187.82. Estos cambios se hicieron al correr individuos de las distintas poblaciones mencionadas en un mismo gel de secuenciación, junto con estándares internos para los alelos 187.82 y 190.19. La necesidad de correr este nuevo gel de corrección se vio después de correr en varios geles distintos los individuos

asignados como estándares internos para los alelos 187.82, 189.4 y 190.19, y notar que los alelos 189.4 y 190.19 migraban a la misma distancia en todos los geles.

Después de hacer estas correcciones se volvió a efectuar el análisis para el equilibrio de Hardy-Weinberg. Esta vez se notó una mejora en los resultados, ya que varias poblaciones que presentaban desequilibrio en Schoua (2000), ahora están en equilibrio. Se logró establecer el equilibrio para el microsatélite 2-14 en las poblaciones de San Luis Buenaventura, Ruperto 27/3/96, Ruperto 4/10/95 y Cuto. Además, se logró establecer el equilibrio para las poblaciones de Lauro 27/3/96 y El Motor, para los microsatélites 1-90 y 6-41, respectivamente.

Nótese que para el microsatélite 6-41, aparentemente no se encontraron alelos nulos, aunque no se puede descartar la posibilidad que algunos homocigotos hayan tenido un alelo nulo, y en realidad sean heterocigotos. Para el microsatélite 1-90 únicamente se encontró un individuo en Guatemala, población de Cuto, con alelos nulos. Sin embargo, para el microsatélite 2-14 se detectaron 6 individuos con alelos nulos, de los cuales 3 se encontraron en Tallado (Guatemala), 1 en Bananito (Costa Rica) y 1 en el Corral 2 (Nicaragua). Y por último, para el microsatélite 2-25 se encontraron 14 individuos con alelos nulos. De estos 14 individuos, 12 se encontraron en Guatemala, de los cuales 5 pertenecen a la población de Nahuá, y sólo uno en 7 poblaciones. Los otros dos alelos nulos fueron encontrados en Bananito (Costa Rica) y San Diego (El Salvador).

El número de individuos con alelos nulos para el microsatélite 2-14 corresponde a menos del 1% (0.63%) del total de individuos, y al 1.48% para el microsatélite 2-25. Debido a que la mayor parte de las poblaciones resultó en equilibrio de Hardy-Weinberg (como se verá más adelante) para los cuatro loci analizados, se asume que no hay gran cantidad de alelos nulos.

Cuadro 9

Región de cada sitio de colecta, fecha de colecta, fecha de colección, número de individuos por microsatélite positivos para PCR y a los que fue posible determinarles el genotipo y el tamaño de los alelos

Sitio de Colección	Fecha de colección	Número de individuos	Individuos que resultaron + para PCR y con alelos identificados											
			1-90			2-14			2-25			6-41		
			PCR +	Genotipo identificado	PCR +	Genotipo identificado	PCR +	Genotipo identificado	PCR +	Genotipo identificado				
<b>Guatemala</b>		<b>422</b>	<b>422</b>	<b>421</b>	<b>421</b>	<b>421</b>	<b>421</b>	<b>420</b>	<b>420</b>	<b>422</b>	<b>422</b>	<b>422</b>		
Champona	11/3/96	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37		
Cuto	37/3/96	48	47	48	48	48	48	48	48	48	48	48		
El Mango	28/2/1996	32	32	32	31	32	32	32	32	32	32	32		
El Motor	20/2/96	48	48	48	47	48	48	48	48	48	48	48		
Lauro	27/3/96	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14		
Lauro	7/6/1995	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
Nahuá	13/3/96	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24		
Puente Blanco	21/2/96	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48		
Ruperto	27/3/96	16	16	16	16	16	16	15	15	16	16	16		
Ruperto	4/10/95	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48		
San Luis Petén	12/3/96	31	31	31	30	31	31	31	31	31	31	31		
San Luis Petén Buenaventura	12/3/96	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23		
Tallado	7/2/95	40	40	40	40	40	37	39	39	40	40	40		
<b>México</b>		<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>		
Cosalapa	1/12/98	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50		
Zapata	1/12/98	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50		
Nueva Independencia	19/11/98	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50		
<b>El Salvador</b>		<b>149</b>	<b>149</b>	<b>149</b>	<b>149</b>	<b>149</b>	<b>149</b>	<b>148</b>	<b>148</b>	<b>149</b>	<b>149</b>	<b>149</b>		
San Alfredo	21/10/98	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50		
San Diego	21/10/98	49	49	49	49	49	49	48	48	49	49	49		
Santa Lucía	21/10/98	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50		
<b>Nicaragua</b>		<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>149</b>	<b>149</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>		
Corral 1	24/9/98	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50		
Corral 2	24/9/98	50	50	50	50	50	50	49	49	50	50	50		
Corral 3	30/9/98	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50		
<b>Costa Rica</b>		<b>120</b>	<b>120</b>	<b>120</b>	<b>120</b>	<b>120</b>	<b>120</b>	<b>119</b>	<b>119</b>	<b>120</b>	<b>120</b>	<b>120</b>		
Bananito	13/4/99	60	60	60	60	60	60	59	59	60	60	60		
Batán	13/4/99	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60		

En el cuadro que se presenta a continuación (cuadro 10) se observan los alelos que se obtuvieron para las distintas poblaciones con el microsatélite 1-90. Este cuadro se complementa con el cuadro 11 y la gráfica 1 en las siguientes páginas que muestran las frecuencias para estos mismos alelos. De la gráfica se ven claramente que el locus 1-90 presentó 23 alelos distintos entre todas las poblaciones. La mayoría de alelos difieren entre sí por aproximadamente 2pb. Y el patrón de frecuencias que forman se asemeja a una curva de distribución normal.

Los errores en la replicación, conocidos como deslices de la ADN polimerasa pueden agregar o eliminar una repetición de la secuencia microsatélite (Hancock, 1999; Eisen, 1999). Debido a esto se crean microsatélites que se diferencian por aproximadamente 2pb. La razón por la cual existe un microsatélite más frecuente que los demás aun no se conoce, pero se cree que podría deberse a un "cuello de botella" que ocurrió hace mucho tiempo (Eisen, 1999). Después de esta selección se asumiría que sobrevivieron mayormente los individuos con el microsatélite más frecuente y que de éste se derivaron todos los demás.

Nótese que los alelos más frecuentes se presentan en la parte baja de la gráfica 1, es decir, en los menores tamaños de alelos. Además, es importante hacer ver que la distribución pareciera tener una cola, con los valores más altos de peso molecular para los alelos en esta región. Esta tendencia hacia los pesos mayores de los alelos poco frecuentes podría pensarse que se debe a que los errores de adición de repeticiones son más probables a generar mayor diversidad de alelos, que los alelos de pequeño tamaño, porque la probabilidad de deslizamiento por parte de la ADN polimerasa sería mayor.

Una curva similar de distribución casi normal para las frecuencias alélicas se puede observar en los otros 3 microsatélites también. Esto se puede ver en los cuadros 13, 15 y 17 y gráficas 8, 15 y 22. Es importante notar que para el microsatélite 2-14 se presenta un número similar (25) de alelos observados que para el 1-90 (23). Mientras que para el microsatélite 6-41 se presenta un número menor (13) de alelos observados, y para el 2-25 se observó un número bastante mayor de alelos (36). Esto podría llevarnos a pensar que, al aumentar el número de repeticiones del microsatélite, incrementa el polimorfismo.

Los microsatélites que se trabajaron podrían sugerir esto (ver número de repeticiones reportadas en anexos), aunque no se conoce con certeza el número de repeticiones que se tiene para cada uno. Estos microsatélites se secuenciaron a partir de un solo

individuo, por lo que es probable que la secuencia reportada no corresponda a la más frecuente. La única forma de poder concluir que el polimorfismo aumenta con el número de repeticiones, sería secuenciando los alelos más frecuentes para cada microsatélite y determinando el número de repeticiones que contiene.

Debido a que las colectas por país, a excepción de Guatemala, se encuentran muy cercanas entre sí, se espera que no exista una diferencia significativa entre las frecuencias de las colectas. Debido a que para Guatemala se realizaron varias colectas en distintas regiones, se espera que las colectas dentro de la misma región sean similares entre sí, no así las frecuencias entre colectas de distintas regiones. Los datos se presentan como cuadros de frecuencias por población, por país y para el total de individuos analizados. Además se presentan gráficas que ilustran los cuadros de frecuencias para cada uno de los niveles (colecta, país y total), para visualizar cualquier diferencia en frecuencias alélicas que puedan presentarse en cada uno de los niveles.

Las frecuencias totales calculadas, que incluyen todos los individuos, son frecuencias absolutas. Esto quiere decir que se divide el número encontrado para un alelo determinado y se divide dentro del número total de alelos observados para el microsatélite en cuestión.

En el cuadro 11 se muestran las frecuencias alélicas obtenidas para el microsatélite 1-90. Nótese que para la mayoría de las poblaciones el alelo más frecuente fue el 153.85. Solamente para Batán, en Costa Rica, el alelo más frecuente fue el 166.75, mientras que para Zapata, en México, el más frecuente fue el 160.17; y para Nahuá, Puente Blanco y San Luis Petén, Buenaventura, en Guatemala, el alelo más frecuente es el 155.72. Es importante mencionar también, que entre los alelos menos frecuentes para el microsatélite 1-90 se observa el 165.71. En la gráfica 1 se puede notar que este alelo se encuentra dentro de la región de alelos de alta de frecuencia. Si se analiza más detalladamente este alelo, se puede ver que está flanqueado por los alelos 164.09 y 166.75. La diferencia entre estos últimos dos alelos es de aproximadamente 2.6pb; y la diferencia entre 165.71 y 166.75 es casi 1pb. Esto podría sugerir que el alelo 165.71 es producto de una mutación puntual, que no es tan frecuente como el deslizamiento de replicación. Por supuesto, es necesario determinar la secuencia de este alelo, junto con otros más frecuentes, para determinar si en realidad se debe a una mutación puntual.

Cuadro 10a  
Alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90

Alelos	Poblaciones de Costa Rica			Poblaciones de Nicaragua			Poblaciones de México				Poblaciones de El Salvador			
	Total del país		Total del país	Total del país			Nueva	Total del país	Poblaciones de El Salvador			Total del país		
	Bananito	Batan		Corral 1	Corral 2	Corral 3			Alfredo	San Diego	Santa Lucía			
142.51	1	-	-	-	-	-	1	2	3	2	-	-	1	3
145.43	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
146.72	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
148.97	-	-	2	1	2	5	2	2	6	2	-	-	2	4
151.39	26	24	12	10	13	35	6	7	15	10	7	10	29	27
153.85	27	28	25	28	25	78	30	15	26	18	28	29	16	75
155.72	9	12	9	17	11	37	10	16	44	14	23	16	10	53
157.71	9	5	5	7	16	28	6	13	30	4	3	10	17	17
160.17	6	2	9	9	9	27	19	18	51	17	8	6	31	31
162.11	11	9	8	3	6	17	4	9	19	7	10	12	29	29
164.09	4	4	4	7	2	13	6	3	15	3	3	4	10	10
165.71	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-
166.75	18	30	9	4	3	16	6	8	18	8	8	4	20	20
169	2	2	5	3	-	8	-	1	4	4	-	4	8	8
170.83	5	3	5	6	5	16	6	1	9	4	-	-	4	4
172.91	1	-	2	2	4	8	1	1	4	2	1	1	4	4
174.3	-	1	2	-	2	4	3	2	5	1	2	-	3	3
177.13	1	-	2	1	-	3	-	-	1	2	1	1	4	4
178.57	-	-	-	1	-	-	1	-	2	2	-	-	2	2
180.74	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-
185.79	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2	-	2	2
187.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1
190.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1

Nota: El signo "-" representa que no se encontró el alelo para la población en cuestión.

Cuadro 10b  
Alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90 (continuación)

Alelos	Región Norte					Región Sur					Región Este			Total		
	Cham- pona	Mahuá	SL Petén	SLP Buen	Total región	Lauro 27/3	El Mango	Rup 4/10	Rup 27/3	Tallado	Total región	Puente Blanco	El Motor		Total región	Guatemala
142.51	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2	-	2	4	11
145.43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
146.72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
148.97	-	-	-	1	1	-	-	2	3	1	6	1	-	1	8	23
151.39	12	-	6	3	21	5	3	6	-	5	23	4	6	10	54	181
153.85	13	3	17	6	39	7	22	34	11	26	130	17	26	43	212	491
155.72	10	18	2	10	40	-	12	9	5	8	53	30	18	48	141	296
157.71	5	4	8	3	20	5	12	10	1	18	69	8	10	18	107	196
160.17	9	3	7	3	22	1	-	14	2	-	18	12	7	19	59	176
162.11	8	10	12	6	36	3	4	5	1	7	39	5	13	18	93	178
164.09	4	-	5	4	13	3	3	12	3	4	35	-	3	3	51	97
165.71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
166.75	2	5	-	-	7	1	6	3	4	3	19	9	3	12	38	140
169	-	-	2	-	2	-	1	-	-	3	7	-	-	-	9	33
170.83	9	4	3	5	21	1	1	-	-	-	5	5	4	9	35	72
172.91	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	5	-	-	-	6	23
174.3	-	-	-	3	3	1	-	-	-	1	3	1	6	7	13	26
177.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2	2	11
178.57	1	1	-	2	4	2	-	-	-	2	5	-	-	-	9	14
180.74	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	1	2
185.79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
187.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
190.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

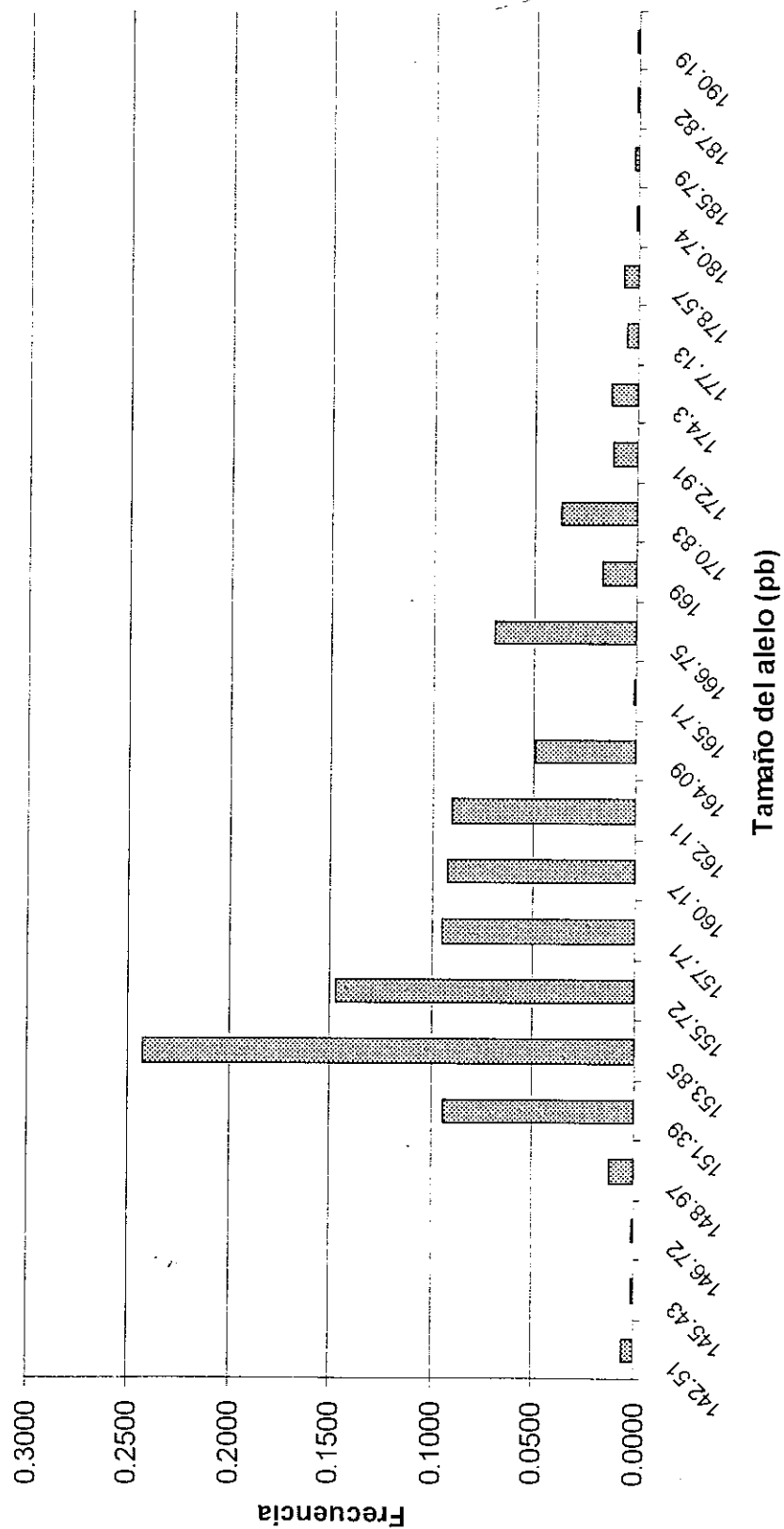
Cuadro 11a  
Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90

Alelos	Poblaciones de Costa Rica			Poblaciones de Nicaragua			Poblaciones de México			Poblaciones de El Salvador					
	Bananito	Batan	Total del país	Corral 1	Corral 2	Corral 3	Total del país	Cosalapa	Zapata	Nueva Indep	Total del país	San Alfredo	San Diego	Santa Lucia	Total del país
142.51	0.004	-	0.004	-	-	-	-	-	0.010	0.020	0.010	0.020	-	0.010	0.010
145.43	-	-	-	0.010	-	-	0.003	-	0.010	-	0.003	-	-	-	-
146.72	-	-	-	-	0.010	-	0.003	-	-	-	-	-	-	-	-
148.97	-	-	-	0.020	0.010	0.020	0.017	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020	-	0.020	0.013
151.39	0.217	0.200	0.208	0.120	0.100	0.130	0.117	0.060	0.070	0.020	0.050	0.100	0.071	0.100	0.091
153.85	<b>0.225</b>	0.233	<b>0.229</b>	<b>0.250</b>	<b>0.280</b>	<b>0.250</b>	<b>0.260</b>	<b>0.300</b>	0.150	<b>0.260</b>	<b>0.237</b>	<b>0.180</b>	<b>0.286</b>	<b>0.290</b>	<b>0.252</b>
155.72	0.075	0.100	0.088	0.090	0.170	0.110	0.123	0.100	0.160	0.180	0.147	0.140	0.235	0.160	0.178
157.71	0.075	0.042	0.058	0.050	0.070	0.160	0.093	0.060	0.130	0.110	0.100	0.040	0.031	0.100	0.057
160.17	0.050	0.017	0.033	0.090	0.090	0.090	0.090	0.190	<b>0.180</b>	0.140	0.170	0.170	0.082	0.060	0.104
162.11	0.092	0.075	0.083	0.080	0.030	0.060	0.057	0.040	0.090	0.060	0.063	0.070	0.102	0.120	0.097
164.09	0.033	0.033	0.033	0.040	0.070	0.020	0.043	0.060	0.030	0.060	0.050	0.030	0.031	0.040	0.034
165.71	-	-	-	-	-	0.020	0.007	-	-	-	-	-	-	-	-
166.75	0.150	<b>0.250</b>	0.200	0.090	0.040	0.030	0.053	0.060	0.080	0.040	0.060	0.080	0.082	0.040	0.067
169	0.017	0.017	0.017	0.050	0.030	-	0.027	-	0.010	0.030	0.013	0.040	-	0.040	0.027
170.83	0.042	0.025	0.033	0.050	0.060	0.050	0.053	0.060	0.010	0.020	0.030	0.040	-	-	0.013
172.91	0.008	-	0.004	0.020	0.020	0.040	0.027	0.010	0.010	0.020	0.013	0.020	0.010	0.010	0.013
174.3	-	0.008	0.004	0.020	-	0.020	0.013	0.030	0.020	-	0.017	0.010	0.020	-	0.010
177.13	0.008	-	0.004	0.020	0.010	-	0.010	-	-	0.010	0.003	0.020	0.010	0.010	0.013
178.57	-	-	-	-	0.010	-	0.003	0.010	-	0.010	0.007	0.020	-	-	0.007
180.74	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	-	0.003	-	-	-	-
185.79	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	-	0.003	-	0.020	-	0.007
187.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	-	0.003
190.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	-	0.003

Cuadro 11b  
Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90 (continuación)

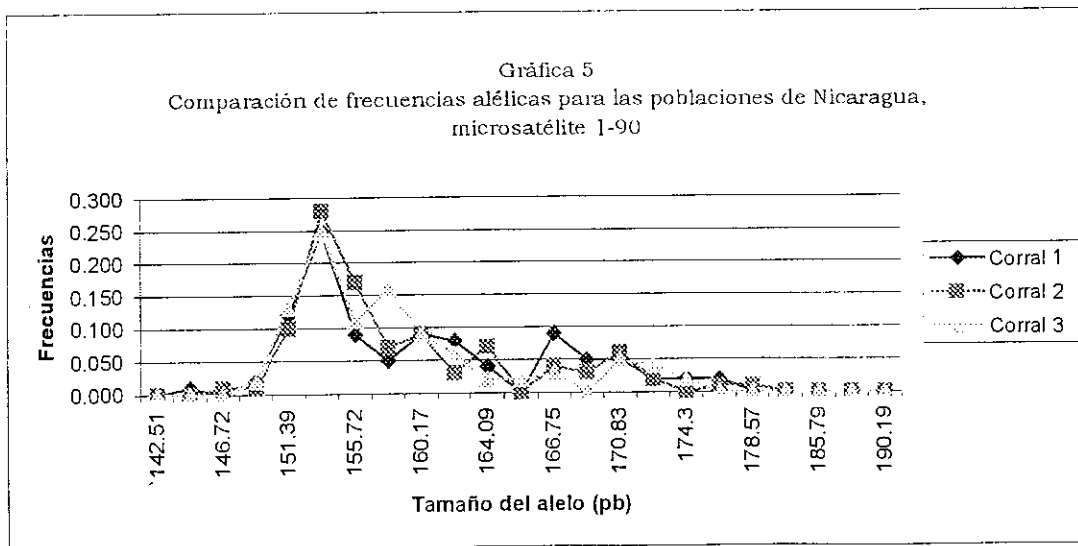
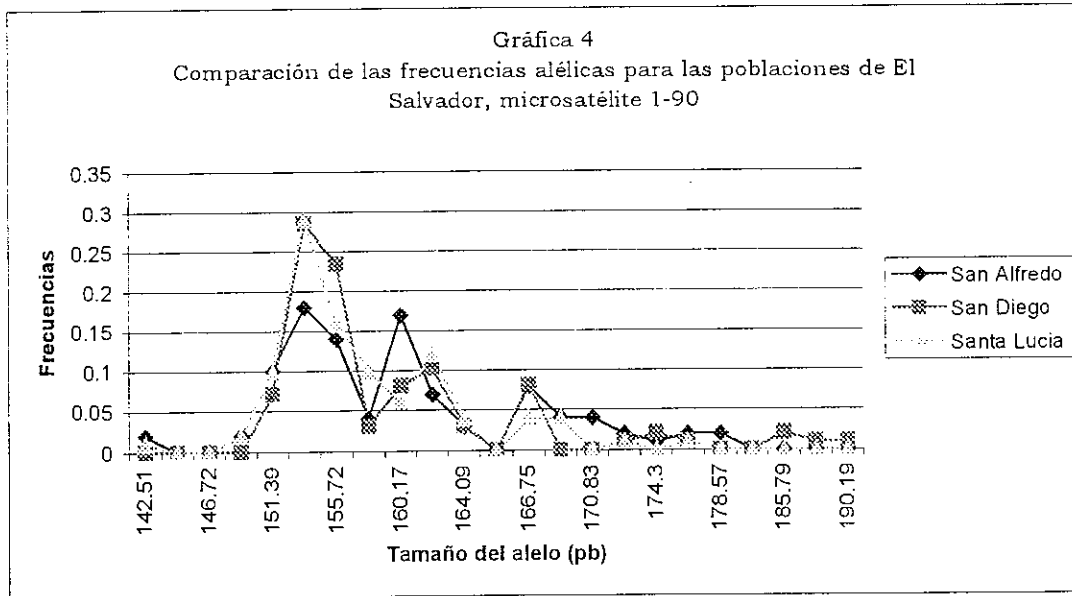
Alelos	Región del Norte						Región del Sur						Región Este			Guatemala Total		
	Cham- pona	Nahuá	SL Petén	SLP Buen	Total región	Cuto	Lauro 7/6	Lauro 27/3	El Mango	Rup 4/10	Rup 27/3	Tallado	Total región	Puente Blanco	El Motor		Total región	
142.51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.031	0.013	0.005	0.021	-	0.010	0.005	0.006
145.43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001
146.72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001
148.97	-	-	-	0.022	0.004	-	-	-	-	0.021	0.094	0.013	0.014	0.010	-	0.005	0.009	0.012
151.39	0.162	-	0.097	0.065	0.091	0.042	-	0.179	0.047	0.063	-	0.063	0.055	0.042	0.063	0.052	0.064	0.091
153.85	<b>0.176</b>	0.063	<b>0.274</b>	0.130	0.170	<b>0.219</b>	<b>0.346</b>	<b>0.250</b>	<b>0.344</b>	<b>0.354</b>	<b>0.344</b>	<b>0.325</b>	<b>0.308</b>	0.177	<b>0.271</b>	0.224	<b>0.251</b>	<b>0.248</b>
155.72	0.135	<b>0.375</b>	0.032	<b>0.217</b>	<b>0.174</b>	0.146	0.192	-	0.188	0.094	0.156	0.100	0.126	<b>0.313</b>	0.188	<b>0.250</b>	0.167	0.149
157.71	0.068	0.083	0.129	0.065	0.087	0.208	0.115	0.179	0.188	0.104	0.031	0.225	0.164	0.083	0.104	0.094	0.127	0.099
160.17	0.122	0.063	0.113	0.065	0.096	-	0.038	0.036	-	0.146	0.063	-	0.043	0.125	0.073	0.099	0.070	0.089
162.11	0.108	0.208	0.194	0.130	0.157	0.167	0.115	0.107	0.063	0.052	0.031	0.088	0.092	0.052	0.135	0.094	0.110	0.090
164.09	0.054	-	0.081	0.087	0.057	0.094	0.038	0.107	0.047	0.125	0.094	0.050	0.083	-	0.031	0.016	0.060	0.049
165.71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001
166.75	0.027	0.104	-	-	0.030	0.021	0.038	-	0.094	0.031	0.125	0.038	0.045	0.094	0.031	0.063	0.045	0.071
169	-	-	0.032	-	0.009	0.031	-	-	0.016	-	-	0.038	0.017	-	-	-	0.011	0.017
170.83	0.122	0.083	0.048	0.109	0.091	-	0.038	0.107	0.016	-	-	-	0.012	0.052	0.042	0.047	0.041	0.036
172.91	0.014	-	-	-	0.004	0.021	-	-	-	0.010	0.031	0.013	0.012	-	-	-	0.007	0.012
174.3	-	-	-	0.065	0.013	0.010	0.038	-	-	-	-	0.013	0.007	0.010	0.063	0.036	0.015	0.013
177.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.021	-	0.010	0.002	0.006
178.57	0.014	0.021	-	0.043	0.017	0.021	-	0.036	-	-	-	0.025	0.012	-	-	-	0.011	0.007
180.74	-	-	-	-	-	-	0.038	-	-	-	-	-	0.002	-	-	-	0.001	0.001
185.79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.002
187.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001
190.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001

Gráfica 1  
Frecuencias de alelos obtenidos para todos los países con el microsatélite 1-90



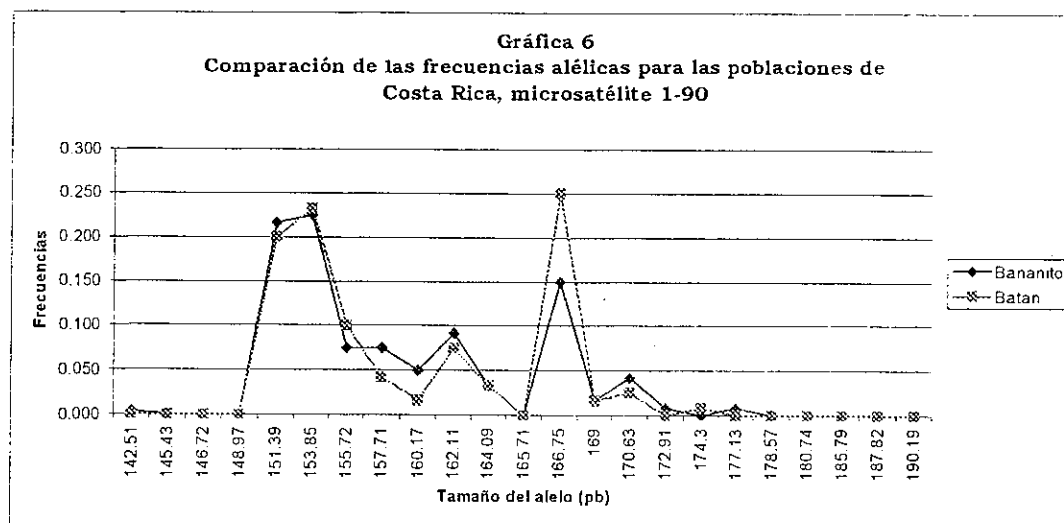


La gráfica 4 muestra la distribución de frecuencias para el alelo 1-90 en El Salvador. En la población de San Alfredo se puede observar un ensanchamiento de la región de alta frecuencia alélica de la curva de distribución de frecuencias para el microsatélite 1-90, debido a que el alelo 160.17 es casi tan frecuente como el 153.85. Por otro lado, el alelo 155.72 parece ser bastante más frecuente para San Diego comparado con las otras dos poblaciones.

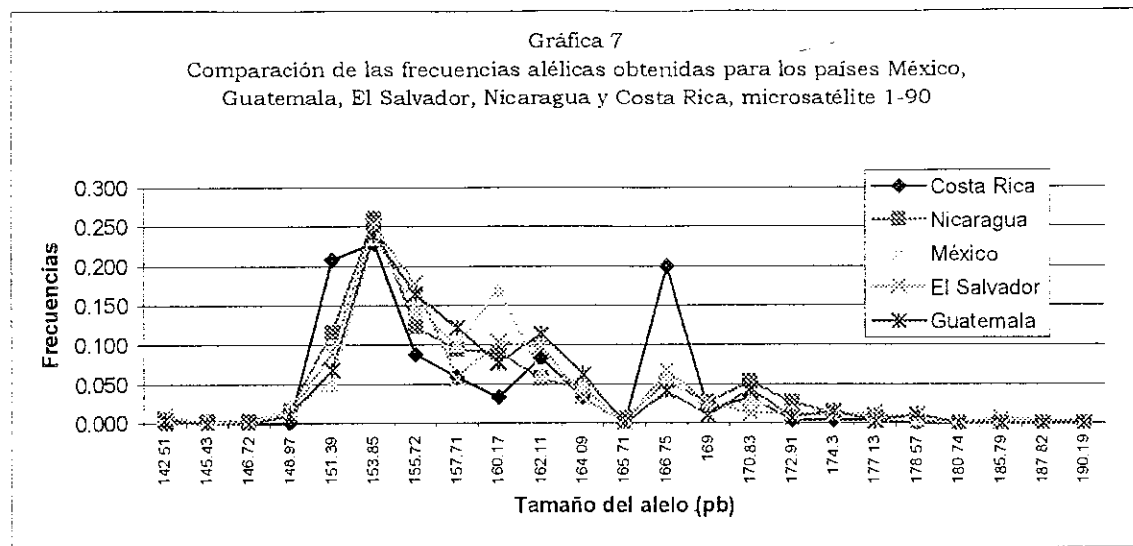


En la gráfica 5 se presentan las frecuencias alélicas para las poblaciones de Nicaragua con el microsatélite 1-90. Las tres poblaciones parecen tener una distribución muy similar, con la diferencia que alelo 157.71 muestra el doble de la frecuencia para el Corral 3 comparado con las otras dos poblaciones y el alelo 166.75 es dos veces más frecuente para el Corral 1, comparado con las otras dos poblaciones. Para el Corral 2 se nota una diferencia en frecuencia en el alelo 155.72, respecto de las frecuencias observadas para las otras poblaciones de Nicaragua.

En el cuadro 11, se puede notar que en promedio la frecuencia alélica más alta corresponde al alelo 153.85. Sin embargo, para Costa Rica se observa un segundo alelo, el 166.75, con una frecuencia similar, y aun más elevada que la del primero para la población de Batán (gráfica 6). Otra característica importante es que la distribución de Costa Rica para el locus 1-90 no sigue el patrón de frecuencias establecido por los demás países. Nótese que la distribución de frecuencias alélicas para Costa Rica es muy similar entre ambas poblaciones.



En la gráfica 7 se ve que la tendencia en Nicaragua, México, Guatemala y El Salvador es muy similar, pero en Costa Rica la distribución es distinta, ya que se observan dos máximos de frecuencia alélica en los alelos 155.85 y 166.75. Además de los aspectos mencionados anteriormente, otro punto que resalta es la alta frecuencia del alelo 151.39, y la baja frecuencia del alelo 160.17 en Costa Rica, comparado con los demás países. El alelo 151.39 es prácticamente dos veces más frecuente en Costa Rica que en los demás países, mientras que el alelo 160.17 es casi la mitad de frecuente comparado con El Salvador y Guatemala, pero cuatro veces menos frecuente comparado con México.



El cuadro 12 presenta los alelos obtenidos para el microsatélite 2-14 con todas las poblaciones estudiadas y en el cuadro 13 y gráfica 8 se muestran las frecuencias obtenidas para este microsatélite.

Para este microsatélite el alelo 200.29 muestra la mayor frecuencia alélica total. Sin embargo, varias poblaciones no presentan este alelo como el más habitual. Por ejemplo, el alelo más común para las poblaciones de Corral 1 y San Diego es el 201.83, para Cosalapa es el 204.96, y para Nueva Independencia es el 206.54. Luego, tres poblaciones muestran dos alelos con la misma frecuencia mayor. Estas poblaciones son Corral 3, con los alelos 200.29 y 201.83, Zapata con los alelos 200.29 y el 204.96, y Lauro con los alelos 201.83 y 204.96. Para Guatemala el alelo más frecuente en la mayoría de poblaciones para el microsatélite 2-14 es el 201.83. Pero también se encuentran poblaciones en las que otros alelos son los principales, como por ejemplo Cuto, Puente Blanco y Ruperto 27/3, que presentan altas incidencias para el 200.29, 200.29 y 204.96, respectivamente.

Además, en el microsatélite 2-14 sobresale un alelo, el 203 en la población Corral 1 de Nicaragua, que parece ser muy poco frecuente, ya que sólo se presentó una vez en esta única población. Este alelo, al igual que el 165.71, podría ser el producto de una mutación puntual de alguno de los alelos principales, ya que se encuentra en la región de alta frecuencia de alelos, y se diferencia del alelo 201.83 por aproximadamente 1pb.

Cuadro 12a  
Alelos obtenidos por población con el microsátélite 2-14

Alelos	Poblaciones de Costa Rica			Poblaciones de Nicaragua				Poblaciones de México				Poblaciones de El Salvador			
	Bananito	Batan	Total del país	Corral 1	Corral 2	Corral 3	Total del país	Cosalapa	Nueva Indep	Zapata	Total del país	San Alfredo	San Diego	Santa Lucia	Total país
186.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
188	-	-	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
189.1	1	-	1	-	1	2	3	4	3	-	7	1	-	1	2
192.7	4	7	11	11	15	6	32	7	6	5	18	8	12	5	25
195	6	1	7	-	1	2	3	1	6	3	10	4	2	4	10
197.2	1	-	1	1	1	1	3	4	-	-	4	-	1	2	3
200.3	55	72	127	19	27	21	67	6	7	22	35	30	14	22	66
201.8	30	19	49	23	14	21	58	21	8	20	49	13	19	20	52
203	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
205	7	4	11	11	14	9	34	24	18	22	64	14	15	13	42
206.5	2	3	5	8	2	9	19	16	21	9	46	9	10	10	29
208.1	6	10	16	3	8	13	24	1	11	3	15	7	7	5	19
209.7	-	-	-	4	1	1	6	3	9	7	19	2	10	5	17
212.2	-	-	-	5	1	6	12	6	5	3	14	3	3	5	11
213.8	-	1	1	-	2	4	6	2	-	-	2	-	2	1	3
215.5	1	-	1	4	4	1	9	-	-	-	-	-	-	-	-
217.1	2	-	2	-	1	-	1	3	2	-	5	3	1	3	7
220	1	-	1	4	-	-	4	-	-	3	3	1	1	1	3
221.7	-	2	2	1	2	-	3	1	-	1	2	1	-	1	2
223.9	1	-	1	1	-	1	2	-	1	1	2	-	-	1	1
225.6	1	1	2	3	1	1	5	1	1	-	2	1	-	1	2
227.9	-	-	-	-	-	2	2	-	2	-	2	2	-	-	2
229.6	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
232	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2
236.3	1	-	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 12b  
Alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14 (continuación)

Alelos	Región Norte				Región Sur						Región Este				Total			
	Cham- pona	Nahuá	SL Petén	SLP Buen	Total región	Cuto	Lauro 7/6	Lauro 27/3	El Mango	Rup 4/10	Rup 27/3	Tallado	Total región	Puente Blanco		El Motor	Total región	Guatemala
186.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
187.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
189.07	-	-	-	-	-	2	1	2	2	2	-	7	16	5	1	6	22	35
192.74	-	-	3	-	3	3	2	1	4	9	2	3	24	4	10	14	41	127
194.97	5	4	1	-	10	8	2	-	1	-	1	3	15	2	-	2	27	57
197.23	-	-	2	3	5	1	1	3	-	1	-	-	6	-	-	-	11	22
200.29	4	2	1	8	15	25	5	2	16	1	3	6	58	26	3	29	102	397
201.83	21	14	26	17	78	14	5	6	9	40	7	21	102	15	23	38	218	426
203	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
204.96	14	7	11	2	34	17	4	3	12	9	11	11	67	13	23	36	137	288
206.54	9	6	2	3	20	9	1	6	11	14	1	14	56	13	9	22	98	197
208.14	6	6	7	5	24	-	3	2	-	7	-	2	14	1	9	10	48	122
209.74	-	-	-	2	2	-	1	-	2	1	4	3	11	-	9	9	22	64
212.18	10	3	-	1	14	11	-	1	3	1	1	1	18	5	2	7	39	76
213.82	1	-	5	3	9	-	-	-	-	5	-	-	5	-	1	1	15	27
215.47	1	4	1	-	6	3	1	-	-	-	-	-	4	4	-	4	14	24
217.13	-	1	-	-	1	-	-	1	-	2	1	-	4	1	-	1	6	21
220	1	-	-	1	2	1	-	-	-	1	-	-	2	1	1	2	6	17
221.66	-	-	-	1	1	-	-	-	2	1	-	2	5	2	-	2	8	17
223.91	2	-	-	-	2	-	-	-	-	2	1	-	3	4	4	8	13	19
225.64	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	12
227.86	-	1	-	-	1	2	-	-	-	-	-	1	3	-	1	1	5	11
229.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
232.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
236.26	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	1	3

Cuadro 13a  
Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14

Alelos	Poblaciones de Costa Rica			Poblaciones de Nicaragua			Poblaciones de México				Poblaciones de El Salvador				
	Bananito	Batan	Total de país	Corral 1	Corral 2	Corral 3	Total de país	Cosalapa	Nueva Indep	Zapata	Total de país	San Alfredo	San Diego	Santa Lucia	Total de país
186.05	-	-	-	-	-	-	0.010	-	-	0.010	0.003	-	-	-	-
187.95	-	-	-	0.020	-	-	0.007	-	-	-	-	-	-	-	-
189.07	0.008	-	0.004	0.010	0.020	0.010	0.010	0.040	0.030	-	0.023	0.010	-	0.010	0.007
192.74	0.033	0.058	0.046	0.110	0.150	0.060	0.107	0.070	0.060	0.050	0.060	0.080	0.122	0.050	0.084
194.97	0.050	0.008	0.029	-	0.010	0.020	0.010	0.010	0.060	0.030	0.033	0.040	0.020	0.040	0.034
197.23	0.008	-	0.004	0.010	0.010	0.010	0.010	0.040	-	-	0.013	-	0.010	0.020	0.010
200.29	<b>0.458</b>	<b>0.600</b>	<b>0.529</b>	<b>0.190</b>	<b>0.270</b>	<b>0.210</b>	<b>0.223</b>	<b>0.060</b>	<b>0.070</b>	<b>0.220</b>	<b>0.117</b>	<b>0.300</b>	<b>0.143</b>	<b>0.220</b>	<b>0.221</b>
201.83	0.250	0.158	0.204	<b>0.230</b>	0.140	<b>0.210</b>	0.193	0.210	0.080	0.200	0.163	0.130	<b>0.194</b>	0.200	0.174
203	-	-	-	0.010	-	-	0.003	-	-	-	-	-	-	-	-
204.96	0.058	0.033	0.046	0.110	0.140	0.090	0.113	<b>0.240</b>	0.180	<b>0.220</b>	<b>0.213</b>	0.140	0.153	0.130	0.141
206.54	0.017	0.025	0.021	0.080	0.020	0.090	0.063	0.160	<b>0.210</b>	0.090	0.153	0.090	0.102	0.100	0.097
208.14	0.050	0.083	0.067	0.030	0.080	0.130	0.080	0.010	0.110	0.030	0.050	0.070	0.071	0.050	0.064
209.74	-	-	-	0.040	0.010	0.010	0.020	0.030	0.090	0.070	0.063	0.020	0.102	0.050	0.057
212.18	-	-	-	0.050	0.010	0.060	0.040	0.060	0.050	0.030	0.047	0.030	0.031	0.050	0.037
213.82	-	0.008	0.004	-	0.020	0.040	0.020	0.020	-	-	0.007	-	0.020	0.010	0.010
215.47	0.008	-	0.004	0.040	0.040	0.010	0.030	-	-	-	-	-	-	-	-
217.13	0.017	-	0.008	-	0.010	-	0.003	0.030	0.020	-	0.017	0.030	0.010	0.030	0.023
220	0.008	-	0.004	0.040	-	-	0.013	-	-	0.030	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
221.66	-	0.017	0.008	0.010	0.020	-	0.010	0.010	-	0.010	0.007	0.010	-	0.010	0.007
223.91	0.008	-	0.004	0.010	-	0.010	0.007	-	0.010	0.010	0.007	-	-	0.010	0.003
225.64	0.008	0.008	0.008	0.030	0.010	0.010	0.017	0.010	0.010	-	0.007	0.010	-	0.010	0.007
227.86	-	-	-	-	-	0.020	0.007	-	0.020	-	0.007	0.020	-	-	0.007
229.56	-	-	-	-	0.010	-	0.003	-	-	-	-	-	-	-	-
232.04	0.008	-	0.004	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	0.010	-	0.007
236.26	0.008	-	0.004	0.010	-	-	0.003	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 13b  
Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14 (continuación)

Alelos	Región Norte					Región Sur					Región Este						
	Cham- pona	Nahuá	SL Petén	SLP Buen	Total región	Lauro 7/6	Lauro 27/3	El Mango	Rup 4/10	Rup 27/3	Tallado región	Total región	Puente Blanco	El Motor	Total región	Guatemala	Total
186.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001
187.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001
189.07	-	-	-	-	-	0.038	0.071	0.031	0.021	-	0.088	0.038	0.052	0.010	0.031	0.026	0.018
192.74	-	-	0.048	-	0.013	0.077	0.036	0.063	0.094	0.063	0.038	0.057	0.042	0.104	0.073	0.049	0.064
194.97	0.068	0.083	0.016	-	0.043	0.077	-	0.016	-	0.031	0.038	0.036	0.021	-	0.010	0.032	0.029
197.23	-	-	0.032	0.065	0.022	0.038	0.107	-	0.010	-	-	0.014	-	-	-	0.013	0.011
200.29	0.054	0.042	0.016	0.174	0.065	<b>0.192</b>	0.071	<b>0.250</b>	0.010	0.094	0.075	0.137	<b>0.271</b>	0.031	0.151	0.121	0.200
201.83	<b>0.284</b>	<b>0.292</b>	<b>0.419</b>	<b>0.370</b>	<b>0.339</b>	0.146	<b>0.192</b>	0.141	<b>0.417</b>	<b>0.219</b>	<b>0.263</b>	<b>0.242</b>	0.156	<b>0.240</b>	<b>0.198</b>	<b>0.258</b>	<b>0.215</b>
203	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001
204.96	0.189	0.146	0.177	0.043	0.148	0.154	0.107	0.188	0.094	0.344	0.138	0.159	0.135	<b>0.240</b>	0.188	0.162	0.145
206.54	0.122	0.125	0.032	0.065	0.087	0.094	0.214	0.172	0.146	0.031	0.175	0.133	0.135	0.094	0.115	0.116	0.099
208.14	0.081	0.125	0.113	0.109	0.104	-	0.115	0.071	-	0.073	0.025	0.033	0.010	0.094	0.052	0.057	0.062
209.74	-	-	-	0.043	0.009	-	0.038	-	0.031	0.010	0.125	0.038	-	0.094	0.047	0.026	0.032
212.18	0.135	0.063	-	0.022	0.061	0.115	-	0.036	0.047	0.010	0.031	0.043	0.052	0.021	0.036	0.046	0.038
213.82	0.014	-	0.081	0.065	0.039	-	-	-	0.052	-	-	0.012	-	0.010	0.005	0.018	0.014
215.47	0.014	0.083	0.016	-	0.026	0.031	0.038	-	-	-	-	0.009	0.042	-	0.021	0.017	0.012
217.13	-	0.021	-	-	0.004	-	0.036	-	0.021	0.031	-	0.009	0.010	-	0.005	0.007	0.011
220	0.014	-	-	0.022	0.009	0.010	-	-	0.010	-	-	0.005	0.010	0.010	0.010	0.007	0.009
221.66	-	-	-	0.022	0.004	-	-	0.031	0.010	-	0.025	0.012	0.021	-	0.010	0.009	0.009
223.91	0.027	-	-	-	0.009	-	-	-	0.021	0.031	-	0.007	0.042	0.042	0.042	0.015	0.010
225.64	-	-	0.016	-	0.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001	0.006
227.86	-	0.021	-	-	0.004	0.021	-	-	-	-	0.013	0.007	-	0.010	0.005	0.006	0.006
229.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001
232.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.002
236.26	-	-	-	-	-	-	0.036	-	-	-	-	0.002	-	-	-	0.001	0.002

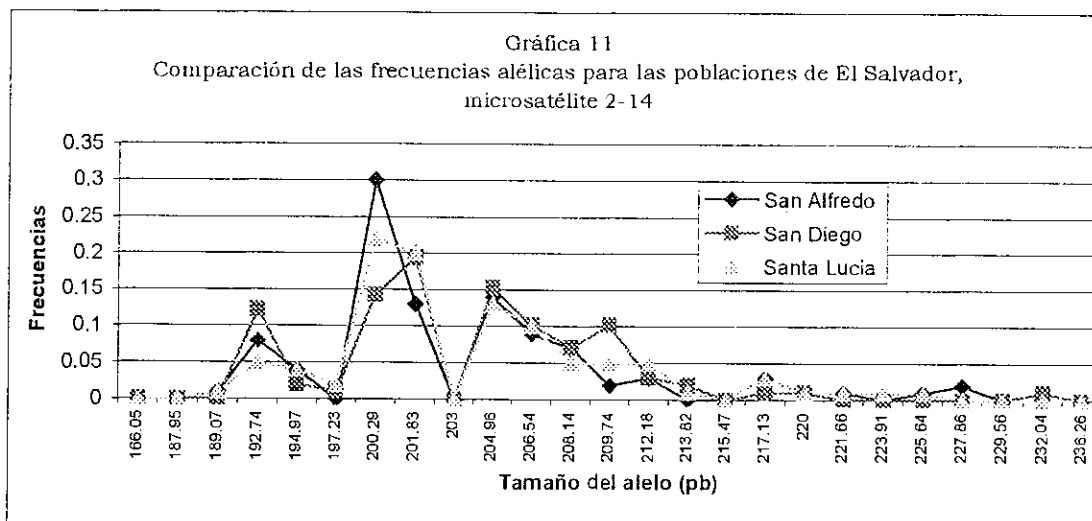
**Gráfica 8**  
**Frecuencia de los alelos obtenidos para el microsatélite 2-14**



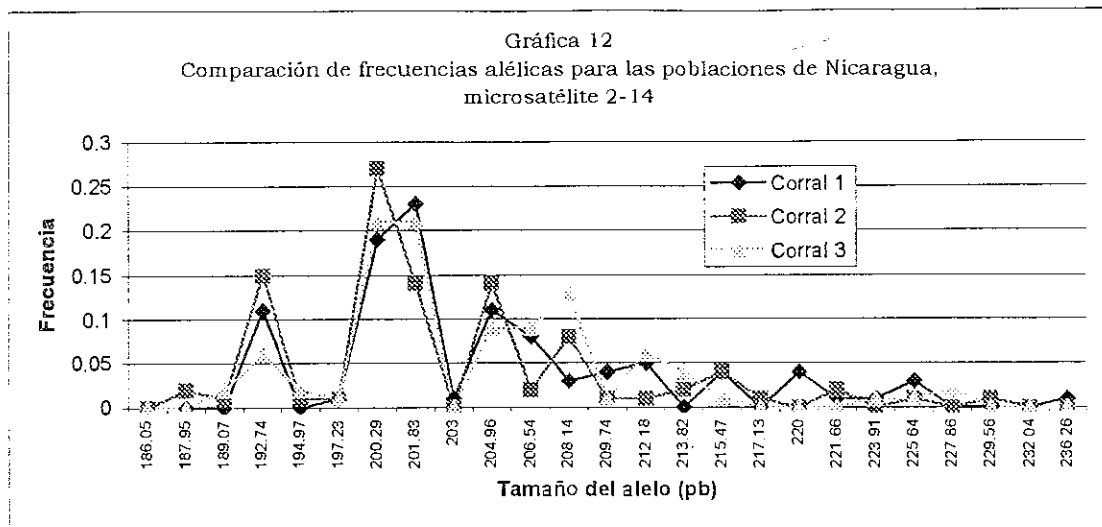


En la gráfica 10 se puede observar que en Guatemala la frecuencia de los alelos es muy distinta para las poblaciones. Aquí tampoco parecería haber algún patrón específico por región de colecta, ya que Cuto y Puente Blanco sugieren tener la misma distribución y son de regiones distintas.

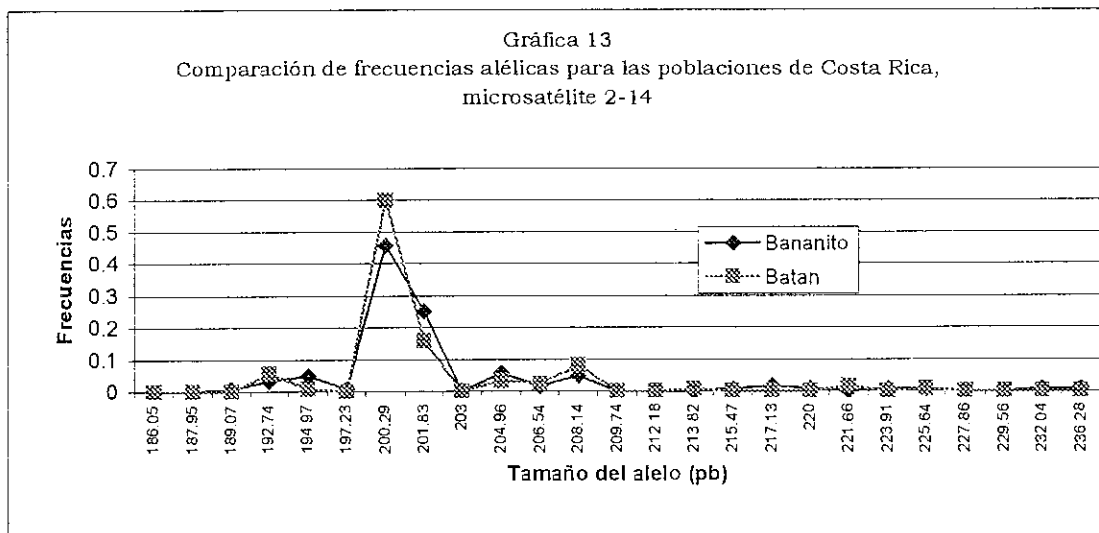
Para las poblaciones de El Salvador, la distribución del 2-14 (gráfica 11) es muy distinta para San Diego en la región anterior al alelo 203, especialmente para el alelo 200.29 que muestra la mitad de la frecuencia con respecto de San Alfredo. También se puede ver que el alelo 209.74 es dos veces más frecuente comparado con Santa Lucía, pero casi tres veces más común al tomar a San Alfredo como referencia. La distribución alélica para San Diego, en general, parece ser menos marcada, siendo ésta menos drástica en cuanto a las diferencias de frecuencias entre alelos contiguos para aproximadamente 6 de los alelos.



Para Nicaragua se observa una frecuencia bastante elevada para el alelo 192.74, especialmente para El Corral 1. Entre el Corral 1 y el Corral 3 se presenta una diferencia marcada para el alelo 208.14, pues para el segundo la frecuencia es casi tres veces mayor que para Corral 1. El alelo 206.62 en Corral 2 muestra aproximadamente la mitad de la frecuencia en comparación con las otras dos colectas.



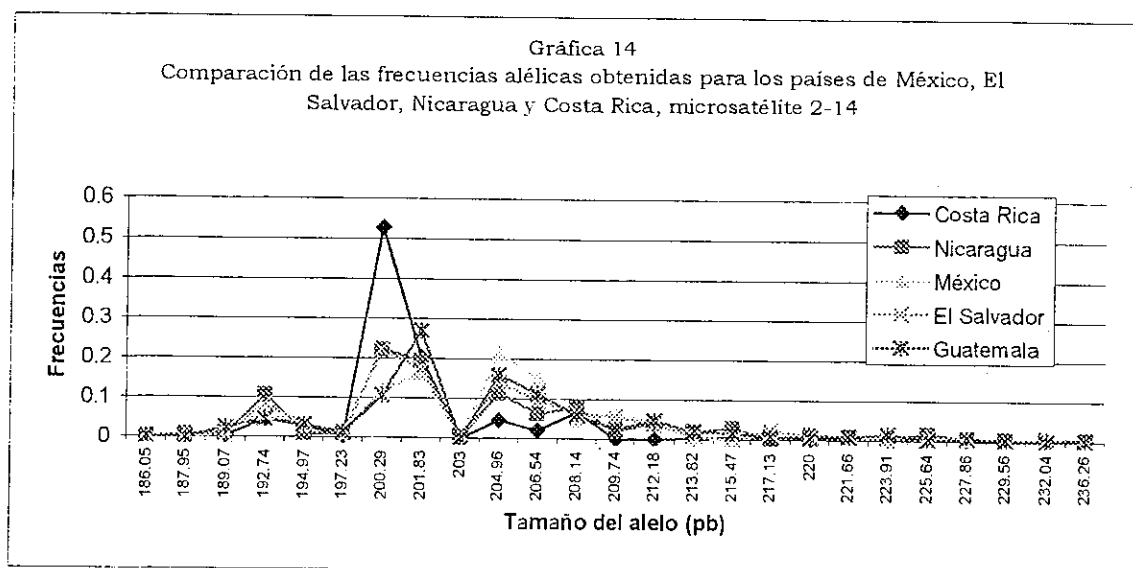
Para el 2-14 en las poblaciones de Costa Rica se observan básicamente 2 alelos principales, el 200.29, mencionado anteriormente, y el 201.83. En la gráfica 13 se puede notar que la distribución de frecuencias alélicas para Costa Rica es muy similares a lo largo de toda la curva.



Al comparar las frecuencias alélicas obtenidas para el 2-14, por país (ver gráfica 14), se puede observar que Costa Rica presenta una distribución de frecuencias un poco distinta a los demás países. En Costa Rica se puede ver cierta dominancia de un alelo, 200.29, en comparación con los demás alelos. Es el único país para cuya curva de frecuencias básicamente sólo dos alelos son altamente frecuentes, más de seis veces, respecto de los demás. En México, se puede notar que la curva de distribución está corrida hacia valores un poco más elevados de peso molecular, y posee una forma más

suave, a diferencia de los demás países. Para El Salvador y Nicaragua se observa prácticamente la misma distribución de frecuencias en todos los puntos.

Por último es interesante observar en detalle la distribución de las frecuencias de los alelos 204.96 y 206.54. Nótese que las frecuencias más elevadas para estos alelos las presenta México, mientras que las más bajas se encuentran en Costa Rica. Aquí pareciera haber una correlación entre la frecuencia para estos dos alelos y la posición geográfica de los países, ya que las frecuencias disminuyen a manera que se alejan las poblaciones de México.



En el cuadro 14 se muestran los alelos obtenidos para el microsatélite 2-25 con todas las poblaciones estudiadas. Nótese que para este microsatélite se encontró casi el doble de alelos en comparación con los otros microsatélites, pero aún así la frecuencia (0.268) mostrada para el alelo más de mayor incidencia (204.46) es mayor que las frecuencias, 0.243 y 0.218, obtenidas para los alelos más representados en los microsatélites 1-90 y 2-14, respectivamente.

Para el microsatélite 2-25 se encontró que el alelo más frecuente, según el cuadro 15, para la mayoría de poblaciones de México, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica es el 104.46; sin embargo, para Cosalapa, Zapata, Santa Lucía el alelo más representado es el 102.34. En Nueva Independencia se nota una frecuencia dividida, ya que se presenta el mismo valor para el alelo 104.46 y el 106.62. En Guatemala se muestra un patrón de frecuencias alélicas distinto, ya que el alelo más incidente en la mayoría de poblaciones

en este país es el 102.34, con excepción de Lauro, Nahuá y Tallado que presentan mayormente el alelo 104.46, y Ruperto 4/10 con el alelo 106.62 como el más frecuente.

A pesar de esta diferencia de distribuciones de frecuencias por población y país el alelo más representado en general es el 104.46, como se muestra en la gráfica 15. De esta gráfica también se puede observar que el alelo 107.4 es muy poco frecuente, ya que únicamente se encontró en Costa Rica. Este alelo parecería ser similar a los alelos 203 del microsatélite 2-14 y al 165.71 del microsatélite 1-90. Si se mide la diferencia entre el alelo 107.4 y el alelo anterior y posterior a él se resalta que solamente existe una diferencia de 1.1pb. Esta diferencia fue corroborada, al correr este alelo junto con los otros dos alelos flanqueándolo en un mismo gel.

Esta diferencia de tamaño que se observa para el alelo 107.4 del microsatélite 2-25 apoya aún más la idea que estos alelos poco frecuentes que se encuentran dentro de la región de alta frecuencia alélica podrían deberse a mutaciones. Por supuesto, esto no se podría saber con seguridad hasta tener secuenciado este alelo, junto con los alelos 106.62 y 108.82.

Cuadro 14a  
Alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-25

Alelos	Poblaciones de Costa Rica			Poblaciones de Nicaragua				Poblaciones de México				Poblaciones de El Salvador			
	Bananito	Batán	Total del país	Corral 1	Corral 2	Corral 3	Total del país	Cosalapa	Nueva Indep	Zapata	Total del país	San Alfredo	San Diego	Santa Lucía	Total del país
92.98	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	-	-	-	-
98.24	-	-	-	-	-	2	2	3	2	1	6	3	3	2	8
100.27	1	1	2	1	3	2	6	2	2	1	6	2	3	4	9
102.34	19	30	49	22	21	24	67	27	19	29	75	23	17	29	69
104.46	47	56	103	25	26	25	76	20	22	22	64	29	26	27	82
106.62	5	13	18	16	16	13	45	17	22	14	53	14	18	12	44
107.4	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108.82	14	13	27	15	12	13	40	8	10	14	32	12	7	7	26
110.5	4	-	4	4	5	7	16	6	3	4	13	5	5	4	14
112.79	3	1	4	1	4	2	7	4	1	3	8	2	5	3	10
115.12	2	2	4	4	4	6	14	2	6	3	11	2	-	2	4
117.5	18	2	20	3	2	-	5	4	1	1	6	-	4	2	6
119.32	-	-	-	1	1	1	3	1	4	1	6	2	1	2	5
120.88	-	-	-	3	-	-	3	-	1	-	1	-	1	-	1
121.86	-	-	-	-	1	1	2	-	-	-	-	-	-	1	1
123.67	1	-	1	-	-	-	2	2	1	-	3	1	2	1	4
125.09	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-
127.14	-	-	-	2	1	-	3	-	-	-	-	-	1	-	1
129.57	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	1	-	-	1
131.56	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2	2
133.79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
134.91	-	-	-	2	2	1	5	1	1	-	2	-	-	-	-
135.49	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	3	-	-	-	-
136.74	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
137.08	-	-	-	1	1	-	2	-	-	-	-	-	1	1	2
139.07	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
141.42	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	2	1	1	-	2
143.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
145.79	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	-	-	1
149.88	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
153.35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
158.1	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	2	-	-	-	-
165.55	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-
170.72	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-
180.53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
196.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1

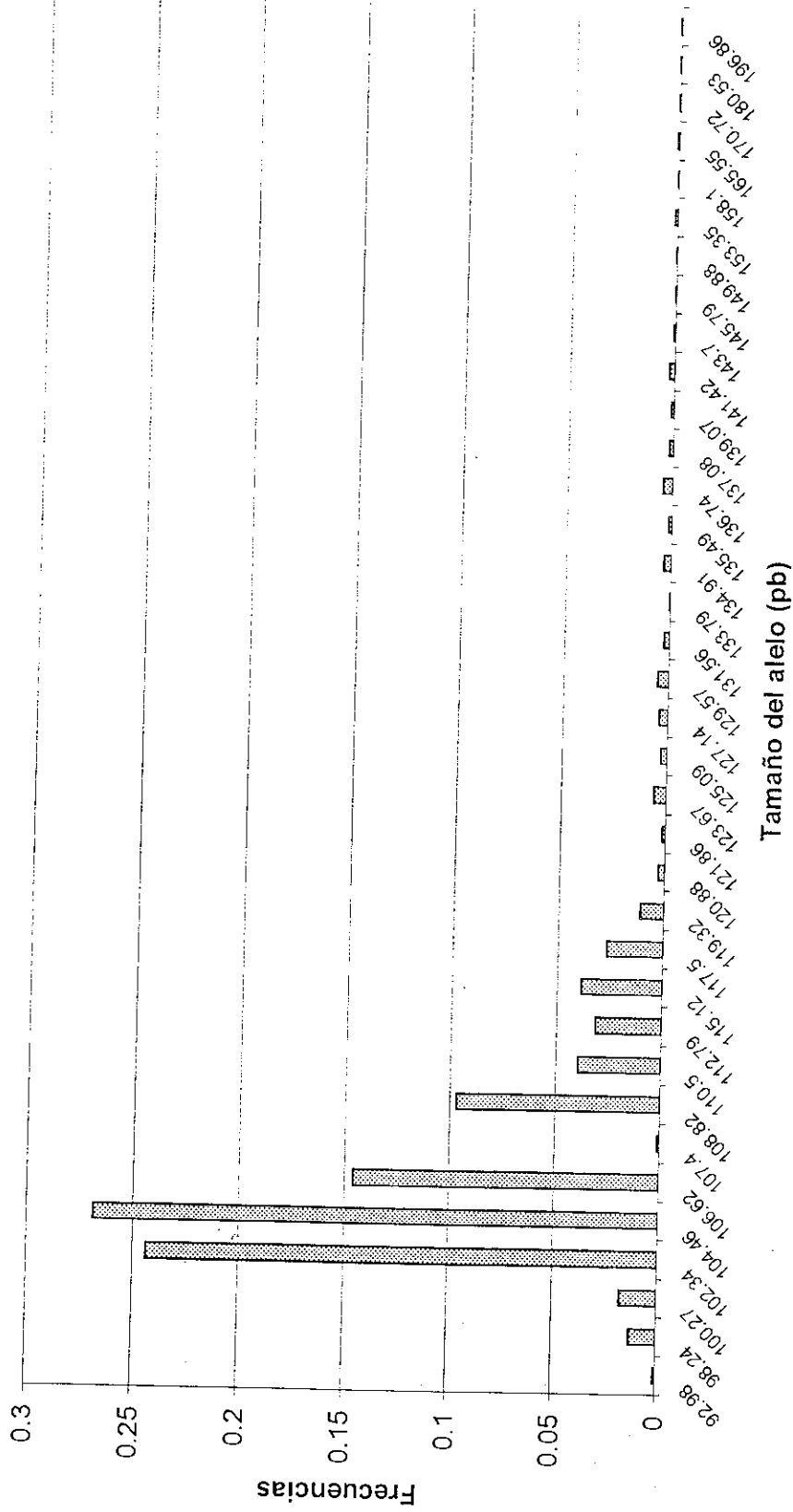


Cuadro 15a  
Frecuencias de aieles obtenidos por población con el microsatélite 2-25

Aieles	Poblaciones de Costa Rica			Poblaciones de Nicaragua				Poblaciones de México				Poblaciones de El Salvador			
	Bananito	Batan	Total del país	Corral 1	Corral 2	Corral 3	Total del país	Cosatalpa	Nueva Indep	Zapata	Total del país	San Alfredo	San Diego	Santa Lucia	Total del país
92.98	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	0.007	0.010	0.030	-	-	-
98.24	-	-	-	-	-	0.020	0.007	0.030	0.020	0.020	0.010	0.030	0.031	0.020	0.027
100.27	0.008	0.008	0.008	0.010	0.030	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020	0.031	0.040	0.030
102.34	0.158	0.250	0.204	0.220	0.210	0.240	0.223	<b>0.270</b>	0.190	<b>0.290</b>	<b>0.250</b>	0.230	0.173	<b>0.290</b>	0.232
104.46	<b>0.392</b>	<b>0.467</b>	<b>0.429</b>	<b>0.250</b>	<b>0.260</b>	<b>0.250</b>	<b>0.253</b>	0.200	<b>0.220</b>	0.220	0.213	<b>0.290</b>	<b>0.265</b>	0.270	<b>0.275</b>
106.62	0.042	0.108	0.075	0.160	0.160	0.130	0.150	0.170	<b>0.220</b>	0.140	0.177	0.140	0.184	0.120	0.148
107.4	0.008	0.008	0.008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108.82	0.117	0.108	0.113	0.150	0.120	0.130	0.133	0.080	0.100	0.140	0.107	0.120	0.071	0.070	0.087
110.5	0.033	-	0.017	0.040	0.050	0.070	0.053	0.050	0.030	0.040	0.043	0.050	0.051	0.040	0.047
112.79	0.025	0.008	0.017	0.010	0.040	0.020	0.023	0.040	0.010	0.030	0.027	0.020	0.051	0.030	0.034
115.12	0.017	0.017	0.017	0.040	0.040	0.060	0.047	0.020	0.060	0.030	0.037	0.020	-	0.020	0.013
117.5	0.150	0.017	0.083	0.030	0.020	-	0.017	0.040	0.010	0.010	0.020	-	0.041	0.020	0.020
119.32	-	-	-	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.040	0.010	0.020	0.020	0.010	0.020	0.017
120.88	-	-	-	0.030	-	-	0.010	-	0.010	-	0.003	-	0.010	-	0.003
121.86	-	-	-	-	0.010	0.010	0.007	-	-	-	-	-	-	0.010	0.003
123.67	0.008	-	0.004	-	-	-	-	0.020	0.010	-	0.010	0.010	0.020	0.010	0.013
125.09	-	-	-	-	-	0.020	0.007	-	-	-	-	-	-	-	-
127.14	-	-	-	0.020	0.010	-	0.010	-	-	-	-	-	0.010	-	0.003
129.57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	0.007	0.010	-	-	0.003
131.56	-	-	-	-	0.010	-	0.003	-	0.010	0.010	0.007	-	-	0.020	0.003
133.79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	-	-	-
134.91	-	-	-	0.020	0.020	0.010	0.017	0.010	0.010	-	0.007	-	-	-	-
135.49	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	0.020	0.010	-	-	-	-
136.74	0.008	-	0.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
137.08	-	-	-	0.010	0.010	-	0.007	-	-	-	-	-	0.010	0.010	0.007
139.07	0.017	-	0.008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	-	0.003
141.42	-	-	-	-	-	-	-	0.010	-	0.010	0.007	0.010	0.010	-	0.007
143.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.003
145.79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
149.88	-	0.008	0.004	-	-	0.010	0.003	-	-	-	-	-	-	-	-
153.35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
158.1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.020	-	0.007	-	-	-	-
165.55	-	-	-	-	-	-	-	0.010	-	-	0.003	-	-	-	-
170.72	-	-	-	-	-	-	-	0.010	-	-	0.003	-	-	-	-
180.53	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	0.003	-	-	-	-	-
196.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	-	0.010	0.003

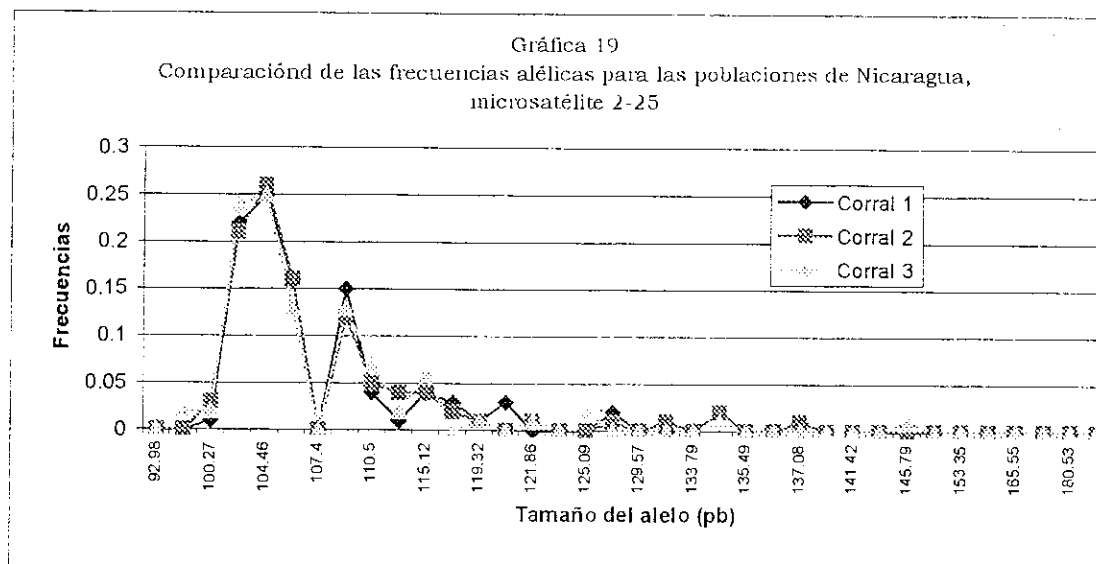
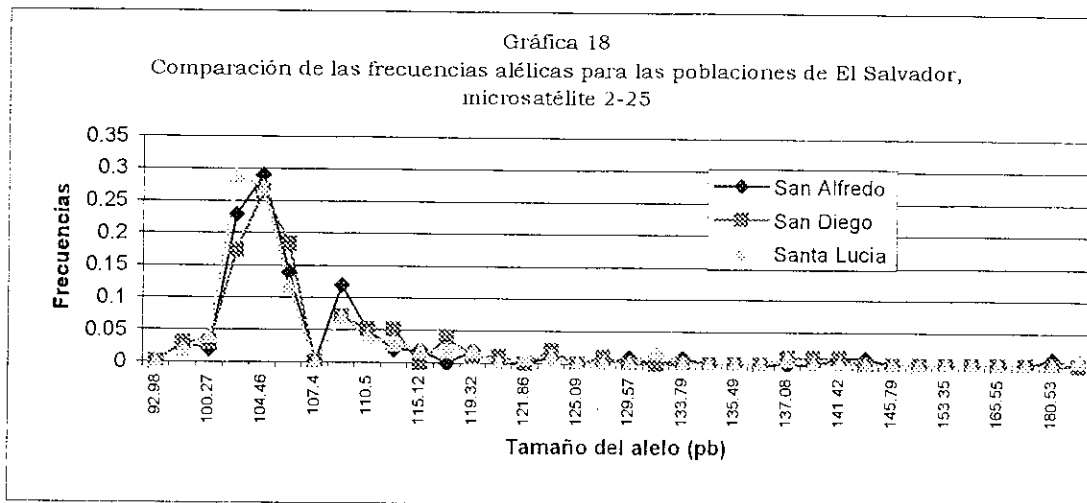


**Gráfica 15**  
**Frecuencias de alelos obtenidos para todos los países con el microsatélite 2-25**





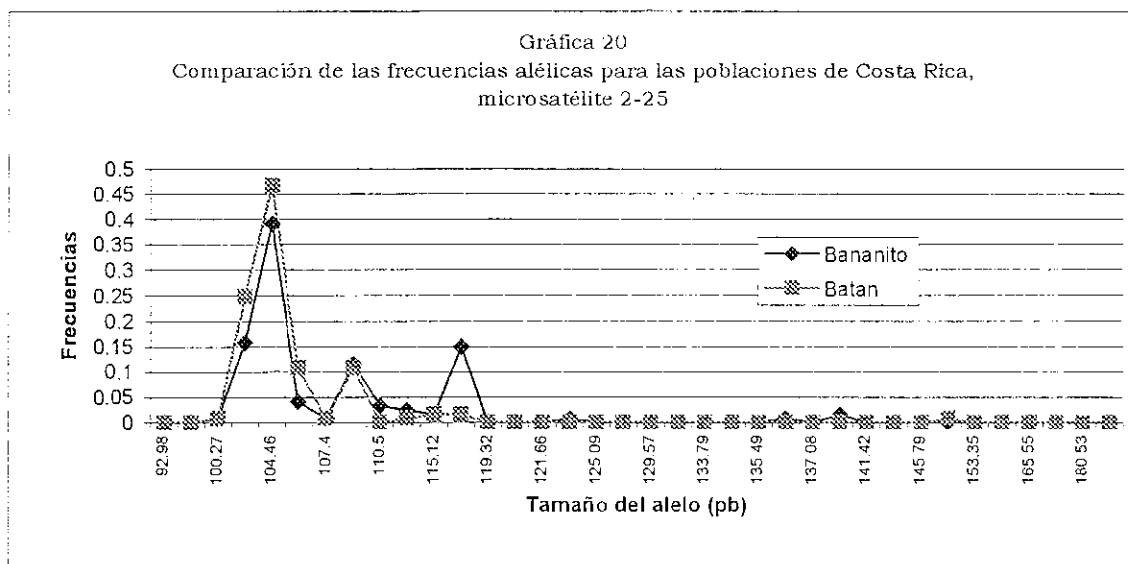
Con el microsatélite 2-25, se nota en El Salvador, una pequeña diferencia entre las frecuencias alélicas mostradas por las tres poblaciones (ver gráfica 18) ya que para San Diego y San Alfredo el alelo más frecuente es el 104.46, mientras que para Santa Lucía es el 102.34. Otra diferencia se puede observar en el alelo 108.82, ya que éste es más frecuente para San Alfredo comparado con las otras dos poblaciones.



En la gráfica 19 se observa la distribución de frecuencias alélicas para las poblaciones de Nicaragua. Es importante notar que la distribución de frecuencias para el locus 2-25 es prácticamente igual para todas las poblaciones para la mayoría de alelos. Las pocas diferencias que se observan se encuentran en los alelos poco frecuentes, como el 112.79 y el 120.88; para el primero se muestra una frecuencia bastante más elevada para el

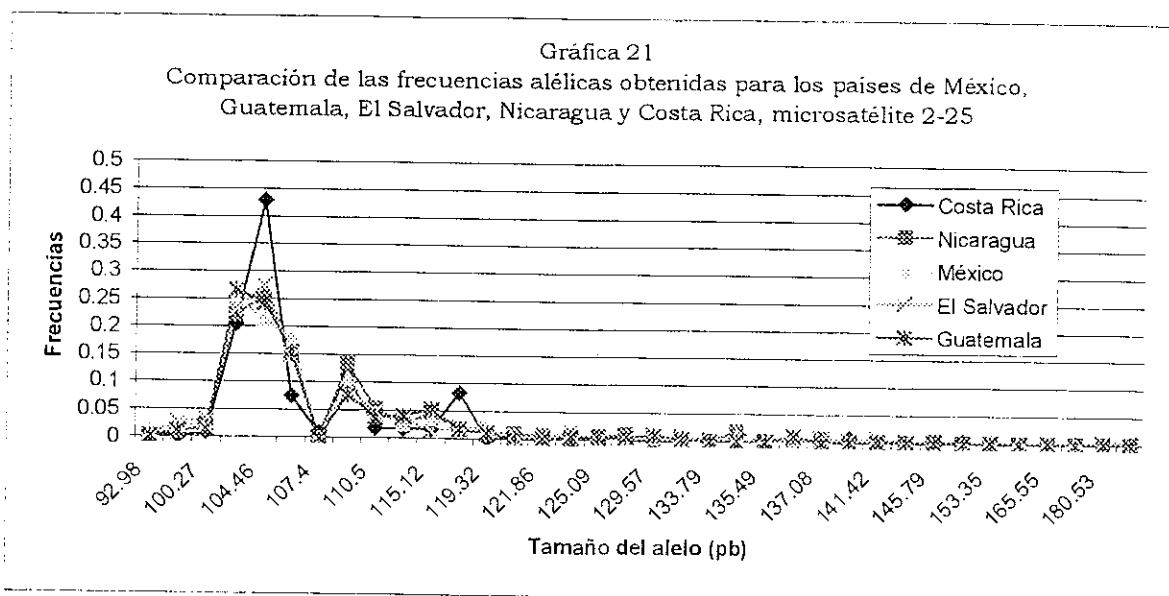
Corral 2. Para el alelo 120.88 se observa una frecuencia más elevada para el Corral 1 comparado con las otras dos poblaciones de Nicaragua.

La distribución de las frecuencias alélicas obtenidas para Costa Rica con el microsatélite 2-25 se muestran en la gráfica 20. Aquí se observa que la distribución de las frecuencias es muy similar para ambas poblaciones. Una de las diferencias que sobresale es en el alelo 117.5, pues es casi 10 veces más frecuente para Bananito que para Batán. Este alelo sobresale bastante, ya que se encuentra en la región que por lo general había sido de poca frecuencia alélica.



Al comparar las frecuencias alélicas obtenidas para los diferentes países con el microsatélite 2-25 se puede observar, gráfica 21, que para las poblaciones de México, Guatemala, El Salvador y Nicaragua existen dos alelos que son casi igualmente frecuentes (102.34 y 104.46), mientras que para Costa Rica, el alelo indiscutiblemente más frecuente es el 104.46.

Se puede observar, además, que el alelo 106.62 posee casi la mitad de frecuencia en Costa Rica, comparado con los otros países; sin embargo, el alelo 117.5 presenta una frecuencia que es significativamente más elevada al compararla con la frecuencia obtenida para este alelo con los otros países.



En el cuadro 16 se presentan los alelos obtenidos para cada una de las poblaciones con el microsatélite 6-41. De este cuadro es importante notar que el número total de alelos observados para este locus es aproximadamente la tercera parte del total de alelos observados para el 2-25.

Las frecuencias observadas para los alelos con el microsatélite 6-41 se muestran en el cuadro 17. Es importante notar que la frecuencia alélica total observada para el alelo más frecuente para la mayoría de poblaciones, para el locus 6-41 (0.419), es casi el doble de la frecuencia alélica total observada para el alelo de mayor incidencia en los otros tres microsatélites (0.243, 0.218, 0.268, para los locus 1-90, 2-14 y 2-25, respectivamente).

Para la mayoría de poblaciones el alelo más frecuente con el microsatélite 6-41 es el 185.48. Sin embargo, para las tres poblaciones de México, San Diego (El Salvador) y Champona, Lauro, San Luis Petén y San Luis Petén, Buenaventura, el alelo más frecuente es el 187.82.

Cuadro 16a  
Alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-14

Alelos	Poblaciones de Costa Rica				Poblaciones de Nicaragua			Poblaciones de México					Poblaciones de El Salvador					
	Bananito		Total del país		Corral 1	Corral 2	Corral 3	Total del país	Nueva		Zapata		Total del país		San Alfredo	San Diego	San Lucia	Total del país
	Batan							Cosalapa	Indep	Zapata		Alfredo	Diego	Lucia				
182	-	-	-	1	-	1	2	1	-	5	6	3	-	1	-	-	4	
183.94	25	45	70	8	8	10	26	6	16	3	25	10	6	14	-	-	30	
185.48	62	55	117	41	47	44	132	32	35	26	93	43	25	48	-	-	116	
187.82	16	11	27	35	33	32	100	36	37	39	112	32	34	24	-	-	90	
190.19	17	9	26	14	11	7	32	17	9	22	48	11	21	12	-	-	44	
192.59	-	-	-	1	-	2	3	1	2	4	7	-	8	1	-	-	9	
194.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	
195.02	-	-	-	-	-	-	-	5	1	1	7	-	3	-	-	-	3	
197.48	-	-	-	-	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
199.06	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	
201.69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	
203.34	-	-	-	-	-	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
208.57	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	

Cuadro 16b  
Alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-14 (continuación)

Alelos	Región Norte				Región Sur				Región Este				Guatemala		Total			
	Cham- pona	Nahuá	SL Petén	SLP Buen	Total región	Lauro 7/6	Lauro 27/3	El Mango	Rup 4/10	Rup 27/3	Tallado	Total región	Puente Blanco	El Motor		Total región	Guatemala	Total
182	-	-	-	-	2	1	1	2	11	4	-	19	-	-	-	21	33	
183.94	5	3	3	1	12	6	-	13	-	-	4	23	6	7	13	48	199	
185.48	17	20	21	19	77	52	14	20	38	15	44	193	55	43	98	368	826	
187.82	43	15	32	23	113	20	6	20	38	8	19	124	27	31	58	295	624	
190.19	9	7	5	3	24	13	3	8	8	1	11	48	7	8	15	87	237	
192.59	-	-	-	-	-	2	1	-	1	3	1	8	-	4	4	12	31	
194.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
195.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2	12	
197.48	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	3	-	-	-	3	5	
199.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
201.69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
203.34	-	1	-	-	1	-	1	1	-	1	1	4	-	1	1	6	9	
208.57	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	3	

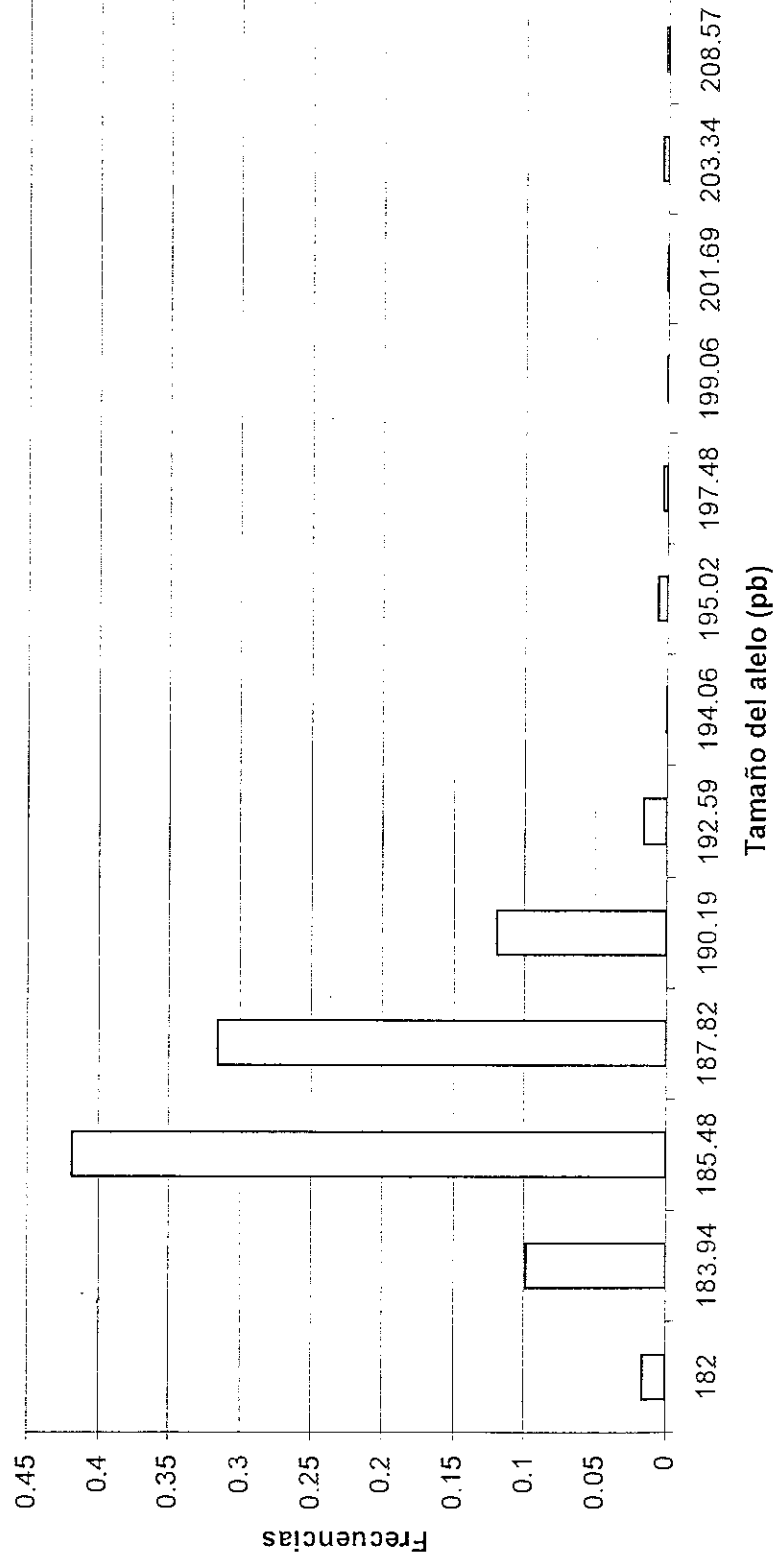
Cuadro 17a  
Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41

Alelos	Poblaciones de Costa Rica			Poblaciones de Nicaragua			Poblaciones de México				Poblaciones de El Salvador				
	Bananito		Total del país	Corral 1	Corral 2	Corral 3	Total del país	Cosalapa	Nueva Indep	Zapata	Total del alelos	San Alfredo	San Diego	Santa Lucia	Total del alelos
	Batan	-	-	0.010	0.007	0.010	0.007	0.010	-	0.050	0.020	0.030	-	0.010	0.013
182	-	-	-	0.010	0.007	0.010	0.007	0.010	-	0.050	0.010	0.010	-	0.010	0.003
183.94	0.208	0.375	0.292	0.080	0.080	0.100	0.087	0.060	0.160	0.030	0.083	0.100	0.061	0.140	0.101
185.48	<b>0.517</b>	<b>0.458</b>	<b>0.488</b>	<b>0.410</b>	<b>0.470</b>	<b>0.440</b>	<b>0.440</b>	<b>0.320</b>	<b>0.350</b>	<b>0.260</b>	<b>0.310</b>	<b>0.430</b>	<b>0.255</b>	<b>0.480</b>	<b>0.389</b>
187.82	0.133	0.092	0.113	0.350	0.330	0.320	0.333	<b>0.360</b>	<b>0.370</b>	<b>0.390</b>	<b>0.373</b>	0.320	<b>0.347</b>	0.240	0.302
190.19	0.142	0.075	0.108	0.140	0.110	0.070	0.107	0.170	0.090	0.220	0.160	0.110	0.214	0.120	0.148
192.59	-	-	-	0.010	-	0.020	0.010	0.010	0.020	0.040	0.023	-	0.082	0.010	0.030
194.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	-	-	0.003
195.02	-	-	-	-	-	-	-	0.050	0.010	0.010	0.023	-	0.031	-	0.010
197.48	-	-	-	0.010	0.010	0.010	0.007	-	-	-	-	-	-	-	-
199.06	-	-	-	-	-	-	-	0.010	-	-	0.003	-	-	-	-
201.69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	-	0.003
203.34	-	-	-	-	-	0.030	0.010	-	-	-	-	-	-	-	-
208.57	-	-	-	-	-	-	-	0.010	-	-	0.003	-	-	-	-

Cuadro 17b  
Frecuencias de alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41 (continuación)

Alelos	Región Norte				Región Sur				Región Este							
	Cham-pona	Nahuá	SL Petén	SLP Buen	Total región	Lauro 7/6	Lauro 27/3	El Mango	Rup 4/10	Rup 27/3	Puente Blanco	El Motor	Total región	Guatemala	Total	
	-	0.042	-	-	0.009	0.010	0.038	0.031	0.115	0.125	- <th>- <th>- <th>0.025</th> <th>0.017</th> </th></th>	- <th>- <th>0.025</th> <th>0.017</th> </th>	- <th>0.025</th> <th>0.017</th>	0.025	0.017	
183.94	0.068	0.063	0.048	0.022	0.052	0.063	-	0.203	-	-	0.050	0.055	0.063	0.073	0.068	0.100
185.48	0.230	<b>0.417</b>	0.339	0.413	0.335	<b>0.542</b>	<b>0.538</b>	<b>0.357</b>	<b>0.396</b>	<b>0.469</b>	<b>0.550</b>	<b>0.457</b>	<b>0.573</b>	<b>0.448</b>	<b>0.510</b>	<b>0.436</b>
187.82	<b>0.581</b>	0.313	<b>0.516</b>	<b>0.500</b>	<b>0.491</b>	0.208	0.231	<b>0.464</b>	<b>0.313</b>	<b>0.396</b>	0.250	0.238	0.281	0.323	0.302	0.350
190.19	0.122	0.146	0.081	0.065	0.104	0.135	0.115	0.143	0.125	0.083	0.031	0.138	0.073	0.083	0.078	0.120
192.59	-	-	-	-	-	0.021	0.038	-	0.010	0.094	0.013	0.019	-	0.042	0.021	0.016
194.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001
195.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	0.010	0.010	0.006
197.48	-	-	-	-	-	0.021	-	-	-	-	-	0.007	-	-	-	0.003
199.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001
201.69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001
203.34	-	0.021	-	-	0.004	-	0.038	-	0.016	-	0.031	0.013	-	0.010	0.005	0.005
208.57	-	-	0.016	-	0.004	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010	0.005	0.002

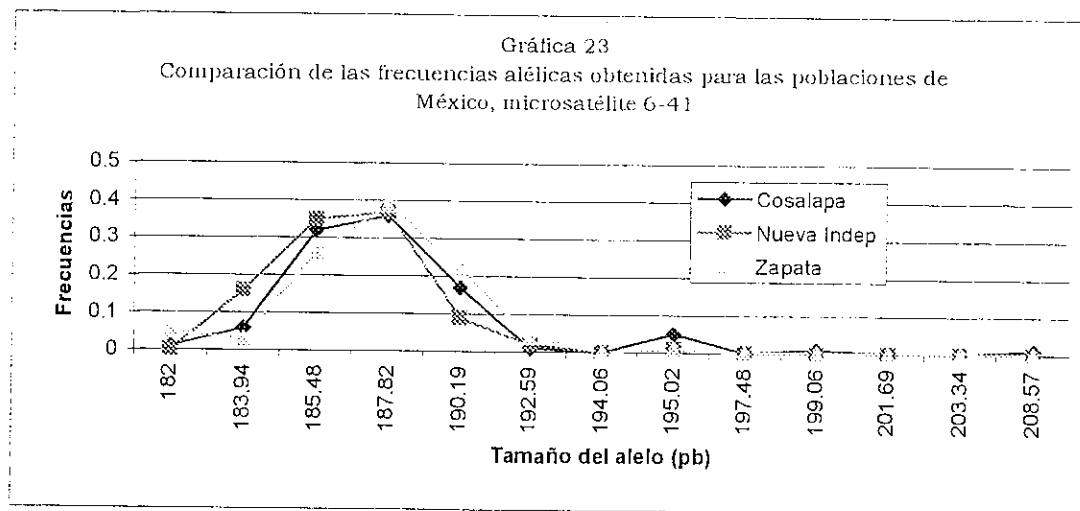
**Gráfica 22**  
**Frecuencias de los alelos obtenidos para todos los países con el**  
**microsatélite 6-41**



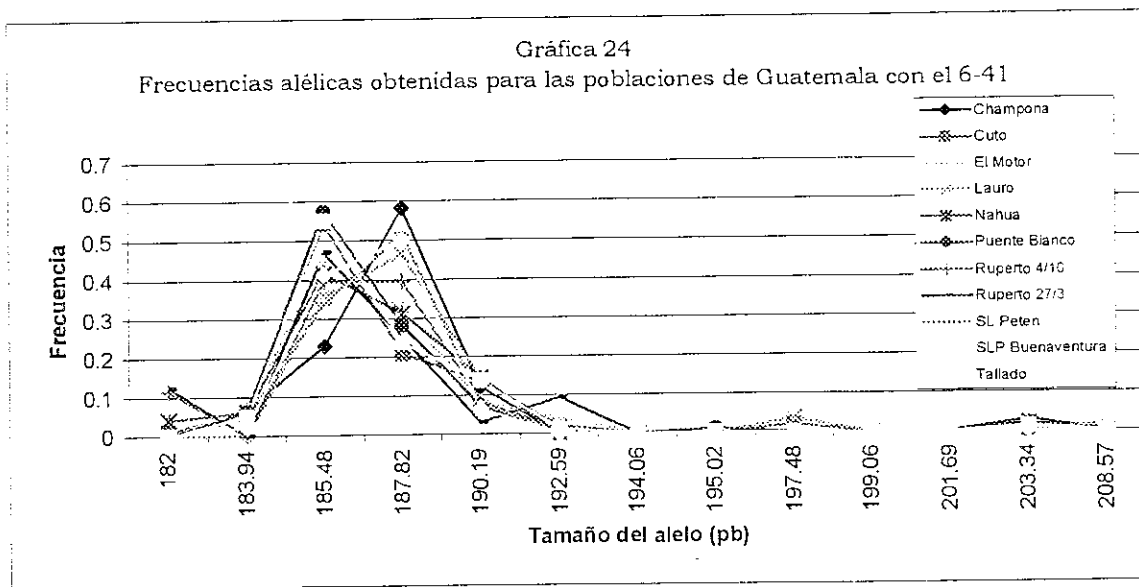
Es importante notar que San Luis Petén, San Luis Petén Buenaventura y Champona, son poblaciones que pertenecen a la región Norte de Guatemala, y para las tres se obtuvo una frecuencia mayor en el alelo 187.82.

En la gráfica 22 se muestra la distribución de frecuencias para todos los alelos observados en todos los países para el microsatélite 6-41. Es importante notar que aun cuando el alelo es menos polimórfico que los otros tres estudiados, la forma de la curva de distribución se mantiene similar, con una región de alta frecuencia y una de menor frecuencia hacia el extremo de mayor peso molecular. Sin embargo, la curva parecería tener una forma más suave y acampanada que las presentadas por los otros tres microsatélites.

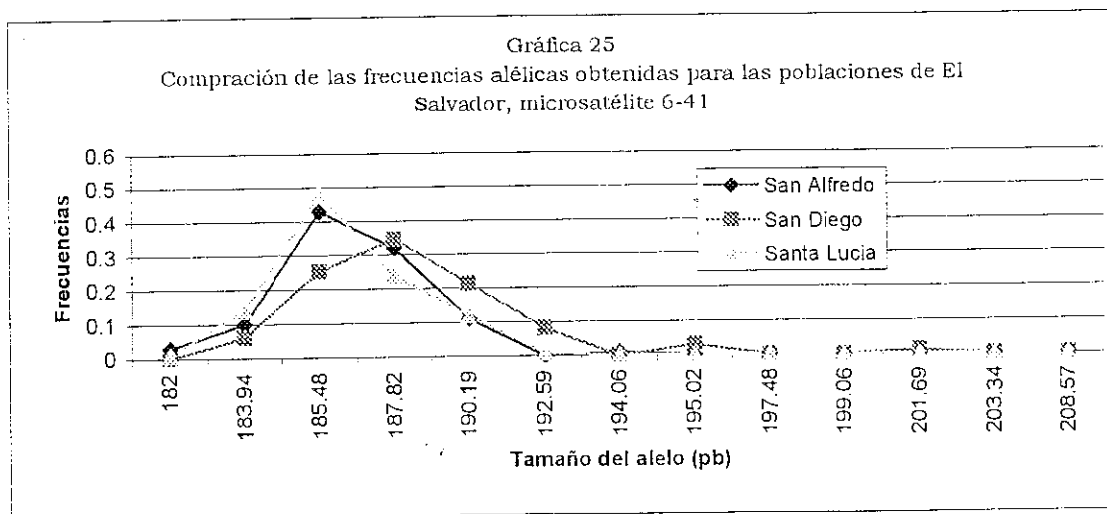
Dentro de las poblaciones de México se nota una leve variación en las frecuencias alélicas para el microsatélite 6-41 (como se observa en la gráfica 23). Para Nueva Independencia el alelo 183.94 es entre tres y cuatro veces más frecuente que para las otras dos poblaciones. Otra diferencia es que la población de Cosalapa, a diferencia de las otras dos, presenta una frecuencia significativa para el alelo 195.02.



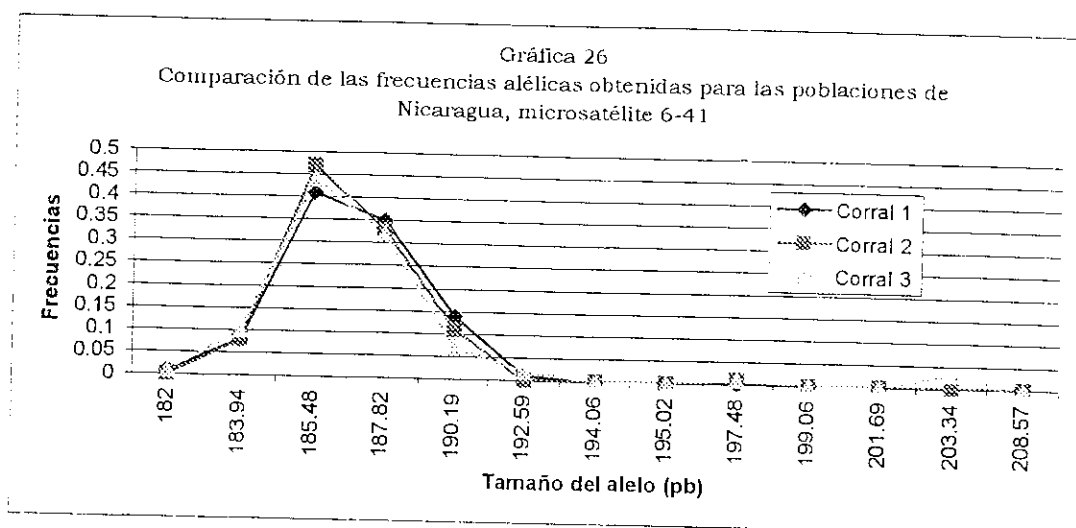
En la gráfica 24 se muestra la distribución de las frecuencias alélicas para el 6-41 de Guatemala. Nótese que para Guatemala es muy variada en la región entre los alelos 185.48 y 187.82. Para Champona se observa una frecuencia bastante menor para el alelo 185.48, en esta región. En 192.59 se puede ver una diferencia de casi el doble en la frecuencia para la población de Ruperto 27/3 comparada con las demás poblaciones que parecen coincidir en la frecuencia para este alelo.



En las poblaciones de El Salvador se nota una diferencia entre la distribución de las frecuencias alélicas observadas para el microsatélite 6-41 (ver gráfica 25). Se puede ver que San Alfredo y Santa Lucía presentan una distribución bastante similar, en la mayoría de alelos. Por otro lado, la curva de distribución para San Diego está desviada hacia valores más elevados de peso molecular para los alelos, lo cual resulta en una frecuencia menor para el alelo 185.48 y mayor para los alelos 190.19 y 192.59.

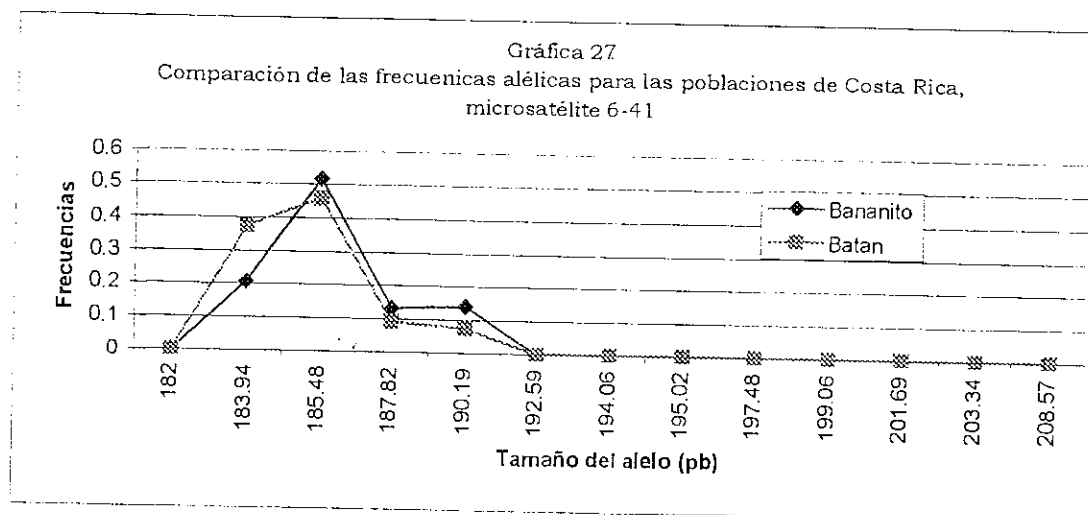


Para Nicaragua se puede ver, gráfica 26, que las tres poblaciones presentan casi las mismas frecuencias para todos los alelos observados con el microsatélite 6-41.



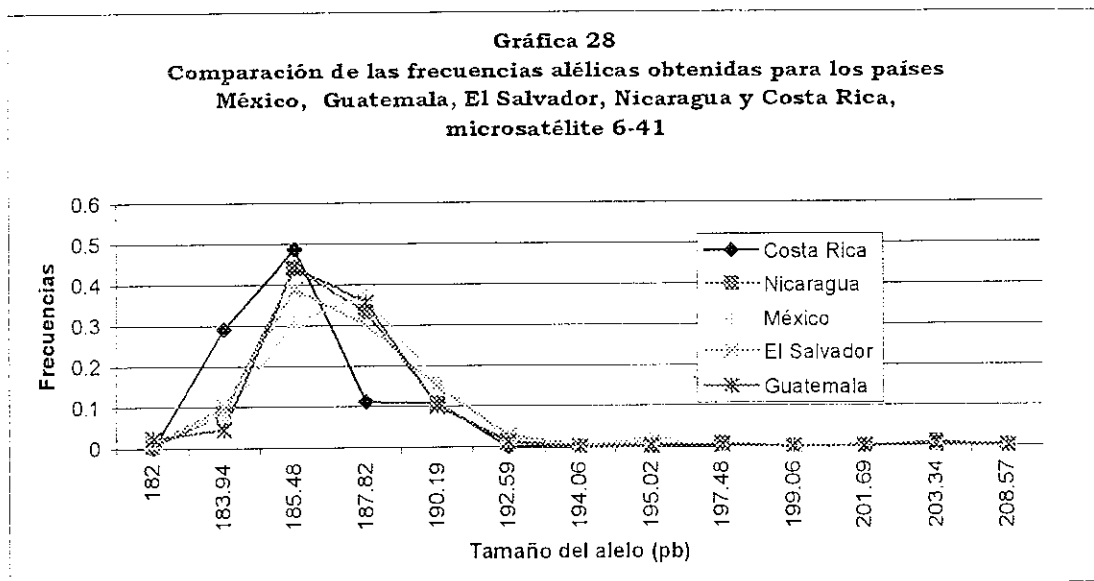
En la gráfica 27 se encuentran las frecuencias alélicas para las poblaciones de Costa Rica con el microsatélite 6-41. Es importante notar que Costa Rica no presenta ninguna frecuencia alélica después del alelo 190.19. Esto podría llevar a pensar que Costa Rica es poco polimórfico para el locus 6-41, en comparación con los otros 3 loci trabajados; pero para aseverar esto es necesario estudiar una población con mayor número de individuos y de distintas regiones del país.

Una observación importante entre Bananito y Batán es la alta frecuencia que se presenta para el alelo 183.94 en Batán, pero no en Bananito; esta diferencia de frecuencias es prácticamente del doble.



Al observar la gráfica 28, que contiene las frecuencias totales obtenidas para el microsatélite 6-41 por país, se puede notar que México presenta una distribución

alélica distinta a la de los demás países, pues la curva muestra un desplazamiento hacia el lado izquierdo, comparado con las curvas de distribución alélica para los otros países estudiados. Nótese que para Costa Rica la frecuencia del alelo 183.94 es casi cuatro veces la obtenida para los otros cuatro países. Además, el alelo 187.82 que presenta una frecuencia bastante menor (casi tres veces) para Costa Rica al compararla respecto de las encontradas para los demás países.



La curva de distribución de frecuencias para el locus 2-25 podría ser mejorada al incrementar el número de individuos por colecta, ya que de esta forma se incrementa el número de alelos procesados y por lo tanto la representatividad de la muestra respecto de la población real.

También es importante notar que de los cuatro locus, tres (2-14, 2-25 y 6-41) prácticamente sólo presentan 4 alelos de alta frecuencia, rodeados de alelos de menor frecuencia.

Es importante notar en las gráficas 7, 14, 21 y 28 que existe una ligera tendencia de corrimiento de la curva de distribución de frecuencias hacia el lado izquierdo (valores menores de peso molecular) para las poblaciones de Costa Rica. Mientras que para las poblaciones de México la tendencia de desplazamiento de la curva de distribución de frecuencias pareciera ser hacia el lado derecho (valores mayores de frecuencias alélicas).

### C. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó al utilizar el programa para genética de poblaciones Arlequin, versión 2.000 (Schneider et al. 2000). A continuación se presentan los distintos resultados que se obtuvieron.

El primer análisis fue para determinar qué poblaciones se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. En la sección de antecedentes se mencionó que una de los casos en los cuales no se da equilibrio de Hardy-Weinberg es en poblaciones pequeñas. Debido a que las colectas son sólo una pequeña representación de la población completa, es importante hacer este análisis para asegurarse que no haya errores de muestreo que lleven a una conclusión errónea.

En la siguiente página se muestra el cuadro 18 con los resultados del análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. Nótese que la mayoría de poblaciones se encuentran en equilibrio (representado por un signo +). Luego hay algunas que presentan uno de los loci fuera de equilibrio, como es el caso de El Motor, San Luis Petén, San Luis Petén Buenaventura, Tallado, Nueva Independencia y Zapata. Estas seis poblaciones aún se consideran como para estar en equilibrio.

Por otro lado se tiene una población que está fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg, pues 3 de los loci están fuera. Esta población es Nahuá, en Guatemala. Para el caso de Nahuá podría considerarse que la colecta para esta población no haya sido adecuada, pues las otras tres poblaciones de la región Norte de Guatemala (San Luis Petén, San Luis Petén Buenaventura y Champona) se encuentran equilibradas.

Además, es importante recordar que según el cuadro 18, las poblaciones de Nahuá y Tallado se encontraron 5 y 3 alelos nulos para los microsatélites 2-25 y 2-14, respectivamente. Esto influyó 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 detectarlo. Para el Corral 2 de Nicaragua también se detectaron alelos nulos, por lo que es posible que estos mismos alelos se encontraran en las otras poblaciones de Nicaragua, y al no ser detectados disminuyó la heterocigocidad de la población y por lo tanto no se detectó que estas poblaciones estuvieran equilibradas.

Cuadro 18  
Análisis de Hardy-Weinberg para las poblaciones estudiadas con cada uno de los  
microsatélites

Población	Microsatélite (valores de P en la prueba de Chi <sup>2</sup> )				Significancia			
	1-90	2-14	2-25	6-41	1-90	2-14	2-25	6-41
Champona (G) 11-6-96	0.90427	0.47953	0.24428	0.90242	+	+	+	+
Cuto (G) 27-3- 96	0.13741	0.39920	0.43444	0.57395	+	+	+	+
El Mango (G) 28-2-96	0.06379	0.04015	0.70554	0.65701	+	-	+	+
El Motor (G) 20-2-96	0.05835	0.07640	0.81293	0.02916	+	+	+	-
Lauro (G) 27-3-96 y 7-6-95	0.31231	0.66477	0.52483	0.17775	+	+	+	+
Nahuá (G) 13-3-96	0.04571	0.01681	0.08448	0.00173	-	-	+	-
Puente Blanco (G) 21-2-96	0.04237	0.36863	0.33672	0.11096	+	+	+	+
Ruperto (G) 27-3 y 4-10-96	0.80504	0.49900	0.26452	0.78391	+	+	+	+
San Luis Petén (G) 12-3-96	0.02501	0.34383	0.37142	0.42528	-	+	+	+
San Luis Petén Buenaventura (G) 12-3-96	0.43931	0.13958	0.44616	0.01091	+	+	+	-
Tallado (G) 7-2-95	0.34394	0.00000	0.80358	0.84960	+	-	+	+
Cosalapa (M) 1-12-98	0.33591	0.72568	0.81156	0.33526	+	+	+	+
Nueva Independencia (M) 19-11-98	0.55113	0.00942	0.05793	0.10232	+	-	+	+
Zapata (M) 1-12-98	0.93452	0.54296	0.15264	0.00192	+	+	+	-
San Alfredo (ES) 21-10-98	0.73070	0.28455	0.16559	0.98485	+	+	+	+
San Diego (ES) 21-10-98	0.00447	0.09276	0.02050	0.23409	-	+	-	+
Santa Lucía (ES) 21-10-98	0.35868	0.45673	0.24644	0.23328	+	+	+	+
Corral 1 (N) 24-9-98	0.37924	0.02862	0.01639	0.59130	+	-	-	+
Corral 2 (N) 24-9-98	0.02858	0.00000	0.81742	0.28566	-	-	+	+
Corral 3 (N) 30-9-98	0.05998	0.03823	0.75441	0.47647	-	-	+	+
Bananito (CR) 13-4-99	0.24576	0.28406	0.07572	0.46680	+	+	+	+
Batan (CR) 13-4-99	0.00147	0.05820	0.00121	0.23718	-	+	-	+

Por último, las tres poblaciones de Nicaragua resultaron fuera del equilibrio de Hardy - Weinberg para el microsatélite 2-14, y dos de las tres poblaciones están fuera de equilibrio para el microsatélite 1-90. Esto podría llevar a la suposición que en Nicaragua aún no se ha establecido el equilibrio para el locus 2-14, o bien, o que la muestra tomada no sea representativa y por lo tanto refleje frecuencias inadecuadas. Por supuesto, para aseverar estas suposiciones es necesario realizar un análisis más profundo, al tomar otras muestras de este país en distintas regiones.

Una suposición importante es que los microsatélites son marcadores moleculares neutros, por lo que no deben estar bajo selección. Esto es necesario ya que se desea medir los efectos de la migración y la diversidad genética de las poblaciones. El análisis de equilibrio Hardy-Weinberg es útil también para establecer la neutralidad de los microsatélites escogidos, como se mencionó en la teoría.

Para el análisis por población para el equilibrio Hardy-Weinberg se obtuvo que únicamente una población, de las 22 analizadas, está fuera. Como se mencionó anteriormente se cree que esto se debe a un error en el muestreo, más que a algún factor como falta de neutralidad o deriva genética.

Es importante mencionar que a pesar que el equilibrio de Hardy-Weinberg muestra diferencias entre las poblaciones de Bananito y Batán, al analizar las frecuencias de estas dos poblaciones no se evidencia una diferencia tan marcada. Por esta razón se utilizaron los datos completos de Costa Rica para el análisis de estructura de poblaciones.

Otro análisis importante es determinar si existe un equilibrio entre las parejas de loci para cada una de las poblaciones, conocido como equilibrio de ligamiento. Es importante establecer si existe o no este equilibrio, pues éste tarda más en ser alcanzado que el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Los resultados para el equilibrio de ligamiento por parejas de loci se encuentran en los cuadros, 19 y 20, que se presenta a continuación. En el primer cuadro se consideraron las poblaciones individuales de cada uno de los países. Este análisis ayuda a tener una idea más detallada acerca de la situación del equilibrio de ligamiento. El segundo cuadro (cuadro 20) presenta el equilibrio de ligamiento por parejas de loci, pero ello al considerar un país completo como una población total.

Cuadro 19  
Equilibrio de ligamiento de los loci por parejas de las poblaciones estudiadas

MS	1-90	2-14	2-25	6-41
1-90	-	Corral 2 en desequilibrio	San Alfredo en desequilibrio	Todas en equilibrio (11 poblaciones)
2-14	Corral 2 en desequilibrio	-	Zapata y Corral 1 en desequilibrio	Corral 2 en desequilibrio
2-25	San Alfredo en desequilibrio	Zapata y Corral 1 en desequilibrio	-	Cosalapa y Batán en desequilibrio
6-41	Todas en equilibrio (11 poblaciones)	Corral 2 en desequilibrio	Cosalapa y Batán en desequilibrio	-

Nota: Para este análisis no se incluyeron las poblaciones de Guatemala

Al considerar sólo las poblaciones individuales, se observa que en tres de las seis parejas de loci se encuentra una población de Nicaragua que presenta ligamiento. Sin embargo, el análisis por país mostró que únicamente una pareja, 2-14 con 1-90, correspondiente a Nicaragua, se encuentra ligada. Este resultado no fue inesperado, ya que los resultados obtenidos para el análisis de equilibrio de ligamiento por poblaciones sugerían que Nicaragua estaba en desequilibrio. Este resultado es además, consistente con el resultado obtenido para el equilibrio de Hardy-Weinberg para Nicaragua, ya que las tres poblaciones estaban fuera de equilibrio para el locus 2-14 y dos poblaciones lo estaban para el 1-90.

Cuadro 20  
Equilibrio de ligamiento de los loci por parejas para los países estudiados

MS	1-90	2-14	2-25	6-41
1-90	-	Nicaragua y Región Este de Guatemala en desequilibrio	Todos en equilibrio	Región Sur de Guatemala en desequilibrio
2-14	Nicaragua y Región Este de Guatemala en desequilibrio	-	Todos en equilibrio	Todos en equilibrio
2-25	Todos en equilibrio	Todos en equilibrio	-	Todos en equilibrio
6-41	Región Sur de Guatemala en desequilibrio	Todos en equilibrio	Todos en equilibrio	-

Estos resultados son muy interesantes, ya que sugieren que hay una baja probabilidad de que haya existido algún "cuello de botella" recientemente; lo cual indicaría que estos

marcadores llevan mucho tiempo de estar relacionándose y las poblaciones tienen mucho tiempo de haberse establecido.

Luego de analizar las distribuciones de frecuencias alélicas obtenidas para los cuatro microsatélites, se llegó a la decisión de realizar el análisis de varianza molecular (AMOVA, por sus siglas en inglés) agrupando las poblaciones como se muestra en el cuadro 21. Las razones por las cuales se tomó esta decisión se resumen en que se encontró que la distribución de frecuencias alélicas para Costa Rica presentaban un ligero corrimiento, bastante generalizado, hacia el lado de menor peso molecular. Además, en Costa Rica se encontró que varias veces se observaban alelos con diferencias de dos o más veces en frecuencia, al compararlos con los otros tres países; tal es el caso de los alelos 166.75, 106.62 y 183.94 para los microsatélites 1-90, 2-25 y 2-14, respectivamente.

Cuadro 21  
Distribución de los grupos analizados por AMOVA

Grupo 1	Grupo 2
11 Poblaciones de Guatemala 3 Poblaciones de México 3 Poblaciones de El Salvador 3 Poblaciones de Nicaragua	Poblaciones de Costa Rica

En el cuadro 22 se presentan los resultados para el análisis de varianza, AMOVA. Los resultados de este análisis muestran que existe un porcentaje de variación mucho mayor entre los individuos dentro de una población (93.74%), que entre los dos grupos analizados (4.77%) y entre las poblaciones de un mismo grupo (1.49%).

Esto quiere decir que la mayor variación se observó al comparar las variaciones observadas para todos los individuos incluidos en el estudio; lo cual es de esperarse. Pero lo más importante que se puede obtener de esos resultados es que existe una mayor variación entre el grupo de poblaciones de México hasta Nicaragua, al compararlas con las poblaciones de Costa Rica (4.77% de variación), que la variación existente entre las poblaciones de México hasta Nicaragua comparadas entre sí y las poblaciones de Costa Rica cotejadas entre sí (1.49% de variación). Esto nos lleva a pensar que podría existir algún obstáculo para el flujo genético entre las poblaciones de México a Nicaragua con las poblaciones de Costa Rica. Pero poder concluir esto aún se deben hacer más pruebas.

Cuadro 22

Análisis de varianza AMOVA, para todas las poblaciones con los cuatro microsátélites

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	38.657	0.08086 Va	4.77
Entre poblaciones dentro de grupos	20	76.629	0.02534 Vb	1.49
Dentro de poblaciones	1960	3114.701	1.58913 Vc	93.74
Total	1981	3229.987	1.69533	

En el cuadro 23 se presentan los índices de fijación de Wright. El índice de fijación total ( $F_{ST}$ ), se mencionó en la teoría que corresponde a la heterocigocidad de una subpoblación comparada contra la heterocigocidad total. El valor obtenido, 0.06264, cae dentro del rango de 0.05 a 0.15, que según Hartl (1987) corresponde a una diferencia genética moderada. Esto indica que al analizar todas las colectas realizadas, desde México hasta Costa Rica, se observa una diferencia genética moderada, lo cual era de esperarse debido a lo heterogéneo del grupo total.

Para el índice de fijación por grupos ( $F_{CT}$ ) se obtuvo un valor de 0.04769. Aunque este valor no es mayor que 0.05, es muy cercano a él, lo que sugiere que podría haber una diferencia genética moderada entre los grupos establecidos. Esto apoya la suposición anterior, cuando se analizaron las frecuencias alélicas observadas entre países, que existe una diferencia genética, aunque moderada, entre la región comprendida desde México hasta Nicaragua, comparada con la de Costa Rica.

El índice de fijación entre grupos ( $F_{SC}$ ) ayuda en la suposición anterior, ya que la diferencia genética encontrada entre las poblaciones de cada uno de los grupos no es estadísticamente significativa. Mientras que la diferencia genética, al comparar los grupos, está muy cerca del rango que indica diferencia genética moderada.

Cuadro 23  
Índices de fijación de Wright

$F_{ST}$	0.06264
$F_{SC}$	0.01570
$F_{CT}$	0.04769

En el cuadro 24 se muestran los valores de  $F_{st}$  para cada pareja de poblaciones trabajadas. Este cuadro se complementa con el cuadro 25, en el cual se muestran los valores  $P$  para estos valores de  $F_{st}$ ; y en el cuadro 26 se encuentra la significancia de los valores  $P$  obtenidos.

Al analizar el cuadro 24 se puede observar que únicamente una pareja de las poblaciones de Guatemala, la pareja de Cuto y San Luis Petén, presentan un valor de  $F_{st}$  que sugiere diferencia genética moderada. Para el resto de parejas de poblaciones de México hasta Nicaragua, los valores de  $F_{st}$  sugieren poca diferencia genética, lo cual indica que existe flujo genético entre ellas. Ahora bien, las poblaciones de Costa Rica presentan un valor de  $F_{st}$  que representa una diferencia genética moderada, o bien un valor que se acerca mucho al límite de 0.05, respecto de la mayoría de poblaciones de México y Centro América. Únicamente la población de Bananito presenta poca diferencia genética respecto de las poblaciones de Nicaragua. Las dos poblaciones de Costa Rica presentan poca diferencia genética entre sí.

Se puede observar, en el cuadro 26, que las poblaciones del Norte de Guatemala (Champona, San Luis Petén y San Luis Petén, Buenaventura) no muestran una diferencia genética significativa entre ellas; sin embargo, sí muestran una diferencia significativamente mayor que cero respecto de las otras regiones de Guatemala y las poblaciones de los demás países. Luego, de las cuatro poblaciones de la región sur, Cuto Lauro y Tallado muestran estar en flujo genético constante entre ellas. Al analizar el flujo genético existente entre las poblaciones del Sur de Guatemala respecto de los demás países, se observa que Lauro y Ruperto presentan flujo genético respecto de las poblaciones de México. Por último, al analizar las poblaciones de la región Este de Guatemala (El Motor y Puente Blanco) se observa que Puente Blanco está en flujo genético con dos de las tres poblaciones de El Salvador (San Alfredo y Santa Lucía) y con el Corral 2 de Nicaragua. Además, se observa que respecto de Lauro, de la región Sur de Guatemala, tampoco existen diferencias significativas.

Para las poblaciones de El Salvador se observa que además de la relación genética encontrada respecto de las poblaciones del Este de Guatemala, existe flujo genético con poblaciones del Sur, ya que los valores de  $P$  para el  $F_{st}$  de San Diego y Santa Lucía respecto de Lauro y Cuto, no presentan diferencias significativamente mayores que cero.

Cuadro 24  
Matriz para los valores Fst de todas las poblaciones estudiadas por parejas

	Cuto	Lauro	El Mango	Ruperto	Tallado	Champona	Nahuá	SL Petén	SLP Bue	El Motor	Pte Bico	Cosalapa	Nva Ind	Zapata	Sta Lucía	Sn Alfredo	Sn Diego	Corral 3	Corral 2	Corral 1	Bananito	Batán		
Cuto (GN)	0																							
Lauro (GN)	0.00467	0																						
El Mango (GN)	0.01424	0.00694	0																					
Ruperto (GN)	0.03528	0.00573	0.02319	0																				
Tallado (GN)	0.00743	-0.00336	0.01551	0.01281	0																			
Champona (GS)	0.04968	0.01577	0.03235	0.0258	0.04596	0																		
Nahuá (GS)	0.0256	0.01489	0.02817	0.02866	0.02776	0.02403	0																	
SL Petén (GS)	0.05317	0.01741	0.0491	0.01952	0.04038	0.00929	0.04146	0																
SLP Bue (GS)	0.03371	0.00779	0.03328	0.01911	0.03177	0.00713	0.01188	0.00702	0															
El Motor (GE)	0.0202	0.0007	0.01976	0.01135	0.01035	0.02562	0.01459	0.02454	0.01387	0														
Pte Bico (GE)	0.01018	0.01262	0.01777	0.03309	0.01973	0.04611	0.01431	0.0605	0.02333	0.01858	0													
Cosalapa (M)	0.02809	0.00304	0.01166	0.00806	0.0179	0.01202	0.0255	0.02027	0.02125	0.01236	0.02487	0												
Nva Ind (M)	0.02559	0.00709	0.00456	0.01863	0.01982	0.01933	0.01909	0.03753	0.02573	0.01191	0.02112	0.00475	0											
Zapata (M)	0.023	0.00929	0.01306	0.02337	0.0307	0.01333	0.01923	0.02866	0.01762	0.01904	0.02141	0.00509	0.01295	0										
Sta Lucía (ES)	0.00091	-0.00182	0.00449	0.01735	0.00329	0.03348	0.0195	0.03506	0.01904	0.00592	0.00542	0.01201	0.01139	0.01409	0									
Sn Alfredo (ES)	0.01187	0.00553	0.01073	0.02542	0.02296	0.02844	0.02221	0.04513	0.01965	0.0163	0.00412	0.01279	0.01066	0.00555	0.00096	0								
Sn Diego (ES)	0.02923	0.00856	0.00631	0.01601	0.02489	0.02108	0.01677	0.0378	0.02207	0.01146	0.02453	0.00543	0.00736	0.00506	0.01072	0.0113	0							
Corral 3 (N)	0.00849	-0.00404	0.0077	0.01474	0.00785	0.02144	0.02102	0.02612	0.01068	0.00672	0.01045	0.01171	0.00971	0.01166	-0.00128	0.00064	0.01328	0						
Corral 2 (N)	0.01157	0.00058	0.00823	0.0193	0.01694	0.03259	0.02743	0.04021	0.01859	0.01241	0.00721	0.01412	0.01331	0.01433	0.00071	-0.00221	0.01033	-0.00114	0					
Corral 1 (N)	0.01338	-0.00221	0.00704	0.01104	0.01254	0.0176	0.02036	0.02527	0.01234	0.0071	0.01275	0.00524	0.01045	0.00584	0.00053	0.00085	0.005	-0.00139	-0.0024	0				
Bananito (CR)	0.03083	0.04023	0.03937	0.06631	0.04471	0.08945	0.063	0.09692	0.06601	0.0558	0.03541	0.06236	0.06367	0.05319	0.02246	0.02321	0.05076	0.03071	0.02695	0.02898	0			
Batán (CR)	0.06407	0.08137	0.06055	0.11066	0.08906	0.12857	0.10748	0.14495	0.10897	0.09135	0.0653	0.10303	0.09402	0.08669	0.04956	0.04751	0.08444	0.0591	0.0554	0.06172	0.01618	0		

Cuadro 25  
Valores de P para los Fst obtenidos en el cuadro 24

	Cuto (GN)	Lauro (GN)	El Mango	Ruperto (GN)	Tallado (GN)	Champona	Nahuá (GS)	SL Petén (GS)	SLP Bue (GS)	El Motor (GE)	Pte Blco
Cuto (GN)	*										
Lauro (GN)	0.15802+-0.0057	*									
El Mango (GN)	0.00562+-0.0013	0.12430+-0.0073	*								
Ruperto (GN)	0.00000+-0.0000	0.10314+-0.0049	0.00000+-0.0000	*							
Tallado (GN)	0.07074+-0.0048	0.81157+-0.0076	0.01190+-0.0019	0.00661+-0.0016	*						
Champona (GS)	0.00000+-0.0000	0.00926+-0.0017	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	*					
Nahuá (GS)	0.00000+-0.0000	0.04595+-0.0035	0.00231+-0.0009	0.00000+-0.0000	0.00298+-0.0009	0.00529+-0.0012	*				
SL Petén (GS)	0.00000+-0.0000	0.00661+-0.0017	0.00000+-0.0000	0.00066+-0.0005	0.00000+-0.0000	0.05917+-0.0047	0.00000+-0.0000	*			
SLP Bue (GS)	0.00000+-0.0000	0.09851+-0.0063	0.00000+-0.0000	0.00165+-0.0007	0.00000+-0.0000	0.10876+-0.0054	0.09950+-0.0055	0.13058+-0.0054	*		
El Motor (GE)	0.00000+-0.0000	0.42248+-0.0099	0.00033+-0.0003	0.00463+-0.0011	0.02942+-0.0029	0.00000+-0.0000	0.01752+-0.0027	0.00000+-0.0000	0.01025+-0.0019	*	
Pte Blco (GE)	0.01322+-0.0021	0.01554+-0.0020	0.00430+-0.0010	0.00000+-0.0000	0.00099+-0.0006	0.00000+-0.0000	0.00496+-0.0012	0.00033+-0.0003	0.00066+-0.0005	0.00165+-0.0007	0.00000+-0.0000
Cosalapa (M)	0.00000+-0.0000	0.23636+-0.0075	0.01289+-0.0019	0.01289+-0.0020	0.00033+-0.0003	0.00496+-0.0012	0.00066+-0.0005	0.00033+-0.0003	0.00066+-0.0005	0.00298+-0.0011	0.00000+-0.0000
Nva Ind (M)	0.00000+-0.0000	0.08231+-0.0048	0.17653+-0.0066	0.00000+-0.0000	0.00033+-0.0003	0.00099+-0.0006	0.00430+-0.0012	0.00000+-0.0000	0.00033+-0.0003	0.00298+-0.0011	0.00000+-0.0000
Zapata (M)	0.00000+-0.0000	0.04066+-0.0036	0.01091+-0.0017	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00628+-0.0015	0.00529+-0.0013	0.00000+-0.0000	0.00298+-0.0011	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
Sta Lucía (ES)	0.36066+-0.0091	0.64000+-0.0084	0.15702+-0.0062	0.00000+-0.0000	0.23471+-0.0073	0.00000+-0.0000	0.00397+-0.0012	0.00000+-0.0000	0.00165+-0.0007	0.06116+-0.0036	0.09058+-0.0054
Sn Alfredo (ES)	0.00298+-0.0009	0.10678+-0.0052	0.01355+-0.0023	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00132+-0.0006	0.00000+-0.0000	0.00066+-0.0005	0.00000+-0.0000	0.12132+-0.0068
Sn Diego (ES)	0.00000+-0.0000	0.07537+-0.0049	0.11736+-0.0060	0.00033+-0.0003	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.01587+-0.0022	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00628+-0.0015	0.00000+-0.0000
Corral 3 (N)	0.01719+-0.0022	0.86744+-0.0069	0.05521+-0.0041	0.00033+-0.0003	0.05421+-0.0042	0.00033+-0.0003	0.00132+-0.0006	0.00000+-0.0000	0.02446+-0.0026	0.03669+-0.0029	0.00959+-0.0018
Corral 2 (N)	0.00860+-0.0019	0.51140+-0.0086	0.07372+-0.0045	0.00000+-0.0000	0.00529+-0.0015	0.00000+-0.0000	0.00198+-0.0009	0.00000+-0.0000	0.00562+-0.0015	0.00628+-0.0016	0.06182+-0.0048
Corral 1 (N)	0.00165+-0.0007	0.71669+-0.0083	0.06545+-0.0039	0.00364+-0.0011	0.00793+-0.0015	0.00165+-0.0009	0.00198+-0.0008	0.00000+-0.0000	0.01719+-0.0026	0.03273+-0.0027	0.00198+-0.0008
Bananito (Ck)	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
Batán (CR)	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000

Cuadro 25b  
Valores de P para los Fst obtenidos en el cuadro 24 (continuación)

	Cosalapa (M)	Nva Ind (M)	Zapata (M)	Sta Lucia	Su Alfredo	Su Diego	Corral 3 (N)	Corral 2 (N)	Corral 1 (N)	Bananito	Batán (CR)
Cuto (GN)											
Lauro (GN)											
El Mango (GN)											
Ruperto (GN)											
Tallado (GN)											
Chanpona (GS)											
Nahuá (GS)											
St. Petén (GS)											
SLP Buc (GS)											
El Motor (GE)											
Pic Bkvo (GE)											
Cosalapa (M)											
Nva Ind (M)	0.09256+-0.0056	*									
Zapata (M)	0.07570+-0.0039	0.00033+-0.0003	*								
Sta Lucia (ES)	0.00198+-0.0008	0.00397+-0.0011	0.00132+-0.0006	*							
Su Alfredo (ES)	0.00000+-0.0000	0.00562+-0.0015	0.06744+-0.0044	0.34050+-0.0079	*						
Su Diego (ES)	0.07537+-0.0043	0.03736+-0.0034	0.10744+-0.0056	0.00826+-0.0015	0.00364+-0.0011	*					
Corral 3 (N)	0.00132+-0.0006	0.00959+-0.0018	0.00364+-0.0011	0.68364+-0.0103	0.37388+-0.0074	0.00231+-0.0008	*				
Corral 2 (N)	0.00231+-0.0008	0.00284+-0.0009	0.00331+-0.0011	0.45289+-0.0083	0.81884+-0.0073	0.01917+-0.0025	0.70876+-0.0087	*			
Corral 1 (N)	0.06678+-0.0040	0.00529+-0.0013	0.06512+-0.0041	0.42116+-0.0095	0.59471+-0.0086	0.09917+-0.0056	0.69091+-0.0069	0.84364+-0.0065	*		
Bananito (CR)	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	*	
Batán (CR)	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00033+-0.0003	*

Cuadro 26  
Matriz de significancia de los valores P de Fst

	Cuto	Lauro	Manugo	El Ruperto	Tallado	Clarin pona	Nalnuá	SL Petén	SLP Bue	El Motor	Pte Blco	Cosa- Iapa	Nva Ind	Zapata	Sia Lucía	Sn Alfr.	Sn Diego	Corral 2	Corral 3	Corral 1	Bana- juito	Batán		
Cuto (GS)	-																							
Lauro (GS)	+																							
El Manugo (GS)	+	-																						
Ruperto (GS)	+		+																					
Tallado (GS)	-			+																				
Chamixona (GN)	+				+																			
Nalnuá (GN)	+				+		+																	
SL Petén (GN)	+				+			+																
SLP Bue (GN)	+				+																			
El Motor (GE)	+				+																			
Pte Blco (GE)	+				+																			
Cosalepa (M)	+				+																			
Nva Ind (M)	+				+																			
Zapata (M)	+				+																			
Sia Lucía (ES)	-																							
Sn Alfredo (ES)	+				+																			
Sn Diego (ES)	+				+																			
Corral 3 (N)	+				+																			
Corral 2 (N)	+				+																			
Corral 1 (N)	+				+																			
Bananito (CR)	+				+																			
Batán (CR)	+				+																			

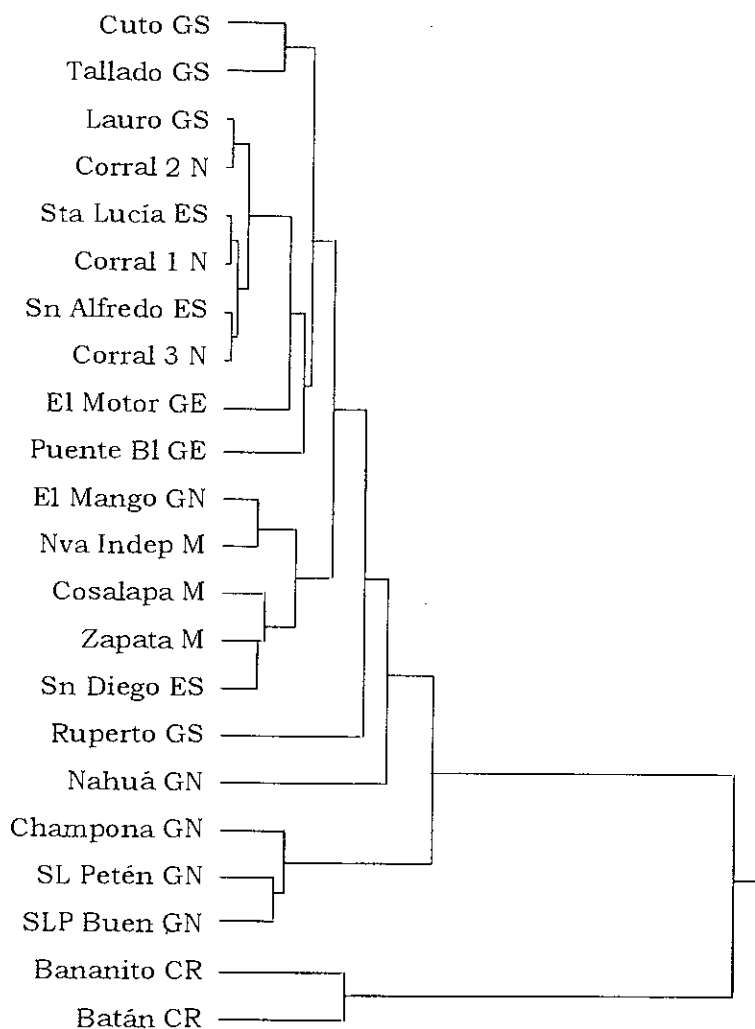
Al analizar las poblaciones de Nicaragua se puede observar que existe bastante flujo genético de estas poblaciones respecto de las poblaciones de Guatemala y El Salvador. Por ejemplo, no se observan diferencias genéticas significativas entre poblaciones de Nicaragua con Puente Blanco y El Motor, las dos poblaciones de la región Este de Guatemala. Además, se observa que existe flujo genético con respecto las poblaciones del Sur de Guatemala ya que respecto de Lauro las tres poblaciones de Nicaragua presentan flujo genético, y también el Corral 3 respecto de Tallado. También se observa que existe cierto grado de flujo genético de las poblaciones de Nicaragua respecto de la región Norte de Guatemala, ya que no se observan diferencias significativas entre el Corral 3 y San Luis Petén, Buenaventura. Por otro lado, respecto de las poblaciones de El Salvador se observa que existe un flujo genético constante, ya que las tres poblaciones de Nicaragua presentan valores significativamente similares a cero respecto de San Alfredo y Santa Lucía, y el Corral 1 tiene relación con San Diego. Sin embargo, se observó una diferencia genética significativamente mayor que cero entre Nicaragua y los otros dos países analizados, México y Costa Rica. Nótese que el hecho que el valor de significancia para P sea positivo, no indica que exista una diferencia genética significativa, pues ninguna de las poblaciones de México presenta un valor mayor de 0.014 para  $F_{st}$  respecto de Nicaragua, lo cual, según Hartl, indica poca diferencia genética.

Es importante notar que Costa Rica no pareciera tener ninguna relación significativa con México y los demás países de Centro América. Esto es interesante, pues debería haber una relación genética entre las poblaciones Costa Rica y las del Nicaragua, ya que las colectas para ambos casos se realizaron en el lado del Mar Caribe. Al analizar un mapa de la región, no parecería haber ningún tipo de barrera que redujera el flujo genético entre las poblaciones de Nicaragua y Costa Rica. Por otro lado, se esperaría que hubiera diferencia genética entre las poblaciones de Nicaragua y El Salvador debido a la presencia de varios accidentes geográficos, por ejemplo las cordilleras Isabella y Dariense en Nicaragua. También se esperaría que hubiera diferencia genética respecto de Guatemala, no sólo por distancia geográfica, sino por la presencia de otros accidentes geográficos como la cordillera Nombre de Dios, en Nicaragua.

En la figura 11, que se presenta abajo, se muestra un dendrograma, calculado con los valores linealizados del índice de correlación según Slatkin,  $F_{st}/(1-F_{st})$ . Este dendrograma presenta la relación existente entre las poblaciones al hacer las agrupaciones según el nivel de similitud.

El punto más importante en esta figura es la distinción marcada de dos grupos principales: 1) las poblaciones de Costa Rica y 2) las poblaciones del resto de Centro América y México. Esto indica que la mayor diferencia genética se encuentra entre las poblaciones de Costa Rica, al compararlas con las de Centro América y las de México. Este resultado es consistente con los resultados obtenidos anteriormente para el AMOVA y los índices de fijación.

Figura 11  
Dendrograma realizado a partir de un cluster análisis formulado con los valores de  $F_{st}/(1-F_{st})$  con el programa Phylip (Felsenstein et.al, 2001)



Luego, entre las poblaciones restantes, se observa otra separación en dos grupos. El primer grupo consiste en las poblaciones del Norte de Guatemala, y el segundo grupo consiste en las poblaciones restantes. Puede notarse que a pesar que Nahuá forma

parte del segundo grupo, es la primera población que se separa en el siguiente nivel. Esto indica que las poblaciones de la región del Norte de Guatemala están bastante relacionadas entre sí.

Al analizar las siguientes divisiones, se nota que las poblaciones de México están cercanamente relacionadas entre ellas, al igual que las de Nicaragua. Las poblaciones San Alfredo y Santa Lucía, de El Salvador, también están muy relacionadas con las de Nicaragua. Por último, se puede notar que las poblaciones de las regiones del Este y del Sur de Guatemala se encuentran bastante distribuidas en cuanto a la relación que presentan con las demás poblaciones. Esto mismo se puede notar al analizar los valores de  $F_{st}$  obtenidos para las poblaciones por parejas. En el cuadro 24 se puede observar que ninguno de los valores para  $F_{st}$  entre las poblaciones del Este y del Sur de Guatemala respecto de cualquier población del resto de Centro América o México (con la excepción de Costa Rica, y la pareja de Cuto con San Luis Petén) es mayor de 0.05; lo cual indica que hay muy poca diferencia genética. Esto sugiere que existe flujo genético entre todas las poblaciones desde México hasta Nicaragua, aunque las poblaciones de la región Norte de Guatemala parecen estar más aisladas genéticamente del resto.

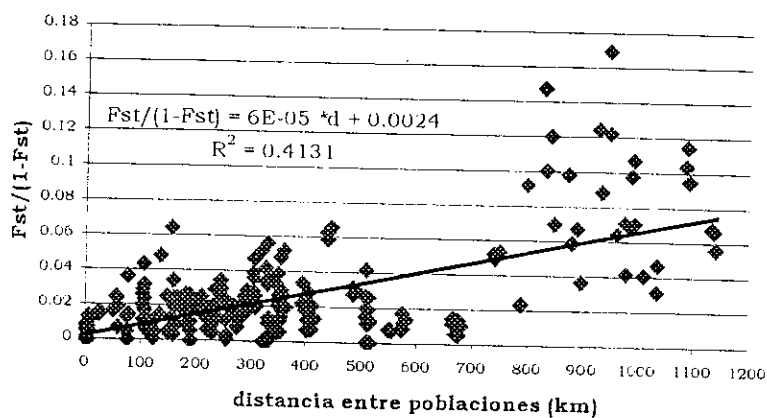
Para determinar si la diferencia genética encontrada entre las poblaciones se correlaciona con la distancia geográfica que existe entre las poblaciones, se realizó un análisis de correlación y el análisis de Mantel. El análisis de Mantel determina si la correlación obtenida de una relación lineal entre la distancia genética en función de la distancia geográfica es estadísticamente significativa.

En el cuadro 27 se muestran los resultados obtenidos para la correlación y del análisis de Mantel, y en las gráficas 29 y 30 se muestran las relaciones lineales y las correlaciones obtenidas para las variables de distancias genética y geográfica. Las pendientes positivas de las curvas de correlaciones sugieren que existe flujo genético entre las poblaciones de *Anopheles albimanus* estudiadas, y que este flujo disminuye conforme se aumenta la distancia geográfica entre las poblaciones. Además, los coeficientes de correlación son estadísticamente significativos como para indicar una correlación adecuada según el análisis de Mantel, ya que la probabilidad de que esta correlación se dé al azar, según la probabilidad de Mantel obtenida, es 0.000000.

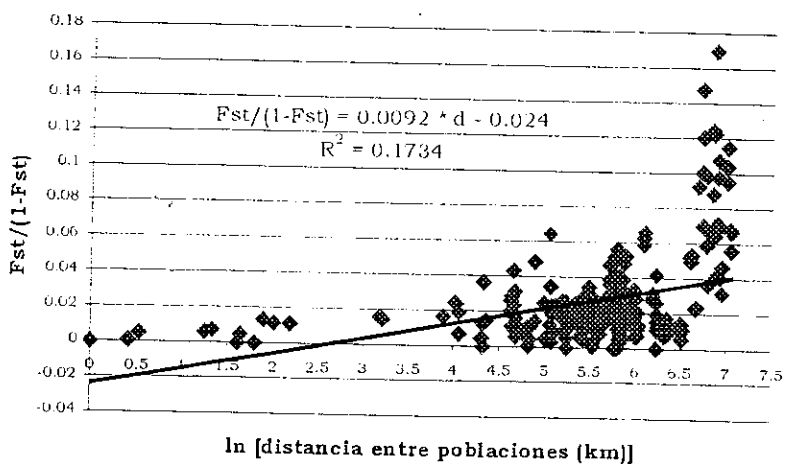
Cuadro 27  
Análisis de Mantel, correlación entre la distancia geográfica (en km) y la distancia genética según  $F_{st}/(1-F_{st})$  entre las poblaciones estudiadas

Correlación	Pendiente	Intercepto	R <sup>2</sup>	Probabilidad de Mantel
Fst/(1-Fst) en función de la distancia geográfica (km)	0.00006	0.0024	0.4131	0.000000
Fst/(1-Fst) en función del ln [distancia geográfica (km)]	0.0092	0.024	0.1734	0.000000

Gráfica 29  
Análisis de Mantel, correlación entre distancia geográfica (en km) y distancia genética según  $F_{st}/(1-F_{st})$  entre las poblaciones estudiadas



Gráfica 30  
Análisis de Mantel, correlación entre ln [distancia geográfica (en km)] y distancia genética según  $F_{st}/(1-F_{st})$  entre las poblaciones estudiadas



En el cuadro 28 se muestra la matriz de los valores de migrantes. De este cuadro se observa que el número de migrantes encontrados es muy alto para la mayoría de poblaciones. Según Black y Tabachnick (1996) al aumentar el número de individuos que migran de una subpoblación a otra, la estadística  $F_{st}$  presenta valores menores, debido a que las subpoblaciones se vuelven genéticamente similares.

Es importante mencionar que el número de migrantes para la mayoría de poblaciones es mayor a 10, lo cual según Black y Tabachnick (1996) es un indicador de que existe homogeneidad entre las poblaciones debido a la rapidez con la cual se puede llegar a reducir el valor de  $F_{st}$ . Únicamente la población de Batán presenta un valor menor a diez de migrantes respecto de la mayoría de poblaciones, aunque Bananito, que también se encuentra en Costa Rica, presenta valores mayores a diez en el 50% de los casos. Esto indica que existe flujo genético entre las poblaciones de México hasta Nicaragua, y cierto grado de flujo genético de estas poblaciones con Costa Rica, en especial con Bananito.

Los resultados obtenidos para este estudio son semejantes a los resultados obtenidos en dos estudios anteriores de genética de poblaciones para *Anopheles albimanus*. El primero es el realizado por Mérida (1999) con ADN mitocondrial como marcador molecular, para estudiar poblaciones de Guatemala y América Latina. En este primer estudio se obtuvo que la mayor diferencia genética se presentaba en Panamá y América del Sur, respecto de Centro América y México. En este estudio se encontró que existe flujo genético desde México hasta Nicaragua, pero en Costa Rica baja. El segundo es el estudio realizado por Schoua (2000), al utilizar microsatélites como marcador molecular para estudiar las regiones en Guatemala. Los resultados mostraron que no había diferencias genéticas significativas entre las poblaciones de Guatemala. Al igual que en este estudio se obtuvo que entre las regiones de Guatemala existe flujo genético, a pesar que se encuentran varios accidente geográficos de importancia como la Sierra de las Minas y la Sierra de los Cuchumatanes.

Cuadro 28  
Matriz de valores de Migrantes donde M=2Nm

	Cuto (GN)	Lauro (GN)	El Mango (GN)	Ruperto (GN)	Tallado (GN)	Champona (GS)	Nahuá (GS)	SL Petén (GS)	SLP Bue (GS)	El Motor (GE)	Pte Bico (GE)
Cuto (GN)											
Lauro (GN)	106.4856										
El Mango (GN)	34.61395	71.50929									
Ruperto (GN)	13.67413	86.75648	21.06429								
Tallado (GN)	66.7779	inf	31.73663	38.51782							
Champona (GS)	9.56375	31.2145	14.95493	18.87829	10.37824						
Nahuá (GS)	19.02997	33.0829	17.25041	16.94654	17.51292	20.31118					
SL Petén (GS)	8.90453	28.22322	9.68253	25.11202	11.88377	53.29489	11.55905				
SLP Bue (GS)	14.30394	63.64694	14.52551	25.65801	15.23866	69.58836	41.58934	70.77171			
El Motor (GE)	24.25604	711.7891	24.80903	43.54969	47.80402	19.01257	33.76861	19.87705	35.54491		
Pte Bico (GE)	48.6088	39.10661	27.63636	14.61121	24.843	10.34401	34.43341	7.76423	20.92838	26.41146	
Cosalapa (M)	17.29896	163.863	42.37708	61.52524	27.43395	41.10682	19.10763	24.1635	23.03448	39.94894	19.60855
Nva Ind (M)	19.03561	69.974	109.0479	26.33245	24.73247	25.36266	25.6902	12.82196	18.93105	41.48376	23.17431
Zapata (M)	21.23727	53.31886	37.79669	20.89629	15.78506	37.01572	25.50303	16.94474	27.87634	25.76137	22.85678
Sta Lucia (ES)	550.1033	inf	110.7531	28.31161	151.3825	14.43231	25.13714	13.76057	25.76285	83.94939	91.6835
Sn Alfredo (ES)	41.62785	89.92419	46.09983	19.17292	21.27961	17.08204	22.01675	10.57886	24.94566	30.17116	120.9463
Sn Diego (BS)	16.60552	57.89674	78.75993	30.73646	19.58708	23.21408	29.32033	12.72923	22.15499	43.13784	19.88503
Corral 3 (N)	58.39249	inf	64.41994	33.41018	63.20103	22.82142	23.289	18.64579	46.31851	73.91536	47.35093
Corral 2 (N)	42.71799	855.8716	60.26001	25.40641	29.0112	14.84345	17.72734	11.93478	26.39479	39.77745	68.85905
Corral 1 (N)	36.86279	inf	70.52975	44.77671	39.36341	27.90979	24.06172	19.28858	40.01534	69.94785	38.7253
Banarito (CR)	15.71777	11.92961	12.20105	7.04086	10.68378	5.08942	7.43612	4.65884	7.07482	8.46048	13.62065
Batán (CR)	7.30374	5.64453	7.75721	4.01825	5.11403	3.38895	4.1521	2.94958	4.08834	4.97319	7.15664

\* Nota: inf = infinito

Cuadro 28a  
Matriz de valores de Migrantes donde M=2Nm (continuación)

	Cosalapa (M)	Nva Ind (M)	Zapata (M)	Sta Lucía	Sn Alfredo	Sn Diego	Corral 3 (N)	Corral 2 (N)	Corral 1 (N)	Bananito	Batán (CR)
Cuto (GN)											
Lauro (GN)											
El Maugo (GN)											
Ruperto (GN)											
Tallado (GN)											
Cleatupona (GS)											
Nalutá (GS)											
SL Petén (GS)											
SLP Bue (GS)											
El Motor (GE)											
Pie Bico (GE)											
Cosalapa (M)											
Nva Ind (M)	104.7961										
Zapata (M)	97.80531	38.09955									
Sta Lucía (ES)	41.14127	43.40869	34.98587								
Sn Alfredo (ES)	38.57981	46.41391	89.56356	520.2913							
Sn Diego (ES)	91.5609	67.47544	98.22551	46.14247	43.75777						
Corral 3 (N)	42.18282	51.00782	42.39246	inf	778.5714	37.15066					
Corral 2 (N)	34.91833	37.05888	34.39718	699.2127	inf	47.92084	inf				
Corral 1 (N)	94.95506	47.33026	85.15446	943.4555	inf	99.44526	inf	inf			
Bananito (CR)	7.51734	7.35269	8.90114	21.76297	21.04621	9.34944	15.78237	18.05317	16.75135		
Batán (CR)	4.35288	4.81809	5.26792	9.58879	10.02456	5.42163	7.96047	8.52524	7.60073	30.4096	

## VI. CONCLUSIONES

1. Aparentemente no se encontraron alelos nulos para los loci 1-90 y 6-41. Sin embargo, se encontraron alelos nulos para los microsatélites 2-14 y 2-25.
2. Al analizar las distribuciones de las frecuencias alélicas de las poblaciones de México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica se determinó que existe un patrón muy similar entre las de Guatemala, El Salvador y Nicaragua para los microsatélites 1-90, 2-14, 2-25 y 6-41. Sin embargo, existe un poco de diferencia al comparar las frecuencias alélicas entre Guatemala, El Salvador y Nicaragua contra México; aunque la diferencia más notoria se observa en los patrones de frecuencia obtenidos para Costa Rica, al compararlos con los otros cuatro países.
3. Para el análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg se observó que la mayoría de poblaciones de *Anopheles albimanus* estudiadas para México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica estaban en equilibrio. Sin embargo, las poblaciones de Nahuá en Guatemala y Batán en Costa Rica, se encontraban fuera de equilibrio para los loci 1-90, 2-14 y 6-41, y las tres poblaciones de Nicaragua se encontraban fuera de equilibrio para el locus 2-14. Debido a la baja cantidad de poblaciones fuera de equilibrio se considera que para el caso de Nahuá y Batán, el desequilibrio se pueda deber a un error en el muestreo.
4. En el análisis de equilibrio de ligamiento por parejas de loci se descubrió que al analizar las poblaciones individuales únicamente para la pareja de loci 1-90 y 6-41 se encontraban todas las poblaciones en equilibrio. Pero al analizar el equilibrio de ligamiento por países se obtuvo que únicamente Nicaragua estaba fuera del equilibrio para la pareja de loci 1-90 y 2-14; para las otras cinco combinaciones posibles todos los países estaban en equilibrio. Esto sugiere que las poblaciones llevan mucho tiempo de haberse establecido y no ha existido recientemente ningún "cuello de botella".
5. En el análisis de varianza molecular, AMOVA, se obtuvo que la mayor variación molecular se presenta dentro de las colectas incluidos en el estudio (93.74%), y la menor variación (1.49%) se logró al comparar las poblaciones dentro de los grupos establecidos (el primer grupo incluye las poblaciones de México, Guatemala, El Salvador y Nicaragua; Costa Rica forma el segundo grupo). Por último, se observó

que existe una mayor variación (4.77%) al comparar los dos grupos establecidos que al cotejar las variaciones entre los grupos. Esto sugiere que Costa Rica presenta diferencias genéticas respecto de México, Guatemala, El Salvador y Nicaragua.

6. Los índices de fijación mostraron, al igual que el AMOVA, que existen diferencias genéticas moderadas al comparar Costa Rica con México, Guatemala, El Salvador y Nicaragua, ya que el índice  $F_{ct}$  fue de 0.04769 (un valor muy cercano a 0.05, el cual sugiere diferencias genéticas moderadas). Además, los índices  $F_{st}$  (0.06264) y  $F_{cs}$  (0.01570) reflejaron que la mayor variación genética está entre todos los individuos analizados, y la menor diferencia genética se observa entre poblaciones de un mismo grupo, respectivamente.
7. Al analizar los valores de  $F_{st}$  obtenidos por parejas de poblaciones, se observa que Costa Rica presenta diferencias significativas con respecto a todas las demás poblaciones de los países analizados. Se encontró que Nicaragua tiene flujo genético con El Salvador, y con las regiones Norte, Sur y Este de Guatemala; y también que El Salvador tiene flujo genético con las regiones Este y Sur de Guatemala. Para Guatemala se observa que la región Norte presenta flujo genético con México y la región Este con El Salvador.
8. La diferencia genética encontrada está correlacionada con la distancia geográfica, es decir que parece que el aislamiento genético se debe más a la distancia geográfica entre las colectas y no a barreras geográficas discretas que existen entre ellas.
9. Los resultados de este estudio son consistentes con los resultados obtenidos por Mérida et al. (1999) en un estudio de genética de poblaciones de *Anopheles albimanus*, al utilizar ADN mitocondrial como marcador molecular.

## VII. RECOMENDACIONES

Aumentar el número de poblaciones para Costa Rica, ya que el mínimo de individuos para los otros países estudiados es de 150. Otra razón por la cual se recomienda aumentar el número de poblaciones para Costa Rica es que se encontró que la población de Batán estaba fuera de equilibrio. Los resultados de esta población podrían estar desviando los resultados globales obtenidos. Además, debido a que se obtuvo una diferencia genética moderada entre Costa Rica y la región de México y el resto de países de Centro América, es recomendable obtener colectas de otras regiones de Costa Rica, en especial del lado del Pacífico, para ver si esta observación se mantiene.

Además de aumentar los puntos de colecta en los otros países, es recomendable conseguir poblaciones de México que fueran colectadas en el lado del Mar Caribe; y también podría ser útil conseguir poblaciones de Honduras, para incrementar el número de colectas del lado del Mar Caribe.

Por último, debido a que se encontró una diferencia genética moderada para Costa Rica, respecto de las otras poblaciones analizadas, se recomienda estudiar poblaciones más al sur del continente para determinar si esta tendencia continúa.

Por otro lado, se recomienda secuenciar dos de los alelos más frecuentes para cada una de las secuencias microsatélites, con el propósito de determinar el número exacto de repeticiones para estos alelos. Este dato es útil para concluir si existe o no una relación directamente proporcional entre el grado de polimorfismo y el número de repeticiones de las secuencias microsatélites.



## VIII. LITERATURA CITADA

- AnoDB. fecha de consulta 23/09/2000. *Malaria Vector Species*. An Anopheles Database. <http://www.embl-heidelberg.de/AnoDB/Species.malariaspecies.html>
- Aguilar, F.J. 1997. *Parasitología Médica*. 3ª ed. Litografía Delgado, S.A., Guatemala. 366pp.
- Ashley, M.V. y Dow, B.D. 1994. "The use of microsatellite analysis in population biology: Background, methods and potential applications". En: Wagner, G.P. y DeSalle, R. 1994. *Molecular Ecology and Evolution, Approaches and Applications*. Suiza.
- Black IV, W.C. y Du Teau, N.M. 1997. "RAPD-PCR and SSCP analysis for Insect Population Genetic Studies". En: Crampton, J.M., Beard, C.B y Louis, C. (Eds). *Molecular Biology of Insect Disease Vectors: a Methods Manual*. Chapman & Hall.
- Bradley, T. 1996. (fecha de consulta 2/9/2000) *History and Distribution*. Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Leicester. <http://history1900s.about.com/homework/history1900s/gi/dynamic/offsite.htm>; <http://www-micro.msb.le.ac.uk/224/Bradley/Biology.html>
- Chambers, G.K. y McAvoy, E.S. 2000. *Review, Microsatellites: consensus and controversy*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 126:455-476.
- Clark-Gil, S. Y Darsie Jr., R. 1983. *The mosquitoes of Guatemala: their identification, distribution and bionomics*. *Mosquito Systematics*. 15(3):151-283.
- Felsenstein, J. 2001. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Versión 3.6 (alpha 2)**. University of Washington. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/>
- Frederickson, E.C. 1993. *Bionomics and Control of Anopheles albimanus*. Technical Paper No. 34. Pan-American Health Organization (PAHO), USA. 76pp.
- Gwadz, R. y Collins, F.H. "Anopheleline Mosquitoes and the Agents they Transmit". En: Beaty, B.J. y Marquardt, W.C. (Eds.) 1996. *The Biology of Disease Vectors*. University Press, Colorado. 632pp.
- Hancock, J.M. "Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms". En: Goldstein, D.B., Schlötterer, C. (Eds.) 1999. *Microsatellites. Evolution and Applications*. Oxford University Press, Gran Bretaña. 364pp.
- Hartl, D.L. 1988. *A Primer of Population Genetics*. 2ª ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Massachusetts. 303pp.
- Huber, K., Mousson, L., Rodhain, F. y Failloux A. B. 1999. *Short Report: Microsatellite Sequences as Markers for Population Genetic Studies of the Mosquito Aedes aegypti, the Vector of Dengue Virus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61(6):1001-1003

- Knudson, D.L., Zheng, L., Gordon, S.W., Brown, S.E y Kafatos, F.C. "Genome Organization of Vectors". En: Beaty, B.J. y Marquardt, W.C. (Eds.) 1996. **The Biology of Disease Vectors**. University Press of Colorado, Colorado. 632pp.
- Mérida, A.M., Palmieri, M., Yurrita, M.M., Molina, A., Molina, E. y Black IV, W.C. 1999. **Mitochondrial DNA Variation Among Anopheles albimanus Populations**. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61(2):230-239
- Miller, L.H. y Warrell, D.A. "Malaria". En: Warren, K.S. y Mahmoud, A.A.F. (Eds.) 1990. **Tropical and Geographical Medicine**. 2ª ed. McGraw-Hill Information Services Company, USA. 1159pp.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 1988. **Memoria Anual 1987**. Sección de Educación Sanitaria, División de Malaria, Guatemala. 134pp.
- Murray, B.W. 1996. **The estimation of genetic distance and population structure for microsatellite allele frequency data**. Department of Biology, McMaster University, Ontario. (Fecha de consulta 14/09/2000) <http://helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html>
- Organización Mundial de la Salud. Octubre 1998. **Malaria. Fact Sheet No 94**. En: <http://www.who.int/inf-fs/en/fact94.html> (Consultado 2/9/2000)
- Ovalle, C.A. 1994. **Evaluación de la Variabilidad Temporal y Geográfica de los Espaciadores Intergénicos (IGS) de ADN ribosomal en Poblaciones de Anopheles albimanus de Guatemala**. Tesis, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.
- Padilla, N.R. 1995. **The Epidemiology of Plasmodium vivax Polymorphs and its Implications on Treatment and Control**. Project Proposal, Guatemala.
- Pan American Health Organization (PAHO). 1996. **Biology and Ecology of Anopheles albimanus Wiedemann in Central America**. Technical Paper No. 43. Organización Panamericana de la Salud.
- Pan American Health Organization (PAHO). (última fecha de modificación 6/6/1997). **Communicable Diseases: Current Status and Trends of Malaria in the Americas**. PAHO. <http://165.158.1.110/english/hcp/hctmal03.html> (consultado 2/9/2000)
- Prescot, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. 1996. **Micobiology**. 3ª ed. Wm. C. Brown Publishers, USA. 935pp.
- Rogers, W.O. "Plasmodium and Babesia". En: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. y Tenover, F.C. y Tenover, R.H. 1999. **Manual of Clinical Microbiology**. 7ª ed. ASM Press, Washington, D.C. 1773pp.
- Royal Perth Hospital Laboratory Medicine. (última revisión septiembre 2000). **Malaria On-Line Resources**. RPH Laboratory Medicine. <http://rph.wa.gov.au/labs/haem/malaria/history.html>
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L. 2000. **ARLEQUÍN ver 2.000**. University of Geneva. <http://anthro.unge.ch/arlequin/>

- Schoua, C. 2000. **Estudio genético de poblaciones del mosquito Anopheles albimanus mediante secuencias microsatélites**. Tesis, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.
- Slötterer, C. y Pemberton, J. "The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations". En: Wagner, G.P. y DeSalle, R. 1994. **Molecular Ecology and Evolution, Approaches and Applications**. Suiza.
- Sponsler, R.C. 1999. **Anopheles albimanus**. <http://www.anopheles.com/albimanus.html> (Fecha consulta: 13/9/2000)
- Sponsler, R.C. 2000. **Global Networking Against Malaria**. Malaria Foundation International. <http://www.malaria.org/> (consultada 9/2000)
- Sunnucks, P. 2000. **Efficient genetic markers for population biology**. *Trends in Ecology and Evolution*. 15(5):191-195
- Tabachnick, W.J. y Black IV, W.C. "Population Genetics in Vector Biology". En: Beaty, B.J. y Marquardt, W.C. (Eds.) 1996. **The Biology of Disease Vectors**. University Press of Colorado, Colorado. 632pp.
- Tabachnick, W.J. y Black IV, W.C. 1995. **Making a Case for Molecular Population Genetic Studies of Arthropod Vectors**. *Parasitology Today*. 11(1):27-30
- Walton, C., Thelwell, N.J., Priestman, A. y Butlin, R.K. 1998. **The Use of Microsatellites to Study Gene Flow in Natural Populations of Anopheles Malaria Vectors in Africa: Potential and Pitfalls**. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 14(3):266-272



## IX. ANEXOS

### A. Datos obtenidos en el estudio para las cuatro secuencias microsátélites

#### 1. Costa Rica

Cuadro 29  
Composición alélica para las poblaciones de Bananito y Batán

Bananito					Batán				
Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41	Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	166.75	200.29	102.34	185.48	1	157.61	206.54	104.46	185.48
	166.75	200.29	100.27	183.94		153.85	200.29	102.34	183.94
2	170.83	201.83	117.5	185.48	2	155.72	200.29	108.82	185.48
	151.39	200.29	104.46	185.48		155.72	200.29	104.46	185.48
3	166.75	201.83	117.5	190.19	3	166.75	200.29	104.46	190.19
	153.85	201.83	108.82	185.48		166.75	192.74	102.34	183.94
4	153.85	208.14	?	185.48	4	166.75	201.83	104.46	185.48
	153.85	200.29	?	185.48		166.75	200.29	104.46	185.48
5	160.17	208.14	117.5	190.19	5	162.11	201.83	104.46	187.82
	151.39	200.29	104.46	185.48		162.11	200.29	102.34	183.94
6	162.11	200.29	108.82	187.82	6	151.39	201.83	108.82	185.48
	155.72	200.29	104.46	185.48		151.39	200.29	102.34	183.94
7	153.85	194.97	104.46	187.82	7	166.75	225.64	102.34	185.48
	153.85	194.97	104.46	187.82		153.85	194.97	102.34	183.94
8	166.75	201.83	117.5	185.48	8	166.75	200.29	104.46	185.48
	153.85	200.29	104.46	183.94		166.75	200.29	102.34	185.48
9	166.75	200.29	117.5	190.19	9	166.75	201.83	104.46	185.48
	155.72	200.29	104.46	185.48		153.85	192.74	104.46	185.48
10	162.11	204.96	139.07	185.48	10	164.09	200.29	104.46	185.48
	157.71	200.29	102.34	185.48		162.11	200.29	104.46	183.94
11	170.83	192.74	117.5	185.48	11	162.11	201.83	104.46	187.82
	157.71	192.74	104.46	185.48		153.85	200.29	104.46	185.48
12	157.71	200.29	123.67	187.82	12	166.75	208.14	108.82	183.94
	153.85	200.29	110.5	185.48		151.39	200.29	102.34	183.94
13	160.17	204.96	108.82	185.48	13	170.83	213.82	104.46	185.48
	153.85	201.83	104.46	185.48		166.75	208.14	104.46	185.48
14	164.09	215.47	110.5	190.19	14	153.85	201.83	102.34	185.48
	153.85	200.29	104.46	190.19		153.85	200.29	100.27	185.48
15	157.71	201.83	117.5	190.19	15	169	200.29	104.46	187.82
	151.39	201.83	104.46	185.48		151.39	200.29	104.46	185.48
16	162.11	201.83	104.46	183.94	16	174.3	201.83	108.82	185.48
	162.11	200.29	104.46	183.94		155.72	200.29	102.34	183.94
17	162.11	200.29	104.46	190.19	17	162.11	200.29	108.82	183.94
	153.85	197.23	104.46	190.19		162.11	200.29	108.82	183.94
18	166.75	200.29	112.79	185.48	18	166.75	200.29	104.46	185.48
	157.71	200.29	104.46	183.94		151.39	200.29	102.34	183.94
19	166.75	200.29	112.79	185.48	19	153.85	201.83	106.62	190.19
	151.39	200.29	106.62	185.48		151.39	201.83	102.34	187.82
20	169	220	136.74	190.19	20	166.75	200.29	107.46	187.82
	155.72	200.29	117.5	190.19		155.72	200.29	102.34	185.48
21	162.11	200.29	104.46	185.48	21	157.61	208.14	108.82	190.19
	160.17	200.29	102.34	183.94		153.85	201.83	104.46	185.48
22	170.83	200.29	108.82	190.19	22	164.09	200.29	104.46	183.94
	162.11	200.29	104.46	185.48		153.85	200.29	104.46	183.94
23	166.75	204.96	108.82	185.48	23	169	200.29	104.46	183.94
	157.71	200.29	104.46	185.48		164.09	200.29	102.34	183.94

24	153.85	200.29	117.5	187.82	24	155.72	200.29	106.62	190.19
	153.85	192.74	106.62	185.48		153.85	200.29	102.34	187.82
25	177.13	200.29	115.12	187.82	25	153.85	200.29	117.5	183.94
	151.39	200.29	108.82	183.94		153.85	200.29	104.46	183.94
26	151.39	225.64	117.5	183.94	26	166.75	200.29	104.46	187.82
	151.39	201.83	104.46	183.94		166.75	200.29	102.34	185.48
27	166.75	201.83	102.34	187.82	27	153.85	200.29	104.46	185.48
	153.85	200.29	102.34	185.48		153.85	200.29	102.34	183.94
28	169	201.83	117.5	185.48	28	166.75	200.29	117.5	185.48
	166.75	201.83	104.46	183.94		153.85	200.29	106.62	183.94
29	160.17	236.26	108.82	185.48	29	153.85	200.29	104.46	183.94
	153.85	200.29	102.34	183.94		151.39	200.29	102.34	183.94
30	164.09	200.29	112.79	185.48	30	162.11	208.14	104.46	185.48
	155.72	194.97	102.34	185.48		155.72	200.29	102.34	183.94
31	166.75	223.91	102.34	187.82	31	151.39	201.83	108.82	185.48
	166.75	200.29	102.34	183.94		151.39	201.83	102.34	183.94
32	153.85	206.54	108.82	187.82	32	166.75	201.83	106.62	185.48
	151.39	200.29	108.82	185.48		153.85	200.29	104.46	183.94
33	166.75	204.96	108.82	187.82	33	166.75	200.29	104.46	185.48
	151.39	192.74	104.46	185.48		153.85	200.29	104.46	185.48
34	166.75	201.83	117.5	190.19	34	166.75	208.14	102.34	183.94
	162.11	201.83	104.46	183.94		166.75	200.29	102.34	183.94
35	151.39	201.83	139.07	190.19	35	166.75	200.29	102.34	185.48
	151.39	200.29	117.5	183.94		166.75	200.29	102.34	183.94
36	170.83	200.29	110.5	183.94	36	160.17	208.14	104.46	187.82
	151.39	200.29	104.46	183.94		151.39	200.29	104.46	187.82
37	157.71	201.83	110.5	185.48	37	164.09	206.54	104.46	185.48
	153.85	201.83	104.46	185.48		151.39	200.29	102.34	185.48
38	162.11	201.83	108.82	185.48	38	153.85	200.29	106.62	190.19
	155.72	200.29	108.82	185.48		153.85	192.74	104.46	185.48
39	153.85	200.29	115.12	185.48	39	151.39	200.29	115.12	185.48
	151.39	200.29	106.62	183.94		151.39	200.29	115.12	185.48
40	172.91	201.83	104.46	187.82	40	155.72	200.29	108.82	185.48
	162.11	201.83	104.46	185.48		155.72	200.29	108.82	185.48
41	153.85	201.83	104.46	190.19	41	157.61	201.83	106.62	183.94
	151.39	201.83	102.34	187.82		151.39	192.74	104.46	183.94
42	151.39	200.29	104.46	185.48	42	153.85	192.74	104.46	190.19
	151.39	200.29	102.34	185.48		153.85	192.74	104.46	185.48
43	153.85	208.14	104.46	185.48	43	153.85	208.14	106.62	190.19
	151.39	200.29	104.46	183.94		153.85	200.29	102.34	185.48
44	155.72	208.14	106.62	187.82	44	166.75	200.29	104.46	185.48
	142.51	200.29	104.46	183.94		157.61	200.29	102.34	183.94
45	155.72	217.13	106.62	185.48	45	166.75	204.96	108.82	185.48
	151.39	200.29	104.46	185.48		151.39	200.29	104.46	183.94
46	153.85	201.83	102.34	190.19	46	166.75	204.96	108.82	185.48
	151.39	200.29	102.34	185.48		151.39	200.29	108.82	183.94
47	153.85	200.29	117.5	187.82	47	153.85	200.29	106.62	185.48
	151.39	200.29	117.5	183.94		151.39	200.29	102.34	185.48
48	164.09	204.96	108.82	183.94	48	155.72	208.14	104.46	183.94
	151.39	200.29	104.46	183.94		155.72	201.83	104.46	183.94
49	166.75	201.83	104.46	185.48	49	166.75	200.29	104.46	185.48
	166.75	200.29	104.46	185.48		151.39	200.29	104.46	183.94
50	153.85	208.14	117.5	185.48	50	160.17	201.83	104.46	187.82
	151.39	201.83	102.34	185.48		153.85	200.29	104.46	185.48
51	160.17	194.97	117.5	190.19	51	153.85	200.29	104.46	185.48
	151.39	194.97	104.46	185.48		151.39	200.29	104.46	185.48
52	170.83	206.54	104.46	185.48	52	170.83	206.54	104.46	185.48
	160.17	201.83	102.34	183.94		155.72	200.29	102.34	183.94

53	166.75	232.04	104.46	185.48	53	151.39	204.96	104.46	185.48
	151.39	189.07	104.46	183.94		151.39	200.29	102.34	183.94
54	155.72	201.83	104.46	187.82	54	170.83	221.66	104.46	183.94
	153.85	200.29	102.34	185.48		162.11	208.14	104.46	183.94
55	155.72	204.96	104.46	185.48	55	166.75	200.29	106.62	190.19
	153.85	201.83	102.34	185.48		155.72	200.29	106.62	183.94
56	164.09	201.83	107.4	185.48	56	162.11	201.83	112.79	185.48
	153.85	200.29	104.46	183.94		157.61	192.74	104.46	185.48
57	162.11	200.29	108.82	185.48	57	166.75	208.14	149.88	187.82
	157.71	200.29	104.46	185.48		153.85	200.29	106.62	185.48
58	166.75	208.14	117.5	185.48	58	166.75	204.96	104.46	183.94
	157.71	204.96	104.46	185.48		166.75	200.29	104.46	183.94
59	153.85	217.13	102.34	190.19	59	151.39	201.83	106.62	190.19
	151.39	200.29	102.34	187.82		151.39	200.29	106.62	183.94
60	153.85	201.83	104.46	185.48	60	166.75	221.66	104.46	185.48
	151.39	194.97	104.46	185.48		151.39	201.83	104.46	183.94

## 2. El Salvador

Cuadro 30  
Composición alélica para la población de San Alfredo

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	155.72	206.54	104.46	187.82
	153.85	200.29	104.46	187.82
2	166.75	200.29	110.5	187.82
	155.72	200.29	106.62	182
3	153.85	208.14	104.46	187.82
	153.85	200.29	104.46	183.94
4	155.72	204.96	129.57	185.48
	153.85	201.83	102.34	182
5	160.17	208.14	102.34	187.82
	160.17	200.29	102.34	185.48
6	166.75	204.96	108.82	185.48
	160.17	201.83	104.46	185.48
7	170.83	209.74	115.12	190.19
	162.11	200.29	106.62	187.82
8	155.72	206.54	104.46	185.48
	153.85	206.54	102.34	185.48
9	164.09	208.14	110.5	187.82
	160.17	200.29	102.34	187.82
10	172.91	200.29	108.82	187.82
	157.61	200.29	104.46	183.94
11	155.72	217.13	102.34	185.48
	142.51	201.83	102.34	185.48
12	155.72	221.66	102.34	185.48
	153.85	200.29	104.46	185.48
13	170.83	204.96	133.79	190.19
	153.85	201.83	104.46	187.82
14	164.09	201.83	143.7	185.48
	155.72	201.83	112.79	185.48
15	162.11	194.97	104.46	185.48
	153.85	192.74	104.46	183.94
16	174.3	206.54	119.32	187.82
	157.61	200.29	104.46	185.48
17	162.11	220	108.82	187.82
	148.97	200.29	104.46	185.48

18	170.83	206.54	106.62	190.19
	151.39	204.96	102.34	183.94
19	166.75	200.29	104.46	185.48
	153.85	200.29	98.24	183.94
20	164.09	208.14	119.32	185.48
	160.17	200.29	104.46	185.48
21	177.13	200.29	108.82	190.19
	153.85	189.07	102.34	185.48
22	178.57	204.96	106.62	190.19
	162.11	200.29	106.62	185.48
23	160.17	206.54	108.82	194.06
	160.17	201.83	104.46	185.48
24	160.17	225.64	102.34	187.82
	151.39	204.96	98.24	187.82
25	160.17	232.04	115.12	187.82
	151.39	194.97	100.27	183.94
26	153.85	192.74	108.82	187.82
	151.39	192.74	102.34	183.94
27	162.11	212.18	106.62	190.19
	151.39	200.29	104.46	185.48
28	169	212.18	141.42	187.82
	155.72	204.96	108.82	182
29	155.72	200.29	108.82	187.82
	148.97	192.74	104.46	185.48
30	155.72	201.83	104.46	187.82
	153.85	200.29	102.34	185.48
31	155.72	208.14	108.82	187.82
	151.39	200.29	102.34	185.48
32	177.13	201.83	108.82	187.82
	160.17	194.97	102.34	185.48
33	166.75	194.97	106.62	185.48
	142.51	192.74	104.46	183.94
34	169	217.13	123.67	185.48
	153.85	192.74	110.5	185.48
35	178.57	200.29	106.62	187.82
	155.72	200.29	102.34	185.48
36	151.39	201.83	112.79	185.48
	151.39	192.74	104.46	183.94
37	169	204.96	108.82	185.48
	160.17	200.29	102.34	185.48
38	157.61	204.96	180.53	190.19
	153.85	200.29	110.5	187.82
39	166.75	209.74	108.82	190.19
	153.85	206.54	102.34	185.48
40	166.75	204.96	104.46	187.82
	157.61	201.83	102.34	185.48
41	172.91	204.96	106.62	187.82
	153.85	200.29	102.34	185.48
42	170.83	208.14	104.46	185.48
	157.61	204.96	104.46	185.48
43	166.75	217.13	110.5	190.19
	160.17	208.14	102.34	185.48
44	160.17	206.54	106.62	190.19
	153.85	201.83	102.34	190.19
45	160.17	223.91	104.46	187.82
	151.39	204.96	100.27	185.48
46	162.11	201.83	106.62	187.82
	155.72	192.74	102.34	185.48

47	169	200.29	106.62	187.82
	160.17	200.29	98.24	183.94
48	155.72	212.18	106.62	187.82
	151.39	200.29	104.46	185.48
49	162.11	206.54	106.62	187.82
	160.17	200.29	104.46	185.48
50	166.75	225.64	104.46	187.82
	160.17	204.96	104.46	187.82

Cuadro 31  
Composición alélica para las poblaciones de San Diego y Santa Lucía

San Diego					Santa Lucía				
Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41	Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	174.3	208.14	106.62	190.19	1	157.61	223.91	131.56	185.48
	153.85	206.54	104.46	185.48		153.85	201.83	100.27	183.94
2	155.72	201.83	104.46	187.82	2	157.61	212.18	102.34	185.48
	155.72	201.83	102.34	187.82		155.72	200.29	102.34	185.48
3	162.11	201.83	108.82	195.02	3	162.11	208.14	119.32	190.19
	155.72	200.29	104.46	190.19		142.51	201.83	102.34	185.48
4	166.75	206.54	106.62	192.59	4	160.17	212.18	106.62	187.82
	153.85	206.54	104.46	187.82		155.72	208.14	100.27	185.48
5	162.11	204.96	106.62	190.19	5	153.85	221.66	196.86	190.19
	151.39	192.74	102.34	190.19		153.85	206.54	102.34	185.48
6	160.17	204.96	104.46	192.59	6	169	204.96	104.46	190.19
	160.17	204.96	104.46	187.82		153.85	200.29	104.46	187.82
7	166.75	232.04	112.79	190.19	7	153.85	206.54	104.46	187.82
	155.72	217.13	100.27	190.19		153.85	204.96	102.34	185.48
8	155.72	213.82	127.14	192.59	8	155.72	212.18	104.46	185.48
	153.85	201.83	106.62	187.82		151.39	201.83	104.46	183.94
9	166.75	206.54	106.62	190.19	9	160.17	209.74	106.62	187.82
	153.85	192.74	104.46	190.19		157.61	204.96	104.46	183.94
10	166.75	204.96	102.34	195.02	10	162.11	201.83	102.34	187.82
	155.72	200.29	100.27	190.19		160.17	201.83	102.34	185.48
11	153.85	220	112.79	192.59	11	153.85	194.97	110.5	187.82
	153.85	204.96	106.62	187.82		151.39	192.74	104.46	185.48
12	153.85	204.96	106.62	190.19	12	162.11	209.74	108.82	190.19
	153.85	201.83	104.46	187.82		153.85	200.29	102.34	185.48
13	157.61	208.14	104.46	190.19	13	155.72	209.74	115.12	190.19
	153.85	206.54	102.34	187.82		153.85	206.54	104.46	187.82
14	162.11	209.74	104.46	192.59	14	164.09	206.54	108.82	187.82
	155.72	201.83	102.34	187.82		164.09	201.83	102.34	185.48
15	153.85	208.14	106.62	201.69	15	160.17	204.96	117.5	185.48
	153.85	204.96	102.34	185.48		155.72	200.29	112.79	185.48
16	160.17	209.74	110.5	192.59	16	169	213.82	102.34	187.82
	155.72	201.83	102.34	190.19		162.11	204.96	102.34	187.82
17	166.75	204.96	110.5	187.82	17	172.91	201.83	137.08	185.48
	166.75	192.74	104.46	187.82		164.09	201.83	100.27	185.48
18	157.61	209.74	117.5	192.59	18	155.72	201.83	119.32	187.82
	151.39	208.14	102.34	190.19		153.85	201.83	102.34	185.48
19	153.85	201.83	106.62	192.59	19	153.85	206.54	108.82	190.19
	153.85	201.83	98.24	185.48		153.85	200.29	104.46	183.94
20	153.85	201.83	106.62	190.19	20	162.11	206.54	108.82	185.48
	153.85	201.83	102.34	187.82		153.85	206.54	102.34	183.94
21	162.11	209.74	108.82	185.48	21	155.72	200.29	104.46	187.82
	151.39	192.74	108.82	183.94		155.72	200.29	102.34	185.48
22	162.11	206.54	123.67	187.82	22	162.11	204.96	104.46	185.48
	151.39	197.23	108.82	185.48		153.85	197.23	104.46	185.48

23	151.39	206.54	106.62	187.82	23	162.11	204.96	104.46	185.48
	153.85	201.83	104.46	185.48		153.85	200.29	102.34	182
24	155.72	201.83	119.32	190.19	24	157.61	204.96	108.82	187.82
	153.85	200.29	104.46	185.48		151.39	200.29	104.46	185.48
25	153.85	212.18	106.62	187.82	25	177.13	209.74	110.5	187.82
	153.85	206.54	100.27	185.48		166.75	200.29	110.5	183.94
26	153.85	213.82	117.5	185.48	26	162.11	201.83	102.34	185.48
	153.85	201.83	117.5	183.94		153.85	200.29	102.34	185.48
27	172.91	201.83	104.46	187.82	27	153.85	200.29	106.62	187.82
	164.09	192.74	104.46	183.94		151.39	200.29	102.34	185.48
28	155.72	200.29	110.5	190.19	28	153.85	225.64	106.62	187.82
	153.85	192.74	104.46	187.82		151.39	204.96	102.34	185.48
29	155.72	200.29	106.62	190.19	29	155.72	212.18	106.62	183.94
	151.39	192.74	104.46	190.19		151.39	206.54	104.46	183.94
30	153.85	194.97	106.62	187.82	30	153.85	217.13	123.67	183.94
	153.85	194.97	102.34	185.48		153.85	206.54	104.46	185.48
31	164.09	201.83	104.46	187.82	31	162.11	201.83	102.34	185.48
	160.17	192.74	102.34	187.82		151.39	200.29	102.34	185.48
32	155.72	208.14	?	185.48	32	155.72	201.83	108.82	185.48
	153.85	200.29	?	185.48		151.39	201.83	98.24	187.82
33	153.85	208.14	106.62	185.48	33	164.09	204.96	112.79	185.48
	151.39	200.29	98.32	185.48		157.61	192.74	102.34	185.48
34	166.75	201.83	106.62	187.82	34	160.17	201.83	104.46	190.19
	153.85	200.29	102.34	187.82		153.85	189.07	104.46	192.59
35	160.17	201.83	112.79	187.82	35	169	208.14	108.82	185.48
	153.85	204.96	112.79	185.48		157.61	200.29	106.62	187.82
36	162.11	204.96	139.07	187.82	36	162.11	204.96	106.62	185.48
	155.72	204.96	108.82	183.94		157.61	201.83	104.46	190.19
37	174.3	209.74	104.46	185.48	37	155.72	200.29	102.34	187.82
	162.11	206.54	104.46	183.94		153.85	200.29	104.46	185.48
38	162.11	204.96	141.42	187.82	38	153.85	209.74	106.62	190.19
	155.72	192.74	106.62	187.82		148.97	200.29	98.24	187.82
39	155.72	208.14	106.62	185.48	39	155.72	220	115.12	185.48
	155.72	204.96	98.24	185.48		153.85	200.29	106.62	183.94
40	190.19	206.54	102.34	190.19	40	166.75	212.18	102.34	185.48
	185.48	192.74	102.34	185.48		157.61	200.29	102.34	185.48
41	157.61	209.74	117.5	185.48	41	160.17	201.83	104.46	190.19
	155.72	200.29	104.46	185.48		155.72	194.97	104.46	187.82
42	164.09	200.29	137.08	185.48	42	155.72	217.13	104.46	190.19
	162.11	192.74	120.88	185.48		151.39	217.13	102.34	183.94
43	177.13	201.83	104.46	187.82	43	153.85	208.14	104.46	187.82
	155.72	200.29	102.34	185.48		153.85	201.83	102.34	185.48
44	155.72	209.74	108.82	187.82	44	166.75	201.83	131.56	185.48
	155.72	200.29	108.82	183.94		153.85	194.97	106.62	185.48
46	187.82	209.74	104.46	187.82	45	166.75	206.54	104.46	185.48
	185.48	209.74	102.34	185.48		153.85	200.29	102.34	185.48
47	160.17	209.74	112.79	187.82	46	169	200.29	117.5	190.19
	160.17	200.29	102.34	187.82		155.72	192.74	110.5	183.94
48	160.17	204.96	123.67	190.19	47	157.61	208.14	106.62	185.48
	155.72	192.74	110.5	190.19		155.72	204.96	104.46	185.48
49	162.11	212.18	110.5	195.02	48	153.85	197.23	120.88	187.82
	155.72	204.96	104.46	187.82		151.39	192.74	104.46	185.48
50	166.75	212.18	104.46	187.82	49	157.61	201.83	102.34	183.94
	155.72	200.29	104.46	187.82		148.97	194.97	100.27	183.94
					50	162.11	204.96	112.79	187.82
						162.11	192.74	106.62	185.48

## 3. Guatemala

Cuadro 32

Composición alélica para la poblaciones de Champona y El Mango

Champona					El Mango				
Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41	Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	160.17	206.54	104.46	187.82	1	157.61	204.96	106.62	183.94
	153.85	201.83	104.46	187.82		153.85	200.29	102.34	183.94
2	153.85	201.83	108.82	187.82	2	166.75	200.29	106.62	190.19
	151.39	200.29	102.34	187.82		153.85	200.29	102.34	185.48
3	162.11	201.83	110.5	185.48	3	153.85	201.83	106.62	187.82
	157.61	201.83	104.46	185.48		153.85	194.96	100.27	182
4	153.85	194.97	104.46	187.82	4	157.61	221.66	119.32	187.82
	170.83	194.97	102.34	187.82		157.61	209.74	108.82	185.48
5	164.09	204.96	119.32	187.82	5	162.11	201.83	104.46	190.19
	155.72	201.83	115.12	187.82		153.85	206.54	102.34	185.48
6	162.11	204.96	115.12	187.82	6	157.61	206.54	115.12	203.34
	151.39	200.29	115.12	187.82		155.72	200.29	106.62	187.82
7	170.83	212.18	104.46	187.82	7	155.72	204.96	106.62	190.19
	155.72	201.83	102.34	187.82		155.72	200.29	102.34	183.94
8	170.83	223.91	106.62	187.82	8	170.83	221.66	127.14	187.82
	157.61	212.18	104.46	185.48		157.61	209.74	106.62	183.94
9	151.39	204.96	104.46	190.19	9	153.85	204.96	104.46	187.82
	151.39	204.96	102.34	185.48		153.85	204.96	102.34	187.82
10	162.11	204.96	119.32	190.19	10	166.75	206.54	112.79	190.19
	155.72	212.18	115.12	183.94		162.11	200.29	108.82	182
11	164.09	204.96	108.82	190.19	11	153.85	206.54	123.67	185.48
	155.72	201.83	106.62	185.48		153.85	192.74	104.46	185.48
12	160.17	204.96	102.34	187.82	12	166.75	206.54	106.62	187.82
	151.39	201.83	102.34	185.48		153.85	200.29	106.62	185.48
13	162.11	201.83	106.62	190.19	13	157.61	206.54	104.46	187.82
	153.85	194.97	102.34	187.82		153.85	204.96	104.46	185.48
14	164.09	212.18	115.12	187.82	14	157.61	204.96	106.62	183.94
	151.39	201.83	104.46	187.82		153.85	204.96	104.46	183.94
15	157.61	204.96	108.82	187.82	15	153.85	212.18	115.12	185.48
	153.85	194.97	102.34	185.48		151.39	201.83	112.79	185.48
16	153.85	206.54	117.5	187.82	16	155.72	212.18	102.34	185.48
	153.85	206.54	104.46	187.82		153.85	192.74	102.34	185.48
17	157.61	215.47	108.82	190.19	17	155.72	201.83	108.82	187.82
	153.85	204.96	106.62	187.82		157.61	200.29	104.46	187.82
18	170.83	208.14	106.62	187.82	18	157.61	200.29	108.82	187.82
	166.75	204.96	102.34	183.94		155.72	200.29	106.46	185.48
19	162.11	208.14	115.12	187.82	19	153.85	204.96	108.82	190.19
	151.39	206.54	102.34	187.82		151.39	192.74	104.46	187.82
20	160.17	204.46	102.34	187.82	20	153.85	204.96	108.82	185.48
	151.39	200.29	102.34	187.82		153.85	200.29	104.46	183.94
21	162.11	212.18	106.62	187.82	21	166.75	204.96	112.79	185.48
	160.17	208.14	102.34	187.82		166.75	201.83	106.62	183.94
22	160.17	201.83	106.62	187.82	22	166.75	206.54	104.46	185.48
	153.85	201.83	106.62	185.48		162.11	204.96	104.46	185.48
23	170.83	212.18	106.62	187.82	23	164.09	189.07	108.82	187.82
	160.17	204.96	102.34	190.19		153.85	189.07	106.62	183.94

24	170.83	204.96	108.82	187.82	24	164.09	204.96	112.79	187.82
	170.83	206.54	104.46	190.19		155.72	200.29	104.46	185.48
25	170.83	220	110.5	190.19	30	153.85	206.54	117.5	185.48
	160.17	200.29	108.82	187.82		153.85	206.54	102.34	185.48
26	153.85	208.14	115.12	190.19	31	157.61	201.83	106.62	190.19
	153.85	206.54	115.12	187.82		153.85	192.74	104.46	183.94
27	170.83	213.82	112.79	187.82	32	157.61	206.54	110.5	187.82
	151.39	212.18	102.34	187.82		155.72	200.29	102.34	183.94
28	172.91	201.83	102.34	187.82	33	164.09	201.83	106.62	187.82
	155.72	201.83	102.34	185.48		162.11	200.29	102.34	187.82
29	155.72	206.54	106.62	187.82	34	157.61	212.18	134.91	190.19
	153.85	201.83	104.46	185.48		155.72	201.83	98.24	187.82
30	164.09	206.54	104.46	185.48	35	155.72	201.83	117.5	187.82
	157.61	201.83	102.34	185.48		155.72	200.29	104.46	185.48
31	178.57	212.18	106.62	187.82	36	169	206.54	104.46	187.82
	162.11	201.83	104.46	183.94		155.72	200.29	102.34	183.94
32	151.39	212.18	106.62	187.82	37	153.85	?	120.88	190.19
	151.39	208.14	102.34	185.48		151.39	?	112.79	183.94
33	155.72	212.18	104.46	187.82					
	151.39	201.83	100.27	185.48					
34	160.17	206.54	104.46	187.82					
	155.72	204.96	102.34	185.48					
35	162.11	223.91	112.79	185.48					
	160.17	194.97	102.34	183.94					
36	155.72	208.14	106.62	187.82					
	155.72	201.83	102.34	187.82					
37	166.75	201.83	108.82	185.48					
	153.85	201.83	106.62	183.94					

Cuadro 33  
Composición alélica para las poblaciones de Cuto y El Motor

Individuo	Cuto				Individuo	El Motor			
	1-90	2-14	2-25	6-41		1-90	2-14	2-25	6-41
1	169	227.86	102.34	185.48	1	174.3	220	102.34	192.59
	157.61	192.74	102.34	185.48		155.72	201.83	102.34	185.48
2	164.09	201.83	136.74	185.48	2	151.39	204.93	106.62	185.48
	157.61	194.97	102.34	187.82		153.85	204.93	98.24	185.48
3	162.11	227.86	104.46	185.48	3	155.72	223.91	104.46	187.82
	155.72	206.54	104.46	183.94		153.85	201.83	102.34	187.82
4	164.09	194.97	108.82	187.82	4	162.11	208.14	102.34	190.19
	153.85	212.18	102.34	185.48		162.11	208.14	102.34	187.82
5	169	204.96	115.12	187.82	5	162.11	201.83	108.82	187.82
	153.85	201.83	102.34	183.94		162.11	200.29	102.34	185.48
6	166.75	212.18	104.46	185.48	6	153.85	204.96	106.62	187.82
	157.61	200.29	104.46	185.48		153.85	201.83	104.46	185.48
7	164.09	206.54	110.5	185.48	7	166.75	201.83	104.46	187.82
	153.85	204.96	104.46	185.48		166.75	209.74	102.34	185.48
8	162.11	204.96	129.57	185.48	8	153.85	201.83	112.79	187.82
	157.61	200.29	106.62	187.82		153.85	192.74	104.46	185.48
9	155.72	206.54	108.82	185.48	9	153.85	192.74	102.34	187.82
	153.85	204.96	108.82	187.82		153.85	204.93	102.34	185.48

10	155.72	215.47	108.82	185.48	10	157.61	213.82	108.82	185.48
	157.61	200.29	98.24	185.48		155.72	201.83	108.82	185.48
11	164.09	204.96	136.74	185.48	11	157.61	208.14	104.46	187.82
	153.85	201.83	102.34	187.82		153.85	208.14	100.27	183.94
12	162.11	215.47	108.82	185.48	12	174.3	206.54	104.46	187.82
	157.61	200.29	102.34	187.82		160.17	209.74	98.24	185.48
13	174.3	200.29	104.46	190.19	13	160.17	201.83	112.79	187.82
	162.11	200.29	102.34	185.48		155.72	209.74	104.46	185.48
14	178.57	201.83	104.46	185.48	14	162.11	201.83	129.57	187.82
	164.09	201.83	102.34	187.82		153.85	192.74	104.46	185.48
15	169	194.97	112.79	185.48	15	164.09	223.91	106.62	187.82
	157.61	194.97	102.34	197.48		157.61	208.14	102.34	185.48
16	162.11	206.54	108.82	190.19	16	166.75	208.14	104.46	190.19
	155.72	204.96	106.62	187.82		151.39	201.83	102.34	185.48
17	157.61	212.18	104.46	187.82	17	162.11	201.83	106.62	185.48
	155.72	200.29	104.46	185.48		155.72	192.74	106.62	185.48
18	157.61	204.96	102.34	190.19	18	162.11	201.83	108.82	187.82
	153.85	194.97	100.27	185.48		174.3	227.86	108.82	185.48
19	155.72	212.18	115.12	190.19	19	155.72	204.93	102.34	187.82
	153.85	201.83	104.46	190.19		153.85	192.74	102.34	185.48
20	162.11	204.96	108.82	190.19	20	155.72	223.91	106.62	190.19
	162.11	201.83	100.27	190.19		151.39	201.83	104.46	190.19
21	151.39	206.54	108.82	185.48	21	162.11	208.14	136.74	187.82
	172.91	197.23	102.34	185.48		162.11	201.83	104.46	185.48
22	178.57	201.83	104.46	185.48	22	170.83	209.74	108.82	195.02
	172.91	200.29	104.46	185.48		151.39	192.74	104.46	190.19
23	155.72	220	108.82	192.59	23	174.3	204.93	123.67	185.48
	153.85	194.97	104.46	185.48		155.72	204.93	102.34	185.48
24	164.09	212.18	102.34	185.48	24	174.3	206.54	108.82	187.82
	153.85	204.96	102.34	185.48		174.3	204.93	104.46	187.82
25	166.75	201.83	110.5	185.48	25	160.17	192.74	108.82	187.82
	162.11	200.29	104.46	190.19		153.85	189.07	106.62	185.48
26	153.85	215.47	104.46	190.19	26	162.11	206.54	104.46	187.82
	151.39	206.54	102.34	183.94		153.85	201.83	102.34	187.82
27	162.11	212.18	108.82	185.48	27	153.85	201.83	104.46	185.48
	162.11	204.96	104.46	187.82		153.85	201.83	104.46	185.48
28	162.11	201.83	106.62	185.48	28	157.61	208.14	104.46	187.82
	153.85	201.83	102.34	185.48		153.85	206.54	102.34	187.82
29	162.11	200.29	104.46	185.48	29	157.61	204.93	104.46	203.34
	155.72	192.74	100.27	187.82		155.72	204.93	102.34	185.48
30	155.72	206.54	143.7	185.48	30	160.17	201.83	112.79	185.48
	151.39	204.96	102.34	185.48		153.85	201.83	104.46	185.48
31	157.61	204.96	115.12	190.19	31	153.85	206.54	102.34	185.48
	157.61	194.97	108.82	187.82		151.39	200.29	102.34	185.48
32	155.72	204.96	104.46	185.48	32	160.17	209.74	106.62	187.82
	153.85	200.29	104.46	190.19		157.61	192.74	106.62	185.48
33	153.85	200.29	104.46	185.48	33	157.61	209.74	102.34	187.82
	153.85	192.74	102.34	185.48		155.72	201.83	102.34	185.48
34	155.72	201.83	104.46	185.48	34	170.83	192.74	104.46	190.19
	153.85	200.29	102.34	190.19		155.72	209.74	102.34	183.94
35	162.11	212.18	104.46	185.48	35	155.72	206.54	106.62	210.95
	162.11	194.97	104.46	187.82		153.85	223.91	102.34	183.94

36	164.09	200.29	117.5	185.48	36	162.11	206.54	106.62	190.19
	157.61	189.07	112.79	187.82		155.72	200.29	104.46	190.19
37	162.11	200.29	104.46	197.48	37	153.85	204.93	106.62	185.48
	153.85	200.29	104.46	185.48		162.11	201.83	104.46	183.94
38	157.61	204.96	115.12	183.94	38	153.85	204.93	106.62	187.82
	155.72	200.29	102.34	182		155.72	201.83	102.34	185.48
39	157.61	212.18	106.62	192.59	39	153.85	208.14	125.09	187.82
	153.85	201.83	102.34	185.48		157.61	201.83	102.34	185.48
40	157.61	212.18	102.34	185.48	40	164.09	209.74	106.62	185.48
	157.61	189.07	102.34	183.94		170.83	204.96	102.34	185.48
41	164.09	206.54	117.5	185.48	41	170.83	209.74	104.46	187.82
	157.61	200.29	108.82	183.94		157.61	204.96	102.34	185.48
42	155.72	212.18	106.62	185.48	42	153.85	206.54	108.82	192.59
	153.85	200.29	106.62	185.48		160.17	204.96	104.46	185.48
43	157.61	200.29	112.79	190.19	43	153.85	206.54	106.62	192.59
	151.39	200.29	102.34	187.82		160.17	204.93	104.46	185.48
44	153.85	201.83	106.62	185.48	44	153.85	204.93	104.46	192.59
	153.85	200.29	102.34	185.48		151.39	204.93	100.27	185.48
45	155.72	204.96	108.82	185.48	45	155.72	204.96	108.82	187.82
	153.85	200.29	98.24	185.48		155.72	204.96	102.34	183.94
46	164.09	204.96	120.88	187.82	46	155.72	204.96	115.12	185.48
	157.61	204.96	102.34	185.48		162.11	204.96	102.34	183.94
47	162.11	212.18	106.62	187.82	47	157.61	212.18	136.74	187.82
	157.61	200.29	104.46	185.48		164.09	212.18	102.34	187.82
48	?	206.54	106.62	187.82	48	155.72	204.96	110.5	185.48
	?	200.29	102.34	187.82		153.85	192.74	104.46	183.94

Cuadro 34

Composición alélica para las poblaciones de Lauro 27/3/1996 y Lauro 7/6/1995

Lauro 27/3/1996					Lauro 7/6/1995				
Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41	Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	160.17	208.14	119.32	187.82	6	155.72	200.29	108.82	187.82
	153.85	201.83	106.62	185.48		155.72	194.97	104.46	185.48
2	162.11	212.18	106.62	187.82	7	170.83	201.83	102.34	187.82
	151.39	201.83	102.34	185.48		162.11	209.74	102.34	185.48
3	164.09	206.54	115.12	185.48	8	153.85	208.14	108.82	185.48
	157.61	192.74	102.34	185.48		155.72	201.83	104.46	185.48
4	178.57	206.54	125.09	197.48	9	153.85	204.96	129.57	192.5
	153.85	189.07	104.46	185.48		153.85	201.83	104.46	185.48
5	170.83	206.54	117.5	187.82	10	166.75	204.96	102.34	190.19
	151.39	208.14	102.34	185.48		157.61	189.07	102.34	190.19
6	153.85	197.23	165.55	187.82	11	160.17	201.83	119.32	203.34
	153.85	201.83	102.34	185.48		153.85	200.29	104.46	187.82
7	153.85	204.96	104.46	187.82	12	180.74	215.47	112.79	190.19
	162.11	201.83	104.46	185.48		157.61	201.83	102.34	185.48
8	170.83	206.54	104.46	190.19	13	162.11	200.29	106.62	187.82
	164.09	197.23	104.46	187.82		155.72	192.74	102.34	185.48
9	170.83	206.54	131.56	190.19	14	162.11	208.14	112.79	187.82
	151.39	204.96	102.34	187.82		155.72	204.96	102.34	185.48
10	157.61	201.83	104.46	187.82	15	157.61	206.54	104.46	185.48
	157.61	200.29	104.46	187.82		153.85	194.97	102.34	185.48

11	153.85	204.96	115.12	187.82	16	164.09	208.14	106.62	185.48
	153.85	201.83	106.62	187.82		153.85	204.96	106.62	182
12	151.39	200.29	115.12	187.82	17	153.85	200.29	112.79	187.82
	157.61	197.23	104.62	185.48		153.85	192.74	104.46	185.48
13	151.39	236.26	108.82	187.82	18	174.3	200.29	108.82	185.48
	164.09	189.07	104.46	185.48		153.85	197.23	104.46	185.48
14	157.61	217.13	108.82	190.19					
	162.11	206.54	102.34	190.19					

Cuadro 35  
Composición alélica para las poblaciones de Nahuá y Ruperto 27/3/1996

Nahuá					Ruperto 27/3/1996				
Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41	Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	166.75	201.83	131.56	185.48	1	162.11	217.13	115.12	203.34
	157.61	201.83	102.34	185.48		155.72	201.83	102.34	187.82
2	162.11	204.96	119.32	185.48	2	166.75	209.74	112.79	185.48
	157.61	194.97	119.32	185.48		155.72	201.83	102.34	182
3	155.72	206.54	106.62	183.94	3	153.85	204.96	104.46	185.48
	155.72	194.97	104.46	183.94		148.97	204.96	104.46	185.48
4	166.75	227.86	108.82	187.82	4	157.61	209.74	102.34	185.48
	155.72	206.54	102.34	187.82		153.85	209.74	102.34	182
5	166.75	212.18	153.35	187.82	5	164.09	201.83	117.5	192.59
	155.72	201.83	106.62	187.82		155.72	194.97	117.5	185.48
6	160.17	208.14	102.34	187.82	6	166.75	201.83	106.62	187.82
	153.85	201.83	102.34	183.94		160.17	201.83	100.27	185.48
7	178.57	200.29	112.79	190.19	7	160.17	204.96	108.82	187.82
	155.72	200.29	104.46	187.82		153.85	200.29	102.34	187.82
8	162.11	215.47	102.34	185.48	8	153.85	206.54	110.5	192.59
	155.72	215.47	102.34	185.48		142.51	204.96	106.62	187.82
9	160.17	206.54	108.82	190.19	9	166.75	204.96	174.74	185.48
	160.17	204.96	106.62	185.48		153.85	200.29	102.34	182
10	155.72	208.14	112.79	182	10	153.85	204.96	102.34	185.48
	162.11	208.14	112.79	182		148.97	201.83	100.27	185.48
11	170.83	201.83	115.12	185.48	11	164.09	212.18	115.12	187.82
	155.72	201.83	102.34	185.48		153.85	204.96	110.5	187.82
12	166.75	201.83	104.46	185.48	12	155.72	204.96	110.5	187.82
	162.11	201.83	102.34	185.48		153.85	192.74	110.5	185.48
13	153.85	206.54	112.79	190.19	13	166.75	204.96	106.62	185.48
	153.85	201.83	104.46	185.48		153.85	201.83	102.34	185.48
14	162.11	206.54	108.82	203.34	14	172.91	223.91	106.62	185.48
	157.61	201.83	104.46	190.19		153.85	209.74	104.46	182
15	170.83	201.83	117.5	187.82	15	155.72	204.96	115.12	190.19
	155.72	194.97	104.46	187.82		148.97	200.29	112.79	185.48
16	155.72	201.83	106.62	187.82	16	164.09	204.96	115.12	192.59
	155.72	201.83	104.46	187.82		153.85	192.74	112.79	185.48
17	170.83	215.47	104.46	187.82					
	157.61	194.97	102.34	185.48					
18	155.72	217.13	106.62	190.19					
	155.72	204.96	104.46	185.48					
19	155.72	208.14	136.74	187.82					
	166.75	208.14	104.46	185.48					

20	162.11	212.18	115.12	185.48					
	162.11	204.96	102.34	185.48					
21	155.72	215.47	108.82	190.19					
	155.72	204.96	106.62	190.19					
22	170.83	208.14	106.62	185.48					
	155.72	201.83	104.46	185.48					
23	162.11	204.96	108.82	187.82					
	155.72	204.96	104.46	187.82					
24	162.11	212.18	110.5	187.82					
	162.11	206.54	106.62	185.48					

Cuadro 36  
Composición alélica para las poblaciones de Ruperto 4/10/1995 y Puente Blanco

Ruperto 4/10/1995					Puente Blanco				
Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41	Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	160.17	206.54	106.62	185.48	1	162.11	217.13	115.12	203.34
	160.17	201.83	104.46	182		155.72	201.83	102.34	187.82
2	151.39	212.18	106.62	187.82	2	166.75	209.74	112.79	185.48
	151.39	208.14	104.46	185.48		155.72	201.83	102.34	182
3	155.72	201.83	104.46	190.19	3	153.85	204.96	104.46	185.48
	153.85	189.07	104.46	187.82		148.97	204.96	104.46	185.48
4	164.09	201.83	127.14	187.82	4	157.61	209.74	102.34	185.48
	162.11	192.74	106.62	185.48		153.85	209.74	102.34	182
5	164.09	201.83	104.46	185.48	5	164.09	201.83	117.5	192.59
	153.85	197.23	102.34	185.48		155.72	194.97	117.5	185.48
6	153.85	208.14	123.67	192.59	6	166.75	201.83	106.62	187.82
	157.61	201.83	104.46	185.48		160.17	201.83	100.27	185.48
7	155.72	206.54	123.67	187.82	7	160.17	204.96	108.82	187.82
	155.72	201.83	104.46	185.48		153.85	200.29	102.34	187.82
8	157.61	204.96	106.62	187.82	8	153.85	206.54	110.5	192.59
	160.17	201.83	102.34	185.48		142.51	204.96	106.62	187.82
9	164.09	209.74	106.62	190.19	9	166.75	204.96	174.74	185.48
	166.75	206.54	106.62	187.82		153.85	200.29	102.34	182
10	153.85	201.83	106.62	185.48	10	153.85	204.96	102.34	185.48
	153.85	201.83	102.34	185.48		148.97	201.83	100.27	185.48
11	153.85	206.54	104.46	185.48	11	164.09	212.18	115.12	187.82
	157.61	192.74	102.34	185.48		153.85	204.96	110.5	187.82
12	160.17	206.54	110.5	185.48	12	155.72	204.96	110.5	187.82
	164.09	201.83	102.34	185.48		153.85	192.74	110.5	185.48
13	164.09	206.54	108.82	185.48	13	166.75	204.96	106.62	185.48
	153.85	201.83	106.62	187.82		153.85	201.83	102.34	185.48
14	153.85	217.13	106.62	187.82	14	172.91	223.91	106.62	185.48
	153.85	201.83	106.52	190.19		153.85	209.74	104.46	182
15	160.17	206.54	108.82	187.82	15	155.72	204.96	115.12	190.19
	148.97	201.83	102.34	185.48		148.97	200.29	112.79	185.48
16	148.97	201.83	108.82	187.82	16	164.09	204.96	115.12	192.59
	153.85	192.74	104.46	190.19		153.85	192.74	112.79	185.48
17	164.09	213.82	106.62	182	17	153.85	201.83	108.82	187.82
	155.72	213.82	104.46	185.48		153.85	189.07	102.34	185.48
18	153.85	213.82	106.62	185.48	18	162.11	223.91	104.46	185.48
	164.09	206.54	106.62	185.48		160.17	206.54	102.34	185.48
19	164.09	201.83	104.46	185.48	19	166.75	223.91	104.46	187.82
	157.61	201.83	104.46	185.48		162.11	206.54	104.46	185.48
20	153.85	217.13	106.62	185.48	20	155.72	200.29	104.46	190.19
	153.85	206.54	104.46	187.82		155.72	194.97	104.46	187.82

21	160.17	206.54	106.62	185.48	21	155.72	215.47	106.62	187.82
	164.09	201.83	104.46	187.82		153.85	200.29	102.34	185.48
22	153.85	204.96	104.46	187.82	22	155.72	201.83	108.82	195.48
	153.85	192.74	104.46	187.82		155.72	201.83	102.34	185.48
23	164.09	206.54	104.46	187.82	23	160.17	212.18	112.79	190.19
	153.85	206.54	104.46	187.82		157.61	206.54	112.79	185.48
24	166.75	220	129.57	187.82	24	166.75	200.29	106.62	187.82
	162.11	201.83	108.82	187.82		153.85	192.74	104.46	185.48
25	153.85	204.96	104.46	185.48	25	160.17	217.13	106.62	187.82
	162.11	192.74	102.34	185.48		160.17	206.54	100.27	185.48
26	153.85	206.54	102.34	190.19	26	155.72	206.54	110.5	185.48
	162.11	192.74	102.34	185.48		155.72	200.29	102.34	185.48
27	153.85	201.83	106.62	187.82	27	166.75	204.96	104.46	190.19
	155.72	192.74	104.46	187.82		155.72	200.29	104.46	185.48
28	155.72	225.64	119.32	182	28	160.17	201.83	177.63	187.82
	157.61	208.14	102.34	185.48		155.72	201.83	112.79	185.48
29	153.85	201.83	110.5	187.82	29	174.3	208.14	104.46	185.48
	157.61	201.83	106.62	190.19		153.85	200.29	102.34	185.48
30	160.17	201.83	104.46	185.48	30	170.83	204.96	110.5	190.19
	153.85	200.29	104.46	187.82		160.17	192.74	104.46	190.19
31	153.85	221.66	127.14	187.82	31	160.17	215.47	112.79	187.82
	155.72	204.96	102.34	187.82		155.72	206.54	102.34	185.48
32	160.17	206.54	102.34	187.82	32	166.75	201.83	106.62	185.48
	151.39	204.96	102.34	185.48		155.72	201.83	104.46	185.48
33	153.85	201.83	108.82	187.82	33	155.72	201.83	115.12	185.48
	164.09	201.83	106.62	185.48		155.72	201.83	106.62	185.48
34	153.85	208.14	104.46	187.82	34	160.17	206.54	108.82	187.82
	164.09	201.83	102.34	185.48		155.72	192.74	104.46	187.82
35	172.91	208.14	112.79	190.19	35	155.72	212.18	106.62	187.82
	160.17	201.83	108.82	187.82		155.72	204.96	104.46	185.48
36	153.85	204.96	136.74	185.48	36	157.61	200.29	108.82	187.82
	157.61	201.83	106.62	185.48		155.72	189.07	104.46	185.48
37	153.85	204.96	112.79	187.82	37	170.83	204.96	104.46	190.19
	160.17	201.83	106.62	187.82		157.61	189.07	102.34	190.19
38	153.85	201.83	104.46	187.82	38	162.11	200.29	102.34	185.48
	160.17	189.07	104.46	182		160.17	189.07	102.34	185.48
39	153.85	208.14	108.82	187.82	39	166.75	200.29	119.32	187.82
	160.17	201.83	102.34	185.48		157.61	192.74	102.34	185.48
40	153.85	201.83	112.79	187.82	40	155.72	212.18	127.14	187.82
	157.61	201.83	104.46	182		153.85	206.54	102.34	185.48
41	153.85	213.82	104.46	187.82	41	155.72	206.54	117.5	187.82
	151.39	192.74	102.34	185.48		155.72	189.07	102.34	185.48
42	153.85	204.96	106.62	187.82	42	155.72	204.96	104.46	187.82
	162.11	201.83	104.46	182		155.72	200.29	102.34	185.48
43	153.85	208.14	104.46	187.82	43	177.13	200.29	129.57	187.82
	153.85	201.83	104.46	185.48		155.72	200.29	102.34	185.48
44	157.61	201.83	106.62	185.48	44	155.72	215.47	108.82	187.82
	160.17	192.74	106.62	182		153.85	206.54	106.62	185.48
45	166.75	201.83	106.62	182	45	170.83	201.83	129.57	185.48
	160.17	201.83	102.34	187.82		155.72	201.83	129.57	185.48
46	155.72	223.91	106.62	182	46	170.83	223.91	108.82	187.82
	155.72	204.96	104.46	187.82		151.39	201.83	106.62	185.48
47	157.61	201.83	106.62	182	47	162.11	220	106.62	187.82
	153.85	201.83	102.34	185.48		153.85	201.83	104.46	183.94
48	151.39	213.82	125.09	182	48	157.61	206.54	112.79	185.48
	151.39	201.83	102.34	190.19		151.39	201.83	102.34	185.48

Cuadro 37  
Composición alélica para las poblaciones de San Luis Petén y San Luis Petén  
Buenaventura

San Luis Petén					San Luis Petén Buenaventura				
Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41	Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	153.85	204.96	106.62	187.82	1	155.72	200.29	110.5	187.82
	151.39	201.83	106.62	185.48		153.85	200.29	102.34	187.82
2	153.85	204.96	115.12	187.82	2	162.11	208.14	110.5	185.48
	153.85	204.96	115.12	185.48		155.72	201.83	102.34	185.48
3	153.85	204.96	102.34	185.48	3	164.09	200.29	100.27	190.19
	157.61	192.74	102.34	183.94		155.72	197.23	100.27	183.94
4	162.11	201.83	117.5	185.48	4	174.3	204.96	108.82	187.82
	153.85	201.83	106.62	187.82		170.83	197.23	102.34	185.48
5	157.61	206.54	102.34	185.48	5	155.72	200.29	106.62	187.82
	160.17	201.83	102.34	185.48		155.72	201.83	104.46	185.48
6	162.11	213.82	108.82	187.82	6	162.11	208.14	104.46	187.82
	162.11	201.83	104.46	187.82		153.85	201.83	102.34	185.48
7	160.17	204.96	102.34	187.82	7	162.11	201.83	115.12	185.48
	153.85	201.83	102.34	187.82		153.85	200.29	102.34	185.48
8	164.09	192.74	104.46	187.82	8	170.83	209.74	106.62	187.82
	162.11	192.74	102.34	190.19		164.09	201.83	106.62	185.48
9	164.09	204.96	106.62	190.19	9	155.72	221.66	112.79	187.82
	162.11	201.83	102.34	187.82		151.39	201.83	104.46	187.82
10	162.11	208.14	106.62	187.82	10	160.17	201.83	102.34	187.82
	151.39	204.96	102.34	185.48		151.39	201.83	102.34	185.48
11	153.85	201.83	108.82	187.82	11	157.61	201.83	102.34	187.82
	153.85	201.83	102.34	185.48		148.97	200.29	102.34	185.48
12	169	201.83	104.46	187.82	12	162.11	204.96	104.46	187.82
	169	201.83	102.34	183.94		162.11	201.83	104.46	185.48
13	151.39	208.14	115.12	187.82	13	174.3	213.82	115.12	190.19
	151.39	201.83	102.34	187.82		155.72	213.82	104.46	187.82
14	160.17	208.14	112.79	187.82	14	174.3	220	110.5	187.82
	160.17	208.14	108.82	187.82		157.61	209.74	108.82	185.48
15	157.61	201.83	117.5	187.82	15	155.72	208.14	115.12	187.82
	153.85	201.83	102.34	190.19		153.85	206.54	102.34	185.48
16	157.61	?	110.5	187.82	16	162.11	206.54	106.62	187.82
	157.61	?	104.46	185.48		157.61	197.23	102.34	185.48
17	151.39	201.83	129.57	187.82	17	170.83	212.18	106.62	190.19
	151.39	197.23	98.24	185.48		160.17	206.54	106.62	187.82
18	162.11	201.83	115.12	187.82	18	160.17	201.83	106.62	187.82
	155.72	201.83	102.34	185.48		155.72	200.29	102.34	185.48
19	164.09	213.82	115.12	187.82	19	178.57	201.83	102.34	187.82
	153.85	201.83	104.46	185.48		170.83	200.29	100.27	185.48
20	164.09	225.64	106.62	190.19	20	155.72	208.14	112.79	187.82
	162.11	204.96	104.46	187.82		151.39	201.83	102.34	185.48
21	155.72	208.14	106.62	187.82	21	178.57	213.82	119.32	187.82
	153.85	204.96	102.34	187.82		164.09	201.83	106.62	185.48
22	157.61	206.54	115.12	187.82	22	153.85	208.14	115.12	187.82
	157.61	194.97	106.62	185.48		153.85	201.83	115.12	185.48
23	170.83	208.14	102.34	190.19	23	170.83	201.83	104.46	187.82
	153.85	201.83	102.34	187.82		164.09	201.83	98.24	187.82
24	162.11	201.83	125.09	187.82					
	160.17	200.29	110.5	185.48					
25	162.11	201.83	115.12	185.48					
	157.61	204.96	110.5	185.48					
26	160.17	201.83	102.34	185.48					
	153.85	213.82	102.34	185.48					

27	160.17	213.82	106.62	187.82				
	153.85	197.23	102.34	187.82				
28	162.11	201.83	131.56	187.82				
	153.85	204.96	102.34	185.48				
29	153.85	201.83	106.62	187.82				
	153.85	208.14	102.34	183.94				
30	164.09	201.83	115.12	187.82				
	162.11	215.47	102.34	185.48				
31	170.83	201.83	102.34	208.57				
	170.83	213.82	102.34	185.48				

Cuadro 38  
Composición alélica para la población de Tallado

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	157.61	201.83	104.46	187.82
	153.85	189.07	104.46	185.48
2	166.75	200.29	115.12	187.82
	153.85	189.07	102.34	187.82
3	155.72	206.54	112.79	185.48
	151.39	206.54	104.46	185.48
4	157.61	201.83	102.34	185.48
	153.85	201.83	102.34	185.48
5	174.3	201.83	?	190.19
	155.72	201.83	?	183.94
6	153.85	212.18	115.12	185.48
	153.85	200.29	102.34	183.94
7	155.72	227.86	106.62	185.48
	151.39	206.54	104.46	183.94
8	153.85	206.54	104.46	185.48
	153.85	206.54	104.46	185.48
9	169	?	106.62	185.48
	157.61	?	104.46	185.48
10	172.91	208.14	106.62	187.82
	153.85	206.54	102.34	187.82
11	153.85	209.74	136.74	187.82
	153.85	189.07	98.24	187.82
12	157.61	?	112.79	185.48
	153.85	?	104.46	185.48
13	157.61	204.96	115.12	190.19
	151.39	204.96	104.46	185.48
14	178.57	192.74	106.62	187.82
	153.85	192.74	104.46	183.94
15	157.61	221.66	108.82	185.48
	153.85	201.83	102.34	185.48
16	153.85	201.83	106.62	187.82
	153.85	201.83	104.46	185.48
17	164.09	221.66	112.79	185.48
	153.85	192.74	102.34	185.48
18	155.72	189.07	104.46	187.82
	153.85	189.07	104.46	185.48
19	157.61	206.54	119.32	190.19
	153.85	206.54	106.62	187.82
20	148.97	200.29	117.5	190.19
	142.51	200.29	104.46	185.48
21	157.61	206.54	104.46	190.19
	157.61	206.54	102.34	187.82

22	169	208.14	117.5	190.19
	157.61	201.83	110.5	185.48
23	162.11	204.96	115.12	187.82
	157.61	204.96	104.46	185.48
24	164.09	201.83	112.79	185.48
	155.72	194.97	104.46	185.48
25	162.11	194.97	102.34	187.82
	157.61	194.97	102.34	185.48
26	162.11	201.83	110.5	190.19
	151.39	201.83	104.46	185.48
27	157.61	201.83	104.46	187.82
	153.85	201.83	102.34	185.48
28	164.09	204.96	115.12	185.48
	157.61	204.96	102.34	185.48
29	162.11	204.96	112.79	190.19
	162.11	189.07	102.34	190.19
30	155.72	206.54	106.62	203.34
	153.85	206.54	106.62	185.48
31	153.85	201.83	141.42	185.48
	153.85	189.07	104.46	185.48
32	164.09	206.54	104.46	187.82
	153.85	201.83	104.46	185.48
33	178.57	206.54	108.82	192.59
	169	201.83	104.46	187.82
34	166.75	?	117.5	185.48
	153.85	?	102.34	185.48
35	157.61	204.96	110.5	185.48
	151.39	204.96	104.46	185.48
36	155.72	201.83	110.5	190.19
	155.72	201.83	102.34	185.48
39	166.75	209.74	115.12	187.82
	157.61	209.74	104.46	185.48
40	162.11	204.96	106.62	187.82
	153.85	204.96	102.34	185.48
41	157.61	201.83	108.82	185.48
	157.61	201.83	102.34	185.48
42	162.11	200.29	110.5	190.19
	153.85	200.29	102.34	185.48

## 4. México

Cuadro 39

Composición alélica para las poblaciones de Cosalapa y Nueva Independencia

Cosalapa					Nueva Independencia				
Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41	Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	166.75	204.96	165.55	190.19	1	157.61	201.83	106.62	187.82
	160.17	201.83	112.79	187.82		155.72	201.83	104.46	185.48
2	178.57	201.83	104.46	185.48	2	166.75	192.74	106.62	187.82
	164.09	192.74	106.46	183.94		153.85	189.07	102.34	185.48
3	166.75	206.54	110.5	187.82	3	160.17	212.18	104.46	187.82
	155.72	204.96	104.46	187.82		155.72	201.83	104.46	185.48
4	160.17	204.96	108.82	195.02	4	155.72	208.14	106.62	187.82
	160.17	201.83	100.27	183.94		155.72	204.96	102.34	185.48
5	170.83	206.54	104.46	190.19	5	153.85	208.14	104.46	187.82
	155.72	206.54	104.46	185.48		153.85	206.54	102.34	185.48
6	153.85	206.54	104.46	190.19	6	153.85	204.96	110.5	185.48
	153.85	204.96	98.24	190.19		153.85	204.96	102.34	185.48

7	155.72	206.54	106.62	190.19	7	174.3	208.14	110.5	183.94
	151.39	206.54	104.46	190.19		160.17	206.54	100.27	183.94
8	170.83	213.82	115.12	199.06	8	170.83	227.86	104.46	187.82
	157.61	204.96	104.46	187.82		153.85	201.83	104.46	183.94
9	164.09	197.23	108.82	190.19	9	155.72	208.14	115.12	190.19
	153.85	197.23	102.34	185.48		153.85	204.96	104.46	190.19
10	155.72	209.74	117.5	195.02	10	153.85	206.54	108.82	187.82
	153.85	204.96	110.5	195.02		153.85	204.96	102.34	185.48
11	153.85	204.96	110.5	195.02	11	164.09	209.74	115.12	187.82
	148.97	204.96	104.46	185.48		162.11	208.14	102.34	187.82
12	160.17	204.96	117.5	185.48	12	157.61	208.14	108.82	185.48
	153.85	204.96	102.34	182		153.85	206.54	106.62	185.48
13	155.72	204.96	104.46	187.82	13	160.17	206.54	119.32	187.82
	151.39	197.23	102.34	185.48		157.61	206.54	112.79	183.94
14	162.11	217.13	102.34	190.19	14	169	212.18	104.46	187.82
	153.85	201.83	102.34	185.48		155.72	209.74	104.46	185.48
15	174.3	206.54	106.62	187.82	15	162.11	208.14	108.82	187.82
	153.85	192.74	102.34	185.48		153.85	206.54	104.46	185.48
16	157.61	201.83	102.34	185.48	16	157.61	206.54	106.62	187.82
	153.85	201.83	98.24	187.82		155.72	204.96	106.62	185.48
17	160.17	208.14	106.62	187.82	17	164.09	209.74	100.27	190.19
	153.85	201.83	102.34	185.48		157.61	200.29	98.24	185.48
18	157.61	204.96	141.42	187.82	18	166.75	206.54	119.32	187.82
	153.85	200.29	106.62	185.48		153.85	194.97	104.46	183.94
19	166.75	212.18	115.12	187.82	19	155.72	194.97	108.82	190.19
	153.85	192.74	108.82	187.82		153.85	192.74	92.82	185.48
20	160.17	204.96	106.62	195.02	20	153.85	208.14	108.82	185.48
	153.85	201.83	102.34	187.82		153.85	204.96	106.62	185.48
21	155.72	204.96	106.62	185.48	21	169	204.96	115.12	187.82
	153.85	192.74	102.34	185.48		153.85	194.97	110.5	185.48
22	153.85	204.96	106.62	187.82	22	151.39	227.86	106.62	190.19
	148.97	204.96	106.62	183.94		142.51	209.74	102.34	183.94
23	160.17	206.54	110.5	187.82	23	160.17	206.54	106.62	192.59
	153.85	197.23	104.46	187.82		160.17	200.29	106.62	185.48
24	170.83	204.96	119.32	190.19	24	155.72	200.29	135.49	185.48
	162.11	192.74	102.34	185.48		153.85	200.29	106.62	183.94
25	170.83	201.83	106.62	190.19	25	153.85	201.83	108.82	187.82
	157.61	189.07	102.34	185.48		142.51	192.74	106.62	187.82
26	170.83	209.74	104.46	190.19	26	155.72	217.13	129.57	187.82
	153.85	201.83	104.46	185.48		153.85	206.54	102.34	183.94
27	160.17	212.18	108.82	187.82	27	153.85	204.96	115.12	187.82
	160.17	204.96	98.24	185.48		148.97	204.96	106.62	187.82
28	153.85	209.74	104.46	190.19	28	162.11	201.83	104.46	190.19
	151.39	206.54	102.34	185.48		157.61	192.74	102.34	185.48
29	174.3	206.54	106.62	190.19	29	155.72	206.54	123.67	192.59
	160.17	201.83	100.27	187.82		155.72	204.96	108.82	185.48
30	170.83	225.64	117.5	208.57	30	166.75	212.18	104.46	187.82
	153.85	201.83	112.79	187.82		157.61	204.96	102.34	185.48
31	155.72	212.18	108.82	185.48	31	160.17	212.18	108.82	185.48
	151.39	204.96	104.46	185.48		160.17	206.54	106.62	185.48
32	172.91	204.96	106.62	187.82	32	170.83	209.74	106.62	187.82
	153.85	201.83	102.34	185.48		160.17	206.54	98.24	187.82
33	166.75	204.96	108.82	187.82	33	162.11	212.18	106.62	195.02
	166.75	201.83	106.62	183.94		162.11	189.07	104.46	183.94
34	155.72	201.83	134.91	185.48	34	157.61	208.14	134.91	185.48
	155.72	192.74	102.34	183.94		155.72	208.14	119.32	183.94
35	160.17	213.82	158.1	190.19	35	155.72	204.96	106.62	187.82
	157.61	206.54	102.34	185.48		155.72	194.97	104.46	183.94

36	160.17	206.54	112.79	192.59	36	164.09	206.54	102.34	187.82
	160.17	201.83	102.34	185.48		157.61	200.29	102.34	185.48
37	164.09	217.13	106.62	187.82	37	174.3	217.13	115.12	187.82
	153.85	189.07	102.34	190.19		160.17	201.83	104.46	183.94
38	160.17	204.96	123.67	187.82	38	160.17	209.74	119.32	187.82
	160.17	192.74	110.5	183.94		157.61	209.74	104.46	183.94
39	164.09	201.83	112.79	187.82	39	164.09	200.29	117.5	187.82
	153.85	201.83	102.34	185.48		153.85	192.74	102.34	187.82
40	160.17	212.18	106.62	187.82	40	177.13	225.64	108.82	190.19
	153.85	200.29	102.34	187.82		155.72	200.29	102.34	183.94
41	166.75	201.83	110.5	187.82	41	153.85	206.54	104.46	187.82
	151.39	200.29	106.62	187.82		148.97	194.97	104.46	185.48
42	174.3	189.07	104.46	190.19	42	166.75	204.96	106.62	187.82
	153.85	189.07	102.34	185.48		164.09	204.96	106.62	187.82
43	164.09	201.83	108.82	187.82	43	153.85	208.14	106.62	187.82
	151.39	194.97	104.46	185.48		151.39	194.97	106.62	185.48
44	153.85	217.13	117.5	187.82	44	157.61	201.83	120.88	190.19
	153.85	212.18	102.34	185.48		153.85	192.74	102.34	185.48
45	164.09	212.18	104.46	190.19	45	160.17	206.54	108.82	185.48
	160.17	201.83	102.34	187.82		155.72	206.54	104.46	183.94
46	160.17	206.54	108.82	187.82	46	162.11	223.91	102.34	190.19
	160.17	206.54	102.34	185.48		155.72	209.74	102.34	185.48
47	157.61	204.96	123.67	187.82	47	178.57	209.74	104.46	187.82
	155.72	204.96	104.46	185.48		153.85	189.07	102.34	187.82
48	153.85	200.29	106.62	187.82	48	164.09	206.54	153.35	185.48
	153.85	200.29	104.46	187.82		160.17	204.96	153.35	183.94
49	162.11	221.66	102.34	187.82	49	160.17	204.96	104.46	187.82
	153.85	206.54	102.34	185.48		160.17	204.96	102.34	185.48
50	162.11	206.54	104.46	187.82	50	169	206.54	115.12	187.82
	153.85	200.29	102.34	185.48		153.85	206.54	106.62	185.48

Cuadro 40  
Composición alélica para la población de Zapata

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	160.17	204.96	115.12	190.19
	153.85	204.96	102.34	190.19
2	160.17	212.18	112.79	190.19
	148.97	204.96	104.46	185.48
3	157.61	201.83	119.32	190.19
	151.39	201.83	110.5	185.48
4	160.17	201.83	108.82	192.59
	153.85	192.74	104.46	187.82
5	162.11	223.91	106.62	190.19
	160.17	186.05	102.34	187.82
6	155.72	221.66	108.82	195.02
	151.39	200.29	100.23	187.82
7	162.11	201.83	106.62	187.82
	160.17	194.97	102.34	187.82
8	160.17	201.83	108.82	187.82
	153.85	200.29	100.23	185.48
9	155.72	200.29	104.46	190.19
	153.85	192.74	104.46	187.82
10	160.17	206.54	112.79	190.19
	155.72	204.96	106.62	187.82
11	155.72	212.18	117.5	187.82
	155.72	204.96	104.46	185.48

12	169	204.96	110.5	192.59
	160.17	204.96	110.5	187.82
13	162.11	209.74	106.62	192.59
	153.85	204.96	104.46	187.82
14	166.75	220	106.62	190.19
	157.61	194.97	104.46	187.82
15	157.61	209.74	135.49	187.82
	151.39	201.83	108.82	185.48
16	166.75	209.74	141.42	190.19
	153.85	201.83	108.82	187.82
17	153.85	206.54	108.82	190.19
	153.85	200.29	102.34	190.19
18	170.83	217.13	106.62	187.82
	166.75	208.14	102.34	185.48
19	155.72	209.74	115.12	185.48
	151.39	200.29	102.34	185.48
20	160.17	204.96	108.82	190.19
	153.85	201.83	106.62	190.19
21	153.85	201.83	108.82	187.82
	142.51	201.83	106.62	187.82
22	166.75	208.14	102.34	190.19
	160.17	204.96	102.34	187.82
23	162.11	206.54	104.46	190.19
	157.61	206.54	102.34	187.82
24	157.61	201.83	104.46	190.19
	148.97	200.29	102.34	190.19
25	151.39	208.14	170.72	192.59
	151.39	200.29	108.82	187.82
26	162.11	200.29	108.82	187.82
	160.17	200.29	102.34	187.82
27	166.75	206.54	104.46	187.82
	153.85	200.29	102.34	183.94
28	166.75	206.54	104.46	182
	153.85	192.74	104.46	182
29	160.17	201.83	104.46	182
	157.61	200.29	102.34	182
30	166.75	201.83	108.82	187.82
	155.72	200.29	104.46	187.82
31	157.61	206.54	106.62	190.19
	153.85	194.97	92.82	190.19
32	164.09	204.96	104.46	187.82
	153.85	192.74	104.46	187.82
33	157.61	209.74	135.49	190.19
	157.61	209.74	115.12	187.82
34	172.91	206.54	108.82	190.19
	160.17	200.29	102.34	187.82
35	155.72	204.96	110.5	185.48
	155.72	204.96	102.34	185.48
36	155.72	201.83	106.62	187.82
	145.43	201.83	104.46	185.48
37	155.72	206.54	112.79	187.82
	155.72	201.83	102.34	183.94
38	155.72	204.96	106.62	185.48
	153.85	200.29	102.34	185.48
39	174.3	200.29	104.46	187.82
	162.11	200.29	102.34	185.48
40	160.17	204.96	104.46	187.82
	151.39	200.29	102.34	185.48

41	166.75	200.29	102.34	187.82
	162.11	200.29	102.34	185.48
42	157.61	220	106.62	183.94
	155.72	201.83	102.34	182
43	185.79	204.96	108.82	185.48
	155.72	201.83	102.34	185.48
44	162.11	220	104.46	185.48
	155.72	201.83	98.24	185.48
45	157.61	204.96	104.46	187.82
	157.61	192.74	102.34	187.82
46	164.09	204.96	108.82	187.82
	162.11	201.83	102.34	185.48
47	174.3	204.96	129.57	187.82
	160.17	204.96	104.46	185.48
48	164.09	204.96	106.62	187.82
	160.17	200.29	102.34	185.48
49	160.17	209.74	102.34	185.48
	157.61	200.29	102.34	185.48
50	180.74	204.96	106.62	190.19
	160.17	200.29	102.34	185.48

## 5. Nicaragua

Cuadro 41

Composición alélica para las poblaciones de Corral 1 y Corral 2

Corral 1					Corral 2				
Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41	Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	153.85	215.47	108.82	190.19	1	155.72	192.74	112.79	187.82
	151.39	206.54	102.34	187.82		155.72	192.74	106.62	185.48
2	157.61	223.91	104.46	187.82	2	162.11	201.83	117.5	197.48
	155.72	204.96	102.34	185.48		153.85	192.74	102.34	190.19
3	166.75	225.64	120.88	187.82	3	169	201.83	106.62	187.82
	153.85	201.83	108.82	185.48		155.72	200.29	102.34	185.48
4	160.17	201.83	110.5	185.48	4	153.85	215.47	106.62	187.82
	153.85	192.74	102.34	183.94		153.85	192.74	104.46	185.48
5	160.17	206.54	117.5	187.82	5	172.91	217.13	108.82	185.48
	153.85	201.83	104.46	185.48		172.91	204.96	108.82	185.48
6	172.91	212.18	112.79	187.82	6	153.85	215.47	110.5	185.48
	153.85	200.29	102.34	185.48		151.39	192.74	104.46	185.48
7	151.39	215.47	134.91	187.82	7	169	192.74	110.5	185.48
	151.39	209.74	102.34	185.48		169	192.74	106.62	183.94
8	164.09	201.83	106.62	187.82	8	166.75	209.74	104.46	185.48
	160.17	192.74	102.34	185.48		153.85	200.29	102.34	183.94
9	162.11	215.47	106.62	185.48	9	170.83	200.29	127.14	187.82
	145.43	200.29	102.34	185.48		170.83	200.29	102.34	187.82
10	164.09	220	117.5	187.82	10	151.39	208.14	108.82	185.48
	153.85	212.82	106.62	185.48		151.39	189.07	104.46	185.48
11	166.75	225.64	110.5	187.82	11	153.85	192.74	110.5	187.82
	148.97	192.74	110.5	187.82		153.85	192.74	106.62	185.48
12	155.72	208.14	108.82	190.19	12	164.09	225.64	104.46	190.19
	153.85	201.83	106.62	187.82		155.72	194.97	102.34	185.48
13	162.11	200.29	106.62	187.82	13	160.17	208.14	102.34	187.82
	155.72	200.29	102.34	185.48		155.72	200.29	102.34	183.94
14	162.11	201.83	110.5	187.82	14	160.17	200.29	106.62	187.82
	155.72	201.83	102.34	185.48		160.17	200.29	106.46	187.82
15	170.83	206.54	108.82	187.82	15	166.75	204.96	104.46	187.82
	162.11	206.54	102.34	183.94		151.39	200.29	100.27	185.48

16	170.83	206.54	108.82	187.82	16	177.13	204.96	117.5	185.48
	160.17	200.29	108.82	185.48		151.39	204.96	108.82	185.48
17	169	201.83	104.46	187.82	17	164.09	200.29	106.62	187.82
	169	201.83	102.34	185.48		153.85	200.29	106.62	185.48
18	174.3	206.54	119.32	187.82	18	170.83	206.54	102.34	185.48
	160.17	200.29	104.46	185.48		151.39	192.74	100.27	185.48
19	162.11	212.18	137.08	185.48	19	170.83	208.14	108.82	187.82
	153.85	200.29	106.62	183.94		153.85	200.29	106.62	185.48
20	172.91	201.83	104.46	190.19	20	164.09	?	104.46	185.48
	153.85	192.74	104.46	187.82		164.09	?	104.46	183.94
21	169	200.29	127.14	190.19	21	153.85	204.96	115.12	190.19
	151.39	200.29	102.34	185.48		153.85	204.96	104.46	185.48
22	170.83	212.18	117.5	187.82	22	166.75	201.83	108.82	185.48
	164.09	192.74	106.62	185.48		153.85	200.29	102.34	185.48
23	162.11	206.54	108.82	185.48	23	157.61	208.14	104.46	185.48
	151.39	201.83	102.34	185.48		157.61	192.74	104.46	183.94
24	160.17	201.83	104.46	187.82	24	157.61	204.96	112.79	190.19
	153.85	201.83	102.34	187.82		155.72	192.74	108.82	190.19
25	166.75	201.83	104.46	187.82	25	160.17	204.96	134.91	185.48
	153.85	201.83	104.46	187.82		155.72	200.29	102.34	185.48
26	177.13	204.96	108.82	190.19	26	157.61	204.96	108.82	185.48
	162.11	201.83	104.46	185.48		157.61	204.96	102.34	185.48
27	166.75	204.96	115.12	190.19	27	155.72	200.29	137.08	187.82
	166.75	203.00	102.34	183.94		153.85	192.74	102.34	185.48
28	155.72	201.83	120.88	185.48	28	170.83	221.66	119.32	185.48
	153.85	192.74	115.12	183.94		160.17	200.29	110.5	183.94
29	170.83	215.47	108.82	190.19	29	155.72	204.96	108.82	190.19
	169	209.74	108.82	185.48		153.85	197.23	102.34	187.82
30	166.75	221.66	127.14	187.82	30	164.09	201.83	115.12	185.48
	162.11	206.54	100.27	183.94		146.72	200.29	102.34	185.48
31	170.83	236.26	104.46	190.19	31	157.61	201.83	131.56	185.48
	153.85	200.29	104.46	185.48		153.85	187.95	102.34	185.48
32	160.17	225.64	108.82	190.19	32	164.09	201.83	104.46	190.19
	153.85	197.23	104.46	185.48		153.85	201.83	104.46	185.48
33	157.61	201.83	108.82	185.48	33	153.85	208.14	115.12	187.82
	157.61	192.74	104.46	185.48		151.39	200.29	106.62	187.82
34	153.85	204.96	108.82	187.82	34	160.17	200.29	120.88	190.19
	151.39	200.29	102.34	187.82		155.72	192.74	108.82	187.82
35	153.85	200.29	134.91	190.19	35	153.85	201.83	106.62	187.82
	153.85	192.74	108.82	187.82		151.39	201.83	104.46	185.48
36	155.72	201.83	106.62	187.82	36	160.17	200.29	110.5	187.82
	151.39	192.74	106.62	185.48		148.97	200.29	102.34	187.82
37	177.13	220	104.46	187.82	37	153.85	204.46	104.46	187.82
	157.61	192.74	104.46	185.48		153.85	204.46	104.46	187.82
38	160.17	201.83	102.34	185.48	38	155.72	201.83	106.62	190.19
	148.97	200.29	102.34	185.48		153.85	201.83	100.27	185.48
39	151.39	208.14	106.62	185.48	39	170.83	229.56	112.79	187.82
	151.39	201.83	104.46	183.94		164.09	187.95	112.79	183.94
40	160.17	204.96	108.82	190.19	40	153.85	215.47	104.46	185.48
	157.61	201.83	104.46	187.82		153.85	208.14	104.46	185.48
41	166.75	220	115.12	185.48	41	155.72	213.82	108.82	187.82
	164.09	209.74	102.34	185.48		155.75	208.14	104.46	185.48
42	153.85	200.29	104.46	187.82	42	155.72	201.83	108.82	190.19
	151.39	200.29	104.46	185.48		153.85	200.29	104.46	187.82
43	155.72	204.96	120.88	190.19	43	155.72	200.29	104.46	187.82
	153.85	192.74	115.12	185.48		153.85	200.29	102.34	185.48
44	166.75	212.18	104.46	190.19	44	162.11	201.83	104.46	185.48
	155.72	200.29	104.46	185.48		160.17	200.29	102.34	185.48

45	153.85	204.96	106.62	187.82	45	178.57	212.18	106.62	187.82
	153.85	204.96	106.62	182		153.85	206.54	102.34	187.82
46	155.72	204.96	104.46	190.19	46	153.85	208.14	106.62	185.48
	153.85	200.29	102.34	185.48		151.39	201.83	102.34	185.48
47	153.85	220	106.62	187.82	47	162.11	215.47	115.12	190.19
	151.39	200.29	104.46	185.48		151.39	213.82	104.46	185.48
48	153.85	204.96	102.34	192.59	48	160.17	200.29	104.46	187.82
	153.85	204.96	102.34	187.82		153.85	200.29	104.46	187.82
49	166.75	208.14	106.64	187.82	49	166.75	200.83	106.62	187.82
	151.39	201.83	104.46	185.48		155.72	192.74	104.46	187.82
50	174.3	209.74	106.62	185.48	50	157.61	221.66	134.91	187.82
	169	200.29	106.62	183.94		155.72	204.96	102.34	183.94

Cuadro 42  
Composición alélica para la población de Corral 3

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	170.83	208.14	104.46	192.59
	153.85	204.96	104.46	187.82
2	153.85	209.74	110.5	187.82
	151.39	200.29	102.34	185.48
3	165.71	206.54	106.62	185.48
	155.72	201.83	104.46	185.48
4	172.91	206.54	102.34	187.82
	170.83	201.83	102.34	183.94
5	153.85	213.82	106.62	187.82
	153.85	192.74	102.34	185.48
6	157.61	208.14	108.82	187.82
	151.39	194.97	106.62	185.48
7	162.11	208.14	108.82	185.48
	153.85	204.96	100.27	185.48
8	164.09	215.47	115.12	185.48
	155.72	189.07	104.46	185.48
9	157.61	201.83	110.5	187.82
	157.61	201.83	104.46	185.48
10	153.85	208.14	108.82	185.48
	153.85	200.29	102.34	183.94
11	160.17	206.54	108.82	187.82
	153.85	201.83	106.62	185.48
12	170.83	204.96	125.09	185.48
	153.85	197.23	104.46	185.48
13	166.75	201.83	112.79	203.34
	160.17	200.29	102.34	190.19
14	166.75	208.14	115.12	187.82
	162.11	204.96	104.46	185.48
15	172.91	212.18	108.82	185.48
	153.85	201.83	108.82	185.48
16	160.17	200.29	110.5	192.59
	153.85	200.29	102.34	187.82
17	165.71	200.29	108.82	190.19
	153.85	200.29	104.46	185.48
18	157.61	204.96	108.82	187.82
	153.85	192.74	102.34	183.94
19	162.11	212.18	108.82	185.48
	151.39	192.74	104.46	183.94
20	157.61	212.18	134.91	203.34
	157.61	201.83	115.12	187.82
21	157.61	206.54	106.62	185.48
	153.85	200.29	102.34	183.94
22	157.61	201.83	108.82	187.82
	153.85	200.29	104.46	187.82

23	170.82	204.96	102.34	187.82
	153.85	204.96	102.34	187.82
24	157.61	200.29	106.62	187.82
	153.85	192.74	104.46	185.48
25	162.11	212.18	106.62	187.82
	162.11	201.83	102.34	185.48
26	155.72	212.18	115.12	185.48
	151.39	204.96	104.46	183.94
27	148.97	208.14	110.5	190.19
	148.97	208.14	104.46	185.48
28	155.72	208.14	108.82	185.48
	155.72	204.96	104.46	185.48
29	164.09	200.29	104.46	197.48
	160.17	192.74	102.34	185.48
30	174.3	200.29	119.12	187.82
	151.39	189.07	110.5	187.82
31	157.61	206.54	106.62	187.82
	151.39	200.29	102.34	185.48
32	155.72	225.64	120.88	187.82
	153.85	208.14	98.24	183.94
33	151.39	206.54	110.5	185.48
	151.39	200.29	104.46	185.48
34	157.61	208.14	104.46	187.82
	153.85	192.74	102.34	185.48
35	166.75	223.91	125.09	185.48
	153.85	201.83	106.62	183.94
36	160.17	208.14	102.34	187.82
	153.85	201.83	102.34	185.48
37	160.17	201.83	104.46	187.82
	151.39	200.29	102.34	185.48
38	157.61	200.29	115.12	190.19
	151.39	194.97	110.5	185.48
39	170.83	213.82	104.46	185.48
	162.11	200.29	104.46	185.48
40	174.3	208.14	115.12	187.82
	172.91	201.83	108.82	187.82
41	157.61	206.54	104.46	187.82
	153.85	200.29	100.27	187.82
42	155.72	213.82	106.62	185.48
	151.39	212.18	102.34	185.48
43	160.17	201.83	145.79	183.94
	157.61	201.83	102.34	182
44	160.17	227.86	104.46	190.19
	153.85	200.29	102.34	190.19
45	155.72	208.14	106.62	203.34
	153.85	201.83	104.46	185.48
46	160.17	206.54	104.46	187.82
	153.85	200.29	98.24	185.48
47	155.72	213.82	106.62	185.48
	151.39	200.29	106.62	183.94
48	155.72	227.86	102.34	187.82
	155.72	206.54	102.34	185.48
49	172.91	201.83	108.82	187.82
	151.39	201.83	102.34	185.48
50	157.61	201.83	112.79	190.19
	157.61	201.83	104.46	187.82

### B. Secuencias de los cuatro microsátélites

A continuación se presentan las secuencias para los cuatro microsátélites trabajados. Nótese que la secuencia microsátélite está marcada con *CURSIVA*, y las regiones en las que se hibridizan los iniciadores están SUBRAYADAS.

**1. Secuencia del 1-90**

5'-

GATCTGGGTGCACCCACCCCGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTCTCGGCCATCACCAT  
 GCGCCACCATTTTGGTTTTGGGCAAATGGCAGCTTGGCTCTGGTGTGCTGGCCGAGAT  
 TTATCACAAATCAGCACCATCAACACATCCCGTGCCTGTTCCGGGGCAGCGTCCGGTCCG  
 ATGAGGAATCTTCTTTAATCCGATTCCGAGTCACTCATCCCAAACCCTTCCCGTCCC  
 TTGGACAACACACCGCACGGCAGAAGCATAATTAATTAGCATAAATAATAGCCGAACATA  
 TTAATGCCTTTTGGCGCTCTCTGTCTCTGCCTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT  
 GTGTCTTTGGTCATAAAAGGGTCGGTTACGTGTACTACGTCTGGATGTGCGTATTTGTA  
 GTCCGAAGTGTGACTGCCGATGGCCATTTTCATTGATATTAATGCACCATAATCATCCGGA  
 TAGTGCGCCCTCGTGTACTCGAGGATC-3'

Tamaño de la secuencia amplificada: 120 pb + 40 pb (primers) = 160 pb  
 Secuencia repetitiva: CT (2pb); 14 repeticiones.

**2. Secuencia del 2-14**

5'-

GATCGCCGTTGCCAAGATAAAATGGAAATCGAACCCCTACGCTGGCTCGCTCCTTAGCGCC  
 CGGGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCCGGCGCGGCCCGCGGTGACGGGTGGTGAA  
 GGTTGTTCCGTAAGACGCGCGAACGGCGAACCATTCGGTTCGGTGCAGCGAGTTGGACGG  
 TGTTTTAGGATTATTTGAATTAGATTTGATTTGATTTAATTCGCTCACCCAGCAATTTAGCCC  
 CCCC GCCATGGGCATGCGGGGTTTACGGAGGTCTCAAACCCACCTGGCCCCGGAGCAGCA  
 GCAGCAGCAGCAGCAGGGCGGGGAATGTTTGATTGATTCCAGCGGCAGCGCGATAGAGC  
 GCGCACGCCAGCCCATGGGCCAGGCCACGCAGTGAGCACAACAATGAGCGCATAAGCG  
 CGGTGGCACGCACGGTGGCACCAGACAGATGCTGTGCACAGTACCCAGCCTGCAGCAAC  
 AGCTTCTTGGCTTCACTCGGTTGCCACGAGTGCCTGGAAAAGGCCCCCCCGATCG-3'

Tamaño de la secuencia amplificada: 145 pb + 48 pb (primers) = 193 pb  
 Secuencia repetitiva: TC (2pb); 14 repeticiones.

**3. Secuencia del 2-25**

5'-

CTGCGCTCAGTCTATTCGCTCTTTCCCTTCATTTTTCCCTTCCCTTCCCCTCTTCTTTTCTGT  
 AATCCCCTTTCCCTCCGTTCCGGTTCCACGCTCCATTCTTTTATGTTTCGCTCGCTATCTC  
 TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGATAGGATTCGAAATCGTGTTCAGC  
 ACAGTAAGGGCGTTGGGGGGGAGTGGGAGGTGGGGAGAGATAGAGGGCTGAGGTTCA  
 GTGATGGTTCGGGTGCGGACCTGTGGACTGTCCCGGCGACAAA-3'

Tamaño de la secuencia amplificada: 74pb + 40pb (primers) = 114pb  
 Secuencia repetitiva: TC (2pb); 20 repeticiones

**4. Secuencia del 6-41**

5'-

GATCGCGGGCACCTCCCACCGCCCAGCAAAACGGGAATTAATCAACGGGCATCCATCCTT  
 TCTCTGTGGTGAGCAAGGGTAGAAGGGGTTGAGGAGGAGGTGGAACAGACACACACAGA  
 CACACACACACAGAGCCCGCCCGGAAACACGGGGGCCCCACACCGTTAGGGCAAAC  
 GCACCTGATTCTCAGAGGCAGTTGATGCGCCGTTATGACAAGGCGCAGGTCGGCGATA  
 AC-3'

Tamaño de la secuencia amplificada: 144pb + 40pb (primers) = 184pb  
 Secuencia repetitiva: CA (2pb); 12 repeticiones

**C. Individuos utilizados como estándares internos para los cuatro microsatélites**

**Cuadro 43**  
Individuos utilizados como estándares internos para el 1-90

<b>Número de individuo y lugar de colecta</b>	<b>Alelos que representa</b>	
Tallado	5	155.72
		153.23
	10	153.23
		172.91
	18	153.23
		155.72
	20	142.51
		148.97
	24	155.72
		164.09
Nahuá	26	151.39
		162.11
	33	169
		178.57
	39	157.61
Puente Blanco		166.75
	6	153.85
		160.17
Puente Blanco	15	155.72
		170.83
Puente Blanco	43	155.72
		177.13

**Cuadro 44**  
Individuos utilizados como estándares internos para el 2-14

<b>Número de individuo y lugar de colecta</b>	<b>Alelos que representa</b>	
Lauro 27/3/96	13	189.07
San Luis Petén Buenaventura		236.26
	13	213.82
		213.82
Ruperto 4/10/95	14	209.74
		220.00
	28	208.14
El Motor		225.64
	18	201.83
Puente Blanco		227.86
	9	200.29
		221.66
	15	194.97
		204.96
	25	206.54
		217.13
	30	192.74
	204.96	
Puente Blanco	40	206.54
		212.18
	44	206.54
		215.17
	46	201.83
	223.91	

Cuadro 45  
Individuos utilizados como estándares internos para el 2-25

Número de individuo y lugar de colecta	Alelos que representa	
Cosalapa	1	165.55 112.79
	8	115.12 104.46
	24	119.32 102.34
	27	108.82 98.24
	29	106.62 100.27
	30	117.5 112.79
	34	134.91 102.34
	35	158.1 102.34
	38	123.67 110.5
	San Diego	42

Cuadro 46  
Individuos utilizados como estándares internos para el 6-41

Número de individuo y lugar de colecta	Alelos que representa	
Ruperto 4/10/95	6	185.48 192.59
	17	182.00 185.48
	35	187.82 190.19
	Cuto	15
San Luis Petén	31	185.48 208.57
	El Motor	4
11		183.94 187.82
22		189.40 195.02
35		183.94 211.00
Nahuá		14

D. Datos y resultados utilizados para el análisis de Mantel

Cuadro 47

Matriz de Fst linearizado con la transformación de Slatkin, según  $t/M = Fst / (1 - Fst)$  donde  $M=2N$

	Cuto	Lauro	El Mango	Ruperto	Tallado	Champona	Nahua	SL Petén	SLP Bue	El Motor	Pte Blco	Cosalapa	Nva Ind	Zapata	Sia Lucia	Sn Alfredo	Sn Diego	Corral 3	Corral 2	Corral 1	Bananito	Batán	
Cuto (GN)	0																						
Lauro (GN)	0.0047	0																					
El Mango (GN)	0.01445	0.00699	0																				
Ruperto (GN)	0.03657	0.00576	0.02374	0																			
Tallado (GN)	0.00749	0	0.01575	0.01298	0																		
Champona (GS)	0.05228	0.01602	0.03343	0.02649	0.04818	0																	
Nahua (GS)	0.02627	0.01511	0.02898	0.0295	0.02855	0.02462	0																
SL Petén (GS)	0.05615	0.01772	0.05164	0.01991	0.04207	0.00938	0.04326	0															
SLP Bue (GS)	0.03496	0.00786	0.03442	0.01949	0.03281	0.00719	0.01202	0.00706	0														
El Motor (GE)	0.02061	0.0007	0.02015	0.01148	0.01046	0.0263	0.01481	0.02515	0.01407	0													
Pte Blco (GE)	0.01029	0.01279	0.01809	0.03422	0.02013	0.04834	0.01452	0.0644	0.02389	0.01893	0												
Cosalapa (M)	0.0289	0.00305	0.0118	0.00813	0.01823	0.01216	0.02617	0.02069	0.02171	0.01252	0.0255	0											
Nva Ind (M)	0.02627	0.00715	0.00459	0.01899	0.02022	0.01971	0.01946	0.039	0.02641	0.01205	0.02158	0.00477	0										
Zapata (M)	0.02354	0.00938	0.01323	0.02393	0.03168	0.01351	0.01961	0.02951	0.01794	0.01941	0.02188	0.00511	0.01312	0									
Sia Lucia (ES)	0.00091	0	0.00451	0.01766	0.0033	0.03464	0.01989	0.03634	0.01941	0.00596	0.00545	0.01215	0.01152	0.01429	0								
Sn Alfredo (ES)	0.01201	0.00556	0.01085	0.02608	0.0235	0.02927	0.02271	0.04726	0.02004	0.01657	0.00413	0.01296	0.01077	0.00558	0.00096	0							
Sn Diego (ES)	0.03011	0.00864	0.00635	0.01627	0.02553	0.02154	0.01705	0.03928	0.02257	0.01159	0.02514	0.00546	0.00741	0.00509	0.01084	0.01143	0						
Corral 3 (N)	0.00856	0	0.00776	0.01497	0.00791	0.02191	0.02147	0.02682	0.01079	0.00676	0.01056	0.01185	0.0098	0.01179	0	0.00064	0.01346	0					
Corral 2 (N)	0.0117	0.00058	0.0083	0.01968	0.01723	0.03368	0.02821	0.04189	0.01894	0.01257	0.00726	0.01432	0.01349	0.01454	0.00072	0	0.01043	0	0				
Corral 1 (N)	0.01356	0	0.00709	0.01117	0.0127	0.01791	0.02078	0.02592	0.0125	0.00715	0.01291	0.00527	0.01056	0.00587	0.00053	0	0.00503	0	0	0			
Bananito (CR)	0.03181	0.04191	0.04098	0.07101	0.0468	0.06824	0.06724	0.10732	0.07067	0.0591	0.03671	0.06651	0.068	0.05617	0.02297	0.02376	0.05348	0.03168	0.0277	0.02985	0		
Batán (CR)	0.06846	0.08858	0.06446	0.12443	0.09777	0.14754	0.12042	0.16952	0.1223	0.10054	0.06987	0.11487	0.10378	0.09491	0.05214	0.04988	0.09222	0.06281	0.05855	0.06578	0.01644	0	

Cuadro 48  
Matriz de la distancia en km entre parejas de localidades de las poblaciones estudiadas

	Cuto (GN)	Lauro (GN)	El Mango	Ruperto (GN)	Tallado (GN)	Champona	Nahuá (GS)	SL Petén (GS)	SLP Bue (GS)	El Motor (GE)	Pte Bico
Cuto (GN)	0.00										
Lauro (GN)	73.87	0.00									
El Mango (GN)	24.82	58.25	0.00								
Ruperto (GN)	75.30	3.50	56.42	0.00							
Tallado (GN)	0.64	75.24	24.23	74.75	0.00						
Champona (GS)	357.71	287.83	344.50	289.28	351.75	0.00					
Nahuá (GS)	305.92	231.95	290.36	233.62	302.15	55.35	0.00				
SL Petén (GS)	327.71	264.77	317.31	267.44	324.71	115.50	104.36	0.00			
SLP Bue (GS)	329.70	272.84	324.34	276.87	328.24	118.77	108.30	3.79	0.00		
El Motor (GE)	199.34	123.65	178.43	123.33	190.85	182.14	133.35	209.09	213.38	0.00	
Pte Bico (GE)	231.63	157.02	215.34	158.60	230.50	132.27	77.63	155.55	158.85	58.11	0.00
Cosalapa (M)	103.32	160.42	127.10	161.83	103.66	409.60	357.35	348.13	349.93	277.05	286.53
Nva Ind (M)	101.96	158.90	125.49	160.15	102.29	407.90	355.72	347.22	348.52	275.17	294.69
Zapata (M)	105.86	164.52	129.91	165.87	106.22	414.64	362.04	353.85	355.14	281.45	301.03
Sta Lucía (ES)	253.99	190.35	229.66	188.14	253.42	242.97	205.88	303.00	307.13	107.58	149.74
San Alfredo (ES)	252.91	189.62	229.11	187.82	252.01	243.97	206.05	303.73	308.00	107.44	150.19
San Diego (ES)	245.61	182.45	220.10	180.32	244.90	245.18	205.79	302.51	305.71	103.14	147.41
Corral 3 (N)	574.03	508.55	549.00	507.07	572.23	392.48	403.48	506.14	509.46	400.76	408.39
Corral 2 (N)	575.03	509.55	550.00	508.07	573.23	393.48	404.58	507.14	510.46	401.76	409.39
Corral 1 (N)	580.03	514.55	555.00	513.07	578.23	398.48	409.58	512.14	515.46	406.76	414.39
Bananito (CR)	1034.60	977.42	1010.48	974.73	1035.04	872.71	888.86	989.50	993.53	879.68	893.75
Batán (CR)	985.72	930.48	960.12	926.18	987.40	828.81	841.16	943.04	946.12	832.43	846.29

Cuadro 48a  
Matriz de la distancia en km entre parejas de localidades de las poblaciones estudiadas (continuación)

	Cosalapa (M)	Nva Ind (M)	Zapata (M)	Sta Lucía	Sn Alfredo	Sn Diego	Corral 3 (N)	Corral 2 (N)	Corral 1 (N)	Banquito	Batán (CR)
Cuto (GN)											
Lauro (GN)											
El Matigo (GN)											
Ruperto (GN)											
Tallado (GN)											
Champona (GS)											
Nahuá (GS)											
SL Petén (GS)											
SLP Bue (GS)											
El Motor (GE)											
Pic Bico (GE)											
Cosalapa (M)	0.00										
Nva Ind (M)	5.15	0.00									
Zapata (M)	1.69	6.66	0.00								
Sta Lucía (ES)	350.64	348.84	353.77	0.00							
Sn Alfredo (ES)	348.73	346.45	351.99	1.50	0.00						
Sn Diego (ES)	342.81	339.96	345.54	8.95	7.45	0.00					
Corral 3 (N)	668.87	674.37	665.30	320.22	322.12	329.69	0.00				
Corral 2 (N)	669.87	675.37	666.30	321.22	323.12	330.69	1.00	0.00			
Corral 1 (N)	674.87	680.37	671.30	326.22	328.12	335.69	6.00	5.00	0.00		
Banquito (CR)	1135.60	1139.02	1132.61	786.71	788.68	748.07	484.00	485.00	490.00	0.00	
Batán (CR)	1087.64	1090.79	1084.92	738.16	740.29	796.66	437.16	438.16	443.16	48.69	0.00