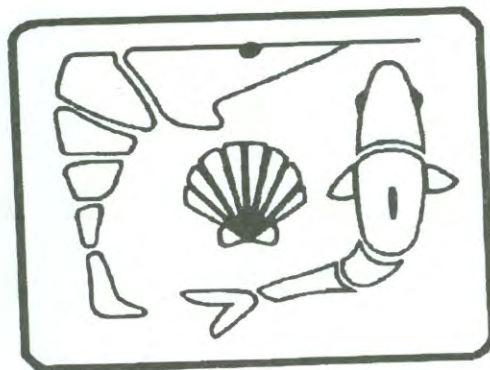




EL SABER DE MIS HIJOS  
HARÁ MI GRANDEZA

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS**

**PROGRAMA REGIONAL DE POSGRADO EN ACUACULTURA**



**VARIABILIDAD GENÉTICA ALOZÍMICA EN POBLACIONES  
SILVESTRES Y EN LÍNEAS CULTIVADAS DE  
CAMARÓN AZUL (*Penaeus stylirostris*).**

**TESIS**



que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**, con especialidad en Cultivo de Crustáceos  
Presenta:

**JOSEFINA RAMOS PAREDES**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

# ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
I.-INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
II.- OBJETIVOS	21
II.1.- Objetivo general	21
II.2.- Objetivos particulares	21
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	22
III.1.- Material biológico	22
III.2.- Obtención del extracto proteico.	22
III.3.- Análisis electroforético.	23
III.3.1.- Preparación de los geles	23
III.3.2.- Aplicación del extracto proteico al gel.	25
III.3.3.- Montaje del gel y aplicación de la corriente eléctrica.	25
III.3.4.- Rebanado del gel.	26
III.3.5.- Revelado de las proteínas.	26
III.4.- Interpretación de los zimogramas.	28
III.5.- Análisis de datos.	29
IV.-RESULTADOS	31
V.-DISCUSIÓN	66
VI.- CONCLUSIÓN	78
VII.- RECOMENDACIONES	81

VIII.- LITERATURA CITADA	82
IX.-APÉNDICES	95
IX.1.-Apéndice 1.- Comparaciones de la utilidad de varios métodos moleculares genéticos para detectar estructura genética poblacional a diferentes niveles de relación. La línea sólida indica el rango óptimo.	95
IX.2.-Apéndice 2.- El Código Genético Universal.	96
IX.3.-Apéndice 3.- Soluciones amortiguadoras para la electroforesis.	97
IX.4.-Apéndice 4.- Mezclas reveladoras de los sistemas proteicos y soluciones varias, necesarias para estas mezclas.	98
IX.5.-Apéndice 5.- Fundamento de las reacciones de revelado.	107



**Biblioteca de Posgrado  
en Ciencias e Ingeniería**

## RESUMEN

Se llevó a cabo un análisis genético poblacional en *Penaeus stylirostris* con el fin de describir la variabilidad genética de dos poblaciones silvestres (Guaymas y Puerto Peñasco, Sonora) y en dos linajes cultivados (A y B), así como para determinar la relación entre las muestras. Se utilizaron 17 sistemas enzimáticos y proteínas generales para visualizar satisfactoriamente 31 loci. En la totalidad de los organismos se detectaron 11 loci polimórficos (35.5%), con una heterocigosis de 0.108 y un promedio de 1.81 alelos por locus. Los rangos obtenidos del número de alelos por locus, heterocigosis observada y esperada fueron de 1.48-1.71, 0.088-0.129 y de 0.138-0.175, respectivamente. En Guaymas, Puerto Peñasco y en el linaje A la heterocigosis observada fue significativamente menor a la esperada. No hubo diferencias significativas de heterocigosis observada y del porcentaje de loci polimórficos entre las cuatro muestras, sin embargo entre ambos linajes la heterocigosis esperada fue significativamente diferente. Las poblaciones silvestres presentaron desequilibrio, según las expectativas de Hardy-Weinberg, en *AKP-1\**, *ACP-1\** y *LAP\**, mientras que en los linajes de cultivo, además de esos loci, *IDH-1\**, *EST-2\** y *EST-3\** presentaron desequilibrio, lo mismo que *GDH\** en el linaje B. La mayoría de los loci polimórficos en las cuatro muestras presentaron deficiencias de heterocigotos, con excepción de *EST-4\** en Guaymas. Por otro lado, *ACP-1\**, *AKP-1\** y *GPI\** en el linaje B y *PGM\** en ambos linajes, mostraron exceso de heterocigotos. Respecto al desequilibrio por ligamiento, en Guaymas se presentó desequilibrio en cinco de sus pares de loci polimórficos, Puerto Peñasco en dos pares, A en siete pares y B en nueve pares. Puerto Peñasco y ambos linajes mostraron desequilibrio en tres modelos de mutación-deriva génica (IAM, SMM y TPM), evidenciando reducciones recientes de su tamaño efectivo poblacional. En general, los linajes cultivados presentaron menor diversidad genética ocasionada principalmente por la pérdida de alelos. Basados en las comparaciones de los valores de *F<sub>st</sub>*, así como en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas, los linajes de cultivos fueron significativamente diferentes de las dos poblaciones silvestres. Estas últimas presentaron una diferenciación genética significativa en donde cinco de sus nueve loci polimórficos contribuyen a esa diferenciación, mientras que en los linajes la diferenciación se basa en solo dos loci. Existen evidencias de que el linaje B fue originado a partir del A y que las discrepancias entre ellos se deben a la deriva génica y a un efecto fundador.

## ABSTRACT

It was carried out a population genetic analysis in *Penaeus stylirostris* with the purpose of describing the genetic variability in two wild populations (Guaymas and Puerto Peñasco, Sonora) and in two cultivated lineages (A and B), as well as to determine the relationship among the samples. Seventeen enzymatic systems and general proteins were used to visualize satisfactorily 31 loci. Eleven polymorphic loci (35.5%) were detected in all the organisms, with a heterozygosity of 0.108 and an average of 1.81 alleles for locus. The obtained ranges of the alleles number for locus, observed and expected heterozygosity were 1.48-1.71, 0.088-0.129, and 0.138-0.175, respectively. In Guaymas, Puerto Peñasco, and lineage A the observed heterozygosity was smaller than the expected heterozygosity. There were not significant differences in observed heterozygosity and percentage of polymorphic loci among the four samples. According to expectations of Hardy-Weinberg, there was no equilibrium in the wild populations in *AKP-1\**, *ACP-1\** and *LAP\**; The same happened for the lineages, besides those loci, *IDH\**, *EST-2\** and *EST-3\** were in disequilibrium, as well as *GDH\** in the lineage B. Most of the polymorphic loci in the four samples presented heterozygote deficiency, with exception of *EST-4\** in Guaymas. On the other hand, *ACP-1\**, *AKP-1\** and *GPI\** in lineage B, and *PGM\** in both lineages, showed a heterozygote excess. Guaymas presented linkage disequilibrium in five pairs of polymorphic loci, Puerto Peñasco in two pairs, strain A in seven pairs, and strain B in nine pairs. Puerto Peñasco and both lineages showed disequilibrium in three models of mutation-genetic drift (IAM, SMM and TPM), evidencing recent reductions of their populational effective size. In general, the cultivated lineages presented smaller genetic diversity caused mainly by allele loss. Based on the comparisons of the values of *F<sub>st</sub>*, as well as the distribution of the allelic and genotypic frequencies, the lineages were significantly different from the two wild populations. These wild populations presented a significant genetic differentiation where five of their nine polymorphic loci contribute to that differentiation, while in the lineages the differentiation is based on two loci. There is evidence that the lineage B was originated from the A and the discrepancies among them are due to the genetic drift and an founder effect.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página	
1	Distribución de las frecuencias alélicas de 31 loci proteicos, revelados en dos localidades silvestres y en dos linajes de cultivo de camarón azul ( <i>P. stylirostris</i> ).	55
2	Dendrograma (algoritmo UPGMA) generado de una matriz de Similitudes genéticas sin sesgo de Nei (1978) entre las localidades de camarón azul ( <i>P. stylirostris</i> ) analizadas en este estudio.	60



**Biblioteca de Posgrado  
en Ciencias e Ingeniería**

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Sistemas proteicos, número asignado por la Comisión de Enzimas <sup>+</sup> (No. E.C.), loci revelados y tejidos, utilizados en el estudio de variabilidad genética a nivel de alozimas realizado en poblaciones silvestres y linajes cultivados de camarón azul ( <i>P. stylirostris</i> ).	24
II	Amortiguadores, condiciones electroforéticas y tinciones de revelado, para cada sistema proteico utilizado en el análisis de la variabilidad genética a nivel de alozimas en poblaciones silvestres y linajes cultivados de camarón azul ( <i>P. stylirostris</i> ). El amperaje se mantiene constante, mientras que los valores de voltaje representan las condiciones iniciales y finales.	27
III	Variabilidad genética determinada por medio de las frecuencias alélicas de 31 loci proteicos de camarón azul ( <i>P. stylirostris</i> ) en dos localidades silvestres, en dos linajes de cultivo y en el total de organismos analizados.	32
IV	Valores de significancia obtenidos para las pruebas <i>t</i> de las heterocigosis esperadas (arriba) o heterocigosis observadas (abajo) entre localidades, y entre ambas heterocigosis en cada localidad (diagonal) de camarón azul ( <i>P. stylirostris</i> ) analizadas en este estudio.	33
V	Frecuencias alélicas, heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada sin sesgo ( $H_e$ ) según el equilibrio de Hardy-Weinberg, número de organismos analizados (N) por locus polimórfico y el número de alelos "privados" y "ausentes" en camarón azul ( <i>P. stylirostris</i> ).	34
VI	Prueba de Bondad de Ajuste de Ji cuadrada ( $\chi^2$ ), para probar el equilibrio genético de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg en cada locus analizado del camarón azul ( <i>P. stylirostris</i> ), en la localidad de Guaymas, Sonora.	39
VII	Prueba de Bondad de Ajuste de Ji cuadrada ( $\chi^2$ ), para probar el equilibrio genético de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg en cada locus analizado del camarón azul ( <i>P. stylirostris</i> ), en la localidad de Puerto Peñasco, Sonora.	42



- XVI Coeficiente de endogamia para los loci polimórficos del camarón azul (*P. stylirostris*), en las localidades silvestres, los linajes de cultivo y en todas ellas, analizados mediante la prueba Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) para la hipótesis nula  $F_{is}=0$ . 61
- XVII Coeficiente de diferenciación genética para los loci polimórficos del camarón azul (*P. stylirostris*), en las localidades silvestres, los linajes de cultivo y en todas ellas, analizados mediante la prueba Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) para la hipótesis nula  $F_{st}=0$ . 62
- XVIII Coeficiente de endogamia para los loci polimórficos del camarón azul (*P. stylirostris*), entre localidades silvestre y linajes cultivados, analizados mediante la prueba Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) para la hipótesis nula  $F_{is}=0$ . 63
- XIX Coeficiente de diferenciación genética para los loci polimórficos del camarón azul (*P. stylirostris*), entre localidades silvestre y linajes cultivados, analizados mediante la prueba Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) para la hipótesis nula  $F_{st}=0$ . 64
- XX Estadística F promedio y flujo de migrantes por generación ( $N_eM$ ), entre cada par y entre el total de las localidades en estudio del camarón azul (*P. stylirostris*). 65



## I.--INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los camarones peneidos son muy importantes para la acuicultura a nivel mundial, aunque cerca de 2,500 especies de camarones han sido identificadas, solamente una docena de especies son cultivadas en mayor o menor grado. Pérez-Farfante y Kensley (1997) propusieron que los subgéneros de *Penaeus* fueran elevados a nivel género, de tal manera que *Penaeus stylirostris* pasara a *Litopenaeus stylirostris*. Sin embargo, dado que esta propuesta todavía no ha sido ampliamente adoptada, en este trabajo se hará referencia al género como *Penaeus*. Entre 1992 y 1995 *Penaeus monodon* y *P. vannamei* contribuyeron con el 63-76% de la producción global de camarones cultivados. En estos mismos años en Latinoamérica y la región del Caribe, *P. vannamei* contribuyó con más del 90% de la producción de las granjas (Jory, 1995). En esa década en Latinoamérica, a pesar del conocimiento de su alta susceptibilidad al virus IHNV (Unzueta-Bustamante *et al.* 1998), el camarón azul, *P. stylirostris*, fue utilizado para tratar de reemplazar a *P. vannamei* en los sistemas de cultivo, debido a que el camarón azul generalmente no es afectado por el virus del Síndrome del Taura como lo es el camarón blanco (Jory, 1995). Sin embargo, a pesar de que en 1999 fue el año de máxima producción de camarón azul cultivado, el camarón blanco fue introducido de nuevo a los sistemas acuaculturales en ese año. Actualmente en el noroeste de México *P. vannamei* ha vuelto a ser el elegido por los productores, dando lugar a una serie de ciclos en la preferencia de cultivo de estas dos especies, incrementándose la preferencia por el blanco (Juárez-Romero, com. pers.<sup>1</sup>).

Un ejemplo de lo anterior es la Unión de Ejidos Acuícolas del Sur de Sonora, quienes hasta 1999 utilizaron al camarón azul como única especie cultivada. En el año 2000 aumentaron su superficie de operación en un 29.4%, sin embargo la producción generada se redujo en un 32.5% con respecto al año anterior. De las 1722 toneladas de camarón que cosecharon, el 65% correspondió a camarón azul y el 35% a camarón blanco. Para el 2001, solo *P. vannamei* fue utilizado en sus estanques de engorda (Juárez-Romero, com. pers.<sup>1</sup>).

---

1. Juárez-Romero, L. 2001. Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.

El cultivo de camarón en México data de la década de los setentas; producto del esfuerzo conjunto de la Universidad de Arizona y la Universidad de Sonora, en las instalaciones que hoy se conocen como la Unidad Experimental Peñasco (UEP) de la Universidad de Sonora (Martínez-Córdova *et al.* 1993). En 1980 se obtenían en la UEP, en un proyecto piloto de cultivo hiperintensivo de camarón azul en ambiente controlado, producciones de 5 kg/m<sup>2</sup> o 100,000 lb/acre de camarón con 2.5 cosechas al año (Dugger, 1990). La aparición del virus IHNV a principios de los noventa provocó la eliminación del linaje cautivo de camarón azul que se mantenía en la UEP desde hacía casi 20 generaciones. No se tiene registro del manejo en la selección de los progenitores en cada generación de ese linaje aunque se realizaba un enriquecimiento periódico del pool genético cautivo con reproductores silvestres de la región, sin embargo no se llevó a cabo un seguimiento de su comportamiento genético, (Aguirre-Hinojosa, com. pers.<sup>2</sup>).

En el noroeste de México, la actividad acuícola se concentra mayormente en los estados de Sonora y Sinaloa. La fuente principal de camarón en ambos estados proviene de linajes cautivos, aunque en Sinaloa aun se practica la extracción de postlarvas y juveniles silvestres de camarón blanco para engorda (Aragón-Noriega, 2000). Estos dos estados contribuyen con el 89% de la producción nacional de camarón cultivado. En 1999 la producción en ambos fue mayor de 12,000 toneladas. Sonora obtuvo una producción de 2.03 t/ha y Sinaloa de 0.73 t/ha (Aragón-Noriega, 2000). Aragón-Noriega (2000) señala que esta diferencia se debe principalmente al grado de tecnificación de la camaronicultura sonorensis, que se ha logrado gracias a los avances realizados por las instituciones de investigación y educación superior del estado.

Con el fin de no disminuir las abundancias de las especies silvestres, sobre todo en etapas larvarias, como menciona Jory (1995) que sucedió a mediados de los 80's en Ecuador y en 1994 en la India, se ha hecho de primordial importancia llevar a cabo la domesticación de las especies de peneidos como se ha realizado con especies de plantas y animales. La utilización de postlarvas producidas de esta manera es la única alternativa para responder completamente a las demandas de las granjas de engorda y ejercer mayor control sobre la

---

<sup>2</sup> Aguirre-Hinojosa, E. 1999. Universidad de Sonora. D.I.C.T.U.S. Unidad Experimental Peñasco. Puerto Peñasco, Sonora, México.

producción. Esto permite pronosticar el potencial de rendimiento, facilita las propuestas de mejoramiento genético y evita el deterioro del ambiente por utilizar postlarvas de origen silvestre (Garza-Aguirre y Aguirre-Hinojosa, 1999).

Se han creado sistemas de producción de nauplios obtenidos de progenitores silvestres cuya reproducción se induce en cautiverio, además se han constituido de manera comercial sistemas que utilizan reproductores producidos en cautiverio, llegando en ocasiones a constituir ciclos cerrados o semi-cerrados por muchas generaciones (Garza-Aguirre y Aguirre-Hinojosa, 1999), dando origen a los linajes de cultivo o también llamadas linajes o cepas “mejoradas” genéticamente. Aquacop (1979) fueron de los primeros en documentar ciclos cerrados exitosos para *P. stylirostris*, *P. vannamei* y *P. monodon* en el Centro Oceanológico del Pacífico. Por su parte, Ottogalli *et al.* (1988) reportaron el buen desempeño general durante diez generaciones de una cepa de origen mexicana de *P. stylirostris* en Nueva Caledonia. Más recientemente, se han cerrado los ciclos de vida de varias especies buscando la forma de establecer programas de mejoramiento genético selectivo, cuyos objetivos incluyen el mejoramiento en crecimiento y sobrevivencia, y en particular el mejoramiento de la resistencia a condiciones de cultivo variables y a patógenos específicos (Moore *et al.* 1999; Tang *et al.* 2000). Un linaje cultivado de ese tipo, así como prácticas de manejo adecuadas dan dos ventajas al productor: alcanzar tallas comerciales en menor tiempo y utilizar menos insumos que juntos llevan a reducir los costos de producción. Sin un programa de selección genética e investigación a fondo sobre las prácticas de producción, la industria de la acuicultura no podrá ser sostenible en un futuro cercano (Pérez<sup>3</sup>, 2000).

Los programas de mejoramiento selectivo deben empezar con camarones que representen un amplio rango de variación para tener más genes presentes para seleccionar (Argue y Alcívar-Warren, (1999), ya que si hay diferencias genéticas entre las poblaciones, éstas pueden ser utilizadas como fuente de variación de un programa de selección o como punto de partida en la producción de una cepa de cultivo (Newkirk y Haley, 1977). Es recomendable llevar a cabo inicialmente una domesticación para que actúe la selección natural

---

3. Pérez, F. CENAIM. 2000. Ecuador. <http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/boletin42/proyectos/prov1.html>

a favor de los genotipos mejor adaptados a las nuevas condiciones ambientales, con el fin de incrementar la producción o desempeño poblacional antes de que se realice una selección artificial para la producción de caracteres de interés comercial (Doyle y Hunte, 1981). La diversidad genética de la población silvestre fuente de los reproductores parentales, es de importancia para evitar los efectos fundadores (Lester y Pante, 1992) y la consecuente pérdida progresiva de alelos provocando reducción de la diversidad genética y cambios en las frecuencias alélicas (Benzie *et al.* 1992). Fetzner *et al.* (1997) señalan que los reproductores fundadores de una cepa comercial deberán ser seleccionados de poblaciones residentes de las mismas áreas donde se este llevando a cabo la producción acuícola, sobretodo cuando la población cercana a esta zona se encuentre genéticamente estructurada. Esta selección local evita muchas de las consideraciones y precauciones que se deben tomar en cuenta si poblaciones o especies exóticas son usadas para el cultivo. Quizás la consideración más importante sea la probabilidad de escapes de la cepa exótica cultivada de los estanques acuaculturales hacia ambientes acuáticos locales (Fetzner *et al.* 1997).

Hay mucho debate sobre el efecto de los escapes de organismos de peces cultivados sobre las poblaciones silvestres (Ferguson, 1994; Einum y Fleming, 1997). Las diferencias en el crecimiento y comportamiento, que probablemente estén muy ligados a la adaptabilidad, de los organismos cultivados que se reintegran al medio silvestre, amenazan las poblaciones nativas a través de la competencia y desorganización de adaptaciones locales (Einum y Fleming, 1997). Los linajes cautivos pueden diferir sustancialmente en las frecuencias génicas con respecto a stock silvestres, incluso si los reproductores son obtenidos localmente (Einum y Fleming, 1997), por lo que además del peligro de competencia ecológica debido a la liberación de organismos cultivados hay también potenciales efectos genéticos dañinos: el incremento de la frecuencia de los genes cultivados “no adaptativos”, el rompimiento de los sistemas naturales de poblaciones semi-aisladas y la hibridación intra e interespecífica (Allendorf *et al.* 1987). Con respecto a especies de camarones peneidos no se han reportado evidencias del efecto de sus escapes hacia el medio silvestre, no obstante se ha sugerido que la transferencia de un gran número de reproductores del Mar Andaman a granjas del Golfo de Tailandia ha tenido como resultado cambios en la estructura genética de las poblaciones silvestres de *P. monodon* en el Golfo de Tailandia (Benzie 1998; Benzie, 2000).

En especies acuícolas el potencial de mejoramiento genético es mucho mayor que en otras especies, debido a la alta fecundidad, tiempos de generación cortos y la amplia variación genética de las poblaciones silvestres (Browdy, 1998; Pérez<sup>3</sup>, 2000). Sin embargo, un proceso de domesticación inadecuado llevado a cabo durante varias generaciones, en donde no exista un manejo óptimo de reproductores, puede producir un deterioro de la variabilidad genética de la población mantenida en cautiverio (Ibarra-Humphries, 1998; Sbordoni *et al.* 1986, 1987). Este deterioro genético puede ocurrir principalmente por dos causas: la primera es la deriva génica, que es la pérdida de información genética durante el proceso reproductivo debido al muestreo al azar de gametos de una generación a otra (Gall, 1987; Allendorf, 1983). Este proceso se puede acelerar al utilizar números reducidos de reproductores para producir la siguiente generación, así como por retener números desiguales de progenie de cada uno de los reproductores utilizados (Gall, 1987; Santos, 1987; Sbordoni *et al.* 1987). La segunda causa del deterioro genético se debe a la endogamia resultante por el apareamiento entre reproductores relacionados entre sí, cuando no se cuenta con una población estructurada con registros de parentesco (Santos, 1987; Sbordoni *et al.* 1987). La endogamia tiene como resultado un incremento de homocigotos y decremento en heterocigotos. El nivel de endogamia se mide comúnmente mediante el coeficiente de endogamia ( $F$ ), que es la probabilidad de que dos alelos en un locus dado, sean copias idénticas de un alelo ancestral simple (Weir, 1990). Cuando  $F=1$  todos los genotipos serán homocigotos y ambos alelos provendrán del mismo antecesor, si  $F=0$ , ninguno de los alelos presentes provendrá de un antecesor común (Klug y Cummings, 1999). Cuando una pequeña muestra de una población silvestre es mantenida en cautiverio se pierde variabilidad genética, misma que seguirá perdiéndose en cada generación a una tasa que dependerá únicamente del número efectivo de reproductores cruzados (Hedgecock, 1977).

Mantener una población cautiva presenta problemas genéticos adicionales como es la necesidad de mantener un tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ) suficientemente grande para minimizar los efectos de la deriva genética (Allendorf *et al.* 1987). Cuando las poblaciones se establecen con un pequeño número de progenitores, una reducción de la heterocigosis promedio es indicativo de un “efecto fundador”, los “cuellos de botella” o drásticas reducciones poblacionales pueden también disminuir drásticamente la heterocigosis en

poblaciones fluctuantes, debido a que el tamaño efectivo poblacional a largo plazo es aproximadamente la media armónica del tamaño poblacional en cada generación (Baker, 2000a). La detección de los “cuellos de botella” genéticos y el monitoreo de los tamaños efectivos poblacionales en pequeñas poblaciones es uno de los principales temas de la genética de conservación, ya que los “cuellos de botella” genéticos pueden reducir el potencial adaptativo e incrementar el riesgo de extinción por incremento de la estocasticidad demográfica, reducción de la variación genética, fijación de alelos deletéreos y causar depresión endogámica (Luikart *et al.* 1999).

Se podría esperar una reducción en la cantidad de variación genética de los linajes cultivados debido al “efecto fundador” o al de “cuello de botella”, como resultado de la domesticación y la selección. Sin embargo, el análisis general de los datos de alozimas no sugieren ningún patrón general de pérdida de variación en poblaciones cultivadas si se toma en cuenta la heterocigosis, polimorfismo e incluso el número promedio de alelos por locus (Benzie, 2000), aunque en comparaciones intraespecíficas particulares si lo hicieron (Sbordoni *et al.* 1986, 1987). En camarones peneidos, solo se ha reportado pérdida de variabilidad genética a causa de “cuellos de botella” genéticos en un linaje cautivo de *P. japonicus* en Italia, en el que se registró un declive en la heterocigosis observada de 0.102 en la generación F1, a través de 0.069 y 0.033 en las cuarta y quinta generaciones respectivamente, hasta 0.018 para la generación F7. Esta reducción de la variación genética fue paralela con una fuerte disminución en la tasa promedio de eclosión de 50% a 10 %, como resultado de la endogamia (Sbordoni *et al.* 1986, 1987).

El modelo fundamental de la genética de poblaciones es el equilibrio de Hardy Weinberg. Las proporciones propuestas por el equilibrio de Hardy-Weinberg, para una población cruzada al azar de una especie diploide para un locus autosomal es  $(p+q)^2$ , lo que equivale a  $p^2$  para  $A_1A_1$ ,  $2pq$  para  $A_1A_2$  y  $q^2$  para  $A_2A_2$ ; y al menos que haya un disturbio, las frecuencias genotípicas permanecerán constantes de una generación a la siguiente. En una población endogámica se ve afectado el equilibrio de Hardy-Weinberg de los tres genotipos posibles en un locus de dos alelos, aumentando la homocigosis en forma proporcional al coeficiente de endogamia (F). La importancia económica de los defectos provocados por la endogamia de las poblaciones es poca, mucho más importante es la depresión endogámica, es decir, la reducción de la media poblacional que muestran los caracteres relacionados con la

capacidad reproductiva o la eficacia biológica como la fertilidad y sobrevivencia, provocada por la reducción de homocigotos dominantes e incremento de recesivos (Toro, 1987; Pusey y Wolf, 1996), induciendo el desenmascaramiento de alelos deletereos y la pérdida de heterosis. La depresión endogámica puede ser expresada más fuertemente en las etapas de vida tempranas, sin embargo también produce consecuencias para los adultos como deformidades en el esperma, esterilización y frecuencia de cortejo disminuida (Pusey y Wolf, 1996).

La endogamia no siempre es perjudicial ya que es utilizada en programas de mejora de organismos domesticados. Cuando se inicia un programa de mejoramiento se aumenta la homocigosis y en algunos grupos se fijan alelos favorables y en otros alelos desfavorables. Seleccionando los organismos más viables y vigorosos se puede incrementar la proporción de organismos que llevan caracteres deseables. Si se cruzan los miembros de dos linajes endogámicos, la progenie híbrida es a menudo más vigorosa en los caracteres deseables que cualquiera de las líneas paternas. A este fenómeno se le denomina vigor híbrido, este vigor híbrido abarca solo la primera generación y puede ser explicado por dos hipótesis; la de dominancia y la de sobredominancia (Zouros, 1987; Zouros y Foltz, 1987).

Se ha reconocido que existen problemas en la calidad de las larvas y en la obtención de reproductores criados en estanques, aun en especies a las que se les considera fácil de cultivar, tal como *Penaeus japonicus* y *P. vannamei* (Benzie, 1998). Una solución para mantener una producción a largo plazo, que minimice dichos problemas, es el desarrollo de líneas domesticadas resistentes, mediante el mejoramiento genético, el cual requiere en forma indispensable del manejo en ciclos cerrados (Benzie, 1998). Llevar a cabo la domesticación no significa necesariamente realizar mejora genética, sin embargo es una de las piezas clave para iniciar el proceso de selección y mejoramiento genético. El mejoramiento genético, como su nombre lo indica, se refiere al proceso a través del cual se logra una mejora genética para alguna característica deseada en una población o grupo de individuos. Esta mejora se refleja en la superioridad de la progenie producida por reproductores seleccionados bajo condiciones de cautiverio (Ibarra-Humphries, 1998). Los programas de mejoramiento genético se llevan a cabo con metodologías derivadas de la teoría de la genética cuantitativa y poblacional, mismas que tienen aplicación directa e inmediata en el cultivo de organismos acuáticos (Alvarez, 1987a).



Los mejores esfuerzos documentados para establecer un programa de crianza selectiva de camarón en cautiverio, ha sido realizado por los miembros de instituciones de el U.S. Marine Shrimp Farming Program (USMSFP), incluyendo el Instituto Oceánico, Universidad de Arizona, Waddell Mariculture Center, la Universidad de Texas A & M, Gulf Coast Research Laboratory y la Universidad de Tufts (Wyban *et al.* 1993; Gjedrem y Fimland, 1995; Pruder *et al.* 1995).

El Programa de mejoramiento genético selectivo del USMSFP en el Instituto Oceánico, ha implementado una estrategia de selección individual y de familias (Gjedrem y Fimland, 1995). La selección basada en el desempeño individual es probablemente la forma más comprensible de crianza selectiva, básicamente se seleccionan los mejores organismos y se utilizan como progenitores de la siguiente generación (Newkirk y Haley, 1977; Gjedrem y Fimland, 1995; Browdy, 1998). Esto se hace con el fin de coleccionar en una cepa, todos los genes que contribuyeron al mejor desempeño del progenitor (Newkirk y Haley, 1977). La selección por familias es de particular interés para las especies de peneidos debido al gran número de grupos hermanos y medios hermanos que pueden ser producidos fácilmente. El marcado de familias de hermanos hace posible guardar registro de pedigrí por muchas generaciones, lo que hace posible evitar la cruce de organismos relacionados. Generalmente una combinación de selección individual y de familias resulta más eficiente que usar solo un método de selección (Gjedrem y Fimland, 1995)

Un esquema de selección de menor tecnología es la selección truncada o selección masal, en la cual a partir de un estanque comercial se selecciona un porcentaje de individuos con los caracteres físicos más deseables, como por ejemplo mayor peso. Estos animales son llevados hasta reproductores que servirán para la producción de una segunda generación que será llevada a estanque y al llegar a talla comercial, se vuelve a seleccionar iniciando un segundo ciclo. Sin embargo con este esquema los resultados no son muy alentadores debido a dos factores: baja heredabilidad de los caracteres seleccionados y manejo inadecuado de los organismos (Pérez<sup>3</sup>, 2000). El esquema de alta tecnología comprende los tres niveles de selección: selección masal, selección de familias y selección individual dentro de esas familias, incluyendo la producción de híbridos, mediante el entrecruzamiento de individuos de linajes genéticamente diferentes para producir un genotipo el cual es superior a cualquiera del de sus padres (Newkirk y Haley, 1977). Este proceso requiere de aproximadamente dos años

por ciclo frente a un año del esquema anterior. Así mismo, la infraestructura para manejo es mucho más compleja y el nivel de preparación de los técnicos es necesariamente superior. Sin embargo, se puede seleccionar material con caracteres deseables múltiples como la resistencia a enfermedades, peso y sobrevivencia. En el peor de los casos, un ciclo de selección utilizando este sistema en camarón permitiría entregar material con una ganancia en peso de entre el 5-10%, contra 1-2% de la selección masal (Pérez<sup>3</sup>, 2000).

El conocimiento de la cantidad y de la distribución de la variabilidad genética, dentro de la especie es de gran importancia para llevar a cabo un aprovechamiento racional de los recursos biológicos (Alvarez, 1987a). Las estimaciones de la variabilidad genética de las poblaciones están basadas en evaluaciones de la heterogeneidad de los productos de los genes estructurales (Allendorf y Ferguson, 1990). Las medidas más utilizadas para resumir la cantidad de variación genética en una población son el polimorfismo (P) y la heterocigosis (H). El polimorfismo es la proporción de loci que son encontrados polimórficos en la muestra; usualmente un locus es considerado polimórfico cuando la frecuencia de los alelos no es mayor de un cierto valor, tal como 0.99 ó 0.95. La heterocigosis estima la frecuencia promedio de loci heterocigotos por individuo o lo que es equivalente, la frecuencia promedio de individuos heterocigotos por locus (Ayala, 1984). De las dos medidas, la heterocigosis es la más utilizada por ser la más precisa, ya que no depende del tamaño de población (Ayala, 1984). Los efectos del incremento o decremento de la variación genética puede ser más drástica en poblaciones de especies con menor variabilidad genética. En poblaciones silvestres, una vez que la variabilidad genética se pierde puede ser recuperada únicamente por lentos procesos de mutación, lo cual tarda muchas generaciones (Ayala, 1984; Allendorf y Leary, 1986). De aquí la importancia de no perder de vista estos aspectos para las especies sujetas a cultivo como es el caso de aquellas que tienen importancia para México; como ejemplo particular las especie de peneidos.

La evaluación de los recursos genéticos es considerada el punto de partida para el manejo de poblaciones tanto en pesquerías como en la acuicultura (Rosa Vélez, *et al.* 1999). El monitoreo de la diversidad genética en un programa selectivo es esencial para la producción de líneas cultivadas o mejoradas y para mostrar cómo esas poblaciones domesticadas

representan la variación natural de las especies (Lester, 1983; García, *et al.* 1994). Además, proporciona información de la estabilidad genética de las líneas obtenidas mediante cruza particulares, o de poblaciones silvestres con o sin la influencia de organismos cultivados. Esta información puede servir para determinar el éxito reproductivo de organismos de cultivo en el medio silvestre, así como para el estudio del comportamiento de organismos híbridos resultantes de mezclas de progenitores silvestres-cultivados (Allendorf, *et al.* 1987; Einum y Fleming, 1997).

También los datos de diversidad genética pueden proporcionar información de alelos raros (frecuencias menores a 0.05), alelos perdidos, “cuellos de botella” genéticos, heterocigosidad decreciente e incremento de endogamia en las poblaciones domesticadas (Sbordoni *et al.* 1986, 1987; Harris *et al.* 1990; Sunden y Davis, 1991; Hedgecock y Sly, 1990; Saavedra y Guerra 1996; English *et al.* 2000). La importancia de la variabilidad genética radica en que constituye el material de partida sobre el que actúan los agentes que producen los cambios de la estructura génica de las poblaciones. Los procesos evolutivos se producen por la acción de una serie de fuerzas que son, básicamente: la mutación (Alvarez, 1987a), la migración, la deriva génica y especialmente la selección natural (Alvarez, 1987a; Allendorf, 1983).

Existe una gran reserva genética en el conjunto de los genes y se producen nuevas combinaciones genéticas mediante las transmisiones y recombinaciones mendelianas, pero estos procesos no dan lugar a nuevos alelos. Únicamente la mutación origina nuevos alelos (Ayala, 1984), pero en ausencia de otras fuerzas, la mutación tiene un efecto despreciable sobre las frecuencias alélicas (Klug y Cummings, 1999). Si las mutaciones modifican la adaptación de los organismos, ellas incrementarán o disminuirán sus frecuencias alélicas como resultado de la selección natural (Ayala, 1984). Las diferencias en las tasas mutacionales y en las presiones selectivas pueden establecer frecuencias alélicas heterogéneas en las subpoblaciones; si no afectan la adaptación, sus frecuencias derivarán como consecuencia de la deriva génica aleatoria, de generación en generación (Ayala, 1984).

La migración es el intercambio de organismos exitosamente reproductivos entre las subpoblaciones (Allendorf, 1983). La modificación de las frecuencias alélicas atribuibles a la migración es proporcional a las discrepancias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones donante y receptiva. La migración es una importante fuerza en la formación de la estructura

social, evolutiva y genética de las poblaciones (Rannala y Mountain, 1997). La mutación y la migración incorporan nuevos alelos en las poblaciones mientras que la selección natural es la fuerza principal que modifica las frecuencias alélicas en poblaciones grandes y es uno de los componentes más importantes del cambio evolutivo. La selección natural y el aislamiento reproductivo son los mecanismos que conducen a la divergencia y finalmente a la separación de poblaciones en especies diferentes (Klug y Cummings, 1999).

La selección natural y la artificial actúan sobre las poblaciones cautivas (Calaprice, 1976; Shultz, 1986). En las primeras etapas del proceso de domesticación, es inevitable que las nuevas condiciones de vida generen una serie de factores estresantes para los organismos, que tienen como consecuencia cambios genéticos en las poblaciones (Doyle y Hunte, 1981; Belyaev, 1983; Rodríguez-Romero y Gasca-Montes de Oca, 1999). La selección natural actúa sobre la variabilidad genética de las poblaciones promoviendo su adaptación al ambiente y es fruto de la eficacia reproductiva diferencial de los distintos genotipos como consecuencia de su diferente grado de adaptabilidad al ambiente (Calaprice, 1976; Allendorf, 1983; Belyaev, 1983), haciendo inevitable que los genotipos más adaptables a las condiciones de cultivo incrementen su frecuencia (Allendorf, *et al.* 1987). El hombre, mediante la selección artificial, actúa también sobre la variabilidad genética de las poblaciones, seleccionando aquellos fenotipos que determinan alguna característica deseable desde el punto de vista económico o comercial (Alvarez, 1987a).

Los caracteres que pueden ser mejorados lo definen los aspectos económicos por las características deseadas que imprimen un valor agregado a las especies cautivas, y el parámetro conocido como heredabilidad, el cual tiene la función de indicar el grado de determinación genética de un carácter productivo en particular, es decir la heredabilidad es un indicador de que tan heredable es esa característica y por lo tanto nos dice, qué mejora o ganancia genética podemos esperar al producir la progenie de reproductores seleccionados para esa característica (Lutz, 1996). Sin embargo, lo extenso del mejoramiento que se logra no solo depende de la heredabilidad del carácter mismo, sino que en muchos aspectos influye también el esquema de crianza selectiva, la interacción de ese carácter con otros aspectos biológicos del genoma y con aspectos físicos del ambiente (Wilkins, 1981). La heredabilidad permite una selección artificial que facilita modificar el acervo genético de una población con respecto a uno o varios caracteres, por lo tanto, es un componente integral del mejoramiento

genético a través de la selección (Lutz, 1996). Los valores promedio van a ir cambiando en el sentido deseado a medida que sucedan las generaciones (Gjedrem y Finland, 1995; Browdy, 1998), teniendo siempre en mente que entre mayor sea el número de reproductores, menor será el grado de consanguinidad con el paso de las generaciones. Por esto no habrá peligro de la consecuente depresión endogámica y por ende de la depresión económica de los sistemas acuaculturales.

Cuando no se tiene cuidado en los esquemas de manejo y se descuidan aspectos como el número de reproductores involucrados en cada ciclo reproductivo (tamaño efectivo poblacional), se puede tener una pérdida de hasta el 60% de la variabilidad genética en siete generaciones (Sbordoni *et al.* 1986, 1987). Se han reportado casos extremos de pérdida de variabilidad genética de camarón, causada por iniciar poblaciones en cautiverio con números reducidos de reproductores, así como por no llevar un control preciso del número de progenies aportadas por cada presunto reproductor utilizado durante los desoves en masa, lo cual puede resultar en que un número mínimo de reproductores sean los que aportan las progenies (Benzie, 1998). Harris *et al.* (1990) también encontraron una disminución de heterocigosis en camarón blanco cautivo contra la descendencia de progenitores silvestres provenientes de Guatemala (0.038 contra 0.075). La atención se enfocó en posibles consecuencias perjudiciales de la endogamia incontrolada y en intentos para mantener poblaciones con tamaños efectivos mayores.

Es posible mantener suficientes niveles de variación genética en linajes cultivados a corto plazo maximizando la variación en las poblaciones base, y a largo plazo incluyendo la progenie de un gran número de reproductores para prevenir la endogamia (Benzie, 1998). Laubier *et al.* (1984) mencionan que en un estudio con *P. japonicus* no se encontraron diferencias en los niveles de variabilidad genética entre poblaciones silvestres y las observadas en cuatro generaciones cultivadas, originalmente derivadas de cruza de dos grupos de progenies independientes provenientes de un número desconocido de hembras. Sin embargo no hay un registro del estado genético de esta población a largo plazo. Sunden y Davis (1991) encontraron reducción en el número de alelos, pero sin depresión significativa de heterocigocidad en poblaciones cultivadas de *P. vannamei* que se habían mantenido en cautiverio con bastante éxito reproductivo en Texas desde 1983, y en las cuales, se cuidó el manejar un tamaño poblacional efectivamente grande para evitar problemas de endogamia y

deriva génica. Evolución y mejora genética son dos procesos de cambio que se producen en las poblaciones a expensas de la variabilidad genética (Alvarez, 1987a).

Un aspecto fundamental en la acuicultura del camarón, es conocer el nivel de variabilidad genética tanto de los camarones de linaje cultivado o mejorado, como de las poblaciones silvestres. Esto es importante porque el monitoreo del polimorfismo, la heterocigosis y el nivel de endogamia permite llevar un seguimiento preciso de las progenies para tener mayores elementos en la evaluación del desempeño de las poblaciones cautivas. Por otro lado, cuando la fuente del cultivo son poblaciones silvestres, el conocimiento del nivel de variabilidad genética es importante ya que permite identificar si existe homogeneidad genética poblacional o si el recurso se segrega en varias poblaciones. Si esto último fuera el caso, entonces se requiere tener los elementos necesarios para poder escoger la población más adecuada como fuente de reproductores o animales para engorda. Esto implica que, la selección de poblaciones silvestres deberá estar basada bajo los criterios de buena calidad genética.

Recientemente, los métodos de genética de poblaciones han avanzado considerablemente. Ahora es posible dar respuesta a la pregunta de como identificar y definir distintos linajes o poblaciones, estimar el tamaño de la población y los cambios dentro de ella (Lavery y Keenan, 1995). El uso de los métodos genéticos moleculares para definir estructuras de poblaciones, está basado en el concepto de que cuando las subpoblaciones son aisladas o parcialmente aisladas unas de otras, se acumulan diferencias genéticas entre ellas, debido a la deriva génica aleatoria o la selección natural por la adaptación a condiciones ambientales locales (Grant *et al.* 1999). El grado de diferenciación genética entre las poblaciones generalmente refleja la cantidad de restricción en el flujo génico entre ellas (Grant *et al.* 1999).

Los loci alozimicos son de gran utilidad como marcadores del genoma. Además de la función de las alozimas como marcadores nucleares especie-específicos en la cuantificación de heterocigosis, diversidad y diferenciación genética, y otras medidas para cuantificar variación genética intra e interpoblacional, pueden servir también en la identificación de clones, análisis de paternidad, caracterización de poblaciones, endogamia y las consecuencias de la domesticación o del impacto ambiental en las poblaciones (Zapata, 1987; Pella y Milner, 1988; Alvarez, 1987b; Grant *et al.* 1999; Müller-Starck, 2001). El término isoenzimas se refiere a todas las formas funcionalmente similares de enzimas incluyendo las producidas por

diferentes loci o por diferentes alelos de un mismo locus, mientras que por alozimas se refiere comúnmente a las formas múltiples de una enzima, producto de variantes alélicas de un locus particular, es decir las alozimas son un subgrupo de las isozimas y ambas formas pueden ser visualizadas electroforéticamente (Utter *et al.* 1987; Murphy *et al.* 1990; Parker *et al.* 1998; Baker, 2000a).

La mayoría de los estudios de la variabilidad genética en camarones peneidos se han realizado a través del análisis electroforético de enzimas, con resultados que indican relativamente poco polimorfismo alozímico (Mulley y Later, 1980; Harris *et al.* 1990; Tam y Chu, 1993). Sin embargo esto se ha considerado suficiente para el desarrollo exitoso de trabajos sobre mejora genética y para la preservación de los recursos genéticos de las poblaciones silvestres y linajes explotables para la acuicultura (Rodríguez-Romero y Gasca-Montes, 1999). Existen además varios estudios publicados de ADN nuclear y mitocondrial para analizar la variación genética de poblaciones mediante técnicas como: el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), haplotipos de ADNmt, huellas génicas (fingerprinting), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y secuenciación (Hoelzel, 1992; Parker *et al.* 1998). Aunque estas nuevas tecnologías ofrecen tremenda ganancia en resolución, aún no (y quizás nunca lo harán) sustituyen la aplicabilidad de la electroforesis enzimática en diferentes estudios como estructura y variación genética en poblaciones, sistemática, endogamia, sistemas de domesticación de especies relacionadas, hibridaciones, orígenes de poliploidía, genética ecológica y organización del genoma, entre otras (Murphy *et al.* 1990).

Las nuevas tecnologías frecuentemente asumen superioridad sobre técnicas previas, y hacen ver como obsoletas a las herramientas moleculares que las preceden (Benzie *et al.* 1993; García *et al.* 1994; García y Benzie, 1995; Tassanakajon *et al.* 1997, 1998; Hansen *et al.* 2000). Sin embargo, la electroforesis de alozimas (apéndice 1), ha probado ser tan o más adecuada que los métodos nuevos de ADN para detectar diferencias poblacionales en muchas especies (Toline y Baker, 1995; Grijalva-Chon *et al.* 1996; Morán *et al.* 1996; Apostolidis *et al.* 1997; Ward *et al.* 1997), así como para la identificación de los efectos genéticos de acciones de manejo en poblaciones naturales y cultivadas (Grant *et al.* 1999). Aun así, los

datos obtenidos del ADNmt y la electroforesis de proteínas, han sido propuestos como una herramienta conjunta descriptiva más útil para la genética poblacional, debido al tipo complementario de información proporcionada por los dos métodos (datos de haploides de ADN evolucionado rápidamente y heredados maternalmente y datos de genotipos de alelos y loci diploides heredados sexualmente) (Allendorf, *et al.* 1987).

Varios criterios deben ser utilizados en la elección de un método molecular para inferir estructura genética entre poblaciones: uno es que el método deberá detectar variabilidad genética con una base conocida de herencia que demuestre la naturaleza genética de los marcadores utilizados. Otro requerimiento es que el método deberá lograr el análisis de tamaños grandes de muestras que proporcionen suficiente poder estadístico para detectar subdivisiones genéticas entre las poblaciones en el menor tiempo posible (Grant *et al.* 1999).

La información alélica y genotípica obtenida por métodos electroforéticos permite detectar cambios y medir directamente la estabilidad de poblaciones silvestres y de linajes de cultivo (Allendorf, *et al.* 1987). La electroforesis de proteínas junto con la visualización histoquímica detecta variantes mendelianas (alozimas) con expresión codominante, en loci genéticos identificables (Hedgecock, 1977; Grant *et al.* 1999), donde cada genotipo usualmente produce un fenotipo electroforético único (Allendorf y Ferguson 1990). La electroforesis de isoenzimas es una herramienta práctica, metodológicamente sencilla, relativamente barata y rápida, para el análisis de la variación de locus simples en poblaciones de cualquier forma de vida, además de que varios loci pueden ser examinados en tamaños de muestra grandes (Allendorf y Utter, 1979; Ayala, 1984; Utter *et al.* 1987; Murphy *et al.* 1990; May, 1992). Varios métodos estadísticos pueden ser utilizados en los datos de frecuencias alélicas y genotípicas para estimar estructuración dentro de las poblaciones y migración entre las poblaciones (Grant *et al.* 1999). El verdadero poder de esta metodología radica en la habilidad para asignar una base genética al fenotipo observado, ya que descifrar las bases genéticas de los patrones observados del bandeo proteico, es la parte más difícil de todo el proceso. Una vez comprendidas estas bases genéticas es posible hacer y confirmar predicciones acerca de esa variación genética en la población (Parker *et al.* 1998). Sin embargo, esta técnica tiene cierta limitación ya que debido a la redundancia del código



genético (apéndice 2), la resolución de la electroforesis de proteínas no siempre es adecuada para detectar diferencias entre individuos o poblaciones, ya que no todos los cambios en los genes tienen como consecuencia diferencias en la carga neta de la proteína expresada (Park y Moran, 1994).

La electroforesis es la separación de una mezcla de moléculas eléctricamente cargadas en un campo eléctrico (Aebersold *et al.* 1987). Algunos de los aminoácidos que componen las moléculas de proteínas tienen cadenas laterales con cargas positivas (arginina, lisina e histidina) o negativas (ácido glutámico y ácido aspártico) y como resultado, la molécula de proteína tienen una carga neta basada en el arreglo de los aminoácidos en su estructura tridimensional (Mathews y Van Holde, 1996; Murphy *et al.* 1990). El fundamento del método electroforético se basa en las cargas eléctricas netas de las proteínas, las cuales responden al campo eléctrico que se hace fluir a través de un gel. Estas cargas netas dependen del pH del amortiguador en el cual se encuentran las proteínas en solución (Richardson *et al.* 1986; May, 1992). Cuando una mezcla molecular es aplicada en el campo eléctrico, el resultado es el aislamiento de cada tipo de carga molecular a diferentes distancias de su punto de aplicación (Aebersold *et al.* 1987; Pasteur, *et al.* 1988). Todas las moléculas con carga semejante migrarán una distancia característica a través del campo eléctrico, en un tiempo dado (las moléculas positivas al lado negativo y las moléculas negativas al lado positivo). La velocidad de migración de una molécula está directamente relacionada con su carga. La medida y forma de una molécula de proteína también afecta la velocidad de migración en el gel (Mathews y Van Holde, 1996; Baker, 2000a). Lo que se observa al final de una corrida electroforética es una serie de bandas indicando la presencia de una enzima en particular. Estas bandas son visibles ya que existen tinciones específicas que contienen el sustrato para la enzima, cofactores, y uno o varios de los siguientes: estabilizadores, activadores o estimuladores de la reacción y un colorante que precipita, cambia de color o produce fluorescencia, en el sitio que la enzima cataliza la reacción (Harris y Hopkinson, 1978; Hartl, 1988; Baker, 2000a). Si el producto proteico de dos alelos en un locus en particular tienen diferentes cargas o formas significativamente diferentes, su velocidad de migración será diferente y aparecerán como

bandas separadas cuando el gel es teñido. La naturaleza de la matriz del gel mantiene la posición de las moléculas de proteínas después que la electroforesis ha terminado (May, 1992). El número de bandas en un organismo heterocigoto depende del número de subunidades que conforman la enzima.

Algunas de las enzimas están compuestas de más de un polipéptido o producto del gen (estructura cuaternaria). La enzima es un monómero si la proteína es una cadena polipéptida y serán dos las bandas presentes en un heterocigoto, un dímero si está compuesta de dos subunidades, cada una consistente de una cadena polipéptida simple y el heterocigoto presentará tres bandas, o tetrámero si cuatro subunidades se requieren para formar la proteína activa y serán cinco las bandas características de sus heterocigotos. Cada enzima tiene un número constante de subunidades no importa cuantos loci codifican para la enzima o que organismo se esté analizando (Grant *et al.* 1984; May, 1992).

Muchas hipótesis se han ofrecido para explicar las diferencias en la variación genética intra e interespecies, éstas pueden ser clasificadas como modelos neutrales y modelos de selección. Los modelos neutrales utilizan la mutación neutral, tiempo, tamaño efectivo poblacional, migración y deriva génica, para hacer predicciones acerca de la diferenciación de poblaciones y de la cantidad de variación genética (Mitton y Lewis, 1989). La selección natural tiene un número infinito de modelos a los que puede involucrar para tratar de explicar cualquier juego de datos (Allendorf, 1983, Mitton y Lewis, 1989).

Hay mucho debate para discernir si la variación alélica de las proteínas detectada por electroforesis es resultado de la selección natural o de mutaciones neutrales y de la deriva génica (Nei, 1983; Ohta, 1992). Existen evidencias en una amplia variedad de especies, que indican que hay tendencia de los heterocigotos a tener incremento en la sobrevivencia, resistencia a enfermedades, tasa de crecimiento y estabilidad evolutiva (Allendorf y Leary 1986; Zouros y Foltz, 1987). Además ciertos datos experimentales sugieren que algunas diferencias alélicas identificadas por electroforesis, están asociadas con adaptaciones a diferentes ambientes (Nei, 1983). Sin embargo, la teoría neutral de la evolución molecular tiene el efecto benéfico de servir como hipótesis nula, contra la cual datos empíricos pueden ser probados (Baker, 2000b). Por lo tanto, en un análisis de divergencia de las frecuencias

alélicas en poblaciones naturales es apropiado considerar la neutralidad selectiva como la hipótesis nula. Esta hipótesis deberá rechazarse solo si hay evidencias de diferencias significantes en la distribución de las frecuencias alélicas en los loci polimórficos o alguna otra evidencia de la acción de la selección natural (Allendorf, 1983).

La hipótesis de la neutralidad selectiva del polimorfismo alozímico manifiesta que alelos neutrales son mantenidos en una población por un balance entre la mutación (que produce nuevos alelos) y la deriva génica (la cual elimina alelos ya existentes) (Kimura, 1982; Nei, 1983; Ohta, 1992; Baker, 2000a), y que la selección natural opera principalmente para reducir la variabilidad genética (Nei, 1983). Esta hipótesis predice que la vasta mayoría de las mutaciones son efectivamente neutrales y por lo tanto, no aumentan su frecuencia debido a una selección natural positiva (Carvalho y Hauser, 1994). Muchas isoenzimas alélicas son funcionalmente equivalentes en los organismos por largos periodos de tiempo (Kimura, 1982; Zouros y Foltz, 1987; Baker, 2000a), pero pueden ocurrir variaciones en el ambiente que inducirán una fuerte selección diferencial en ellas, que causará cambios en sus frecuencia en la población (Zouros y Foltz, 1987). Sin embargo, este proceso normalmente no llevará a la fijación de alelos alternos, ya que la fijación o extinción de la población es gobernada por la deriva génica durante largos periodos de neutralidad funcional (Zouros y Foltz, 1987).

En una población en equilibrio mutación-deriva génica, existe la misma probabilidad de que un locus muestre deficiencia o exceso de la diversidad genética cuando son conformados con modelos de mutación. Sin embargo, en poblaciones que han sufrido una disminución reciente de su tamaño efectivo poblacional, la mayoría de sus loci exhiben un exceso de diversidad genética, en el sentido de Nei (1987), medida como heterocigosis ( $H_e$ ) y calculada a partir de las frecuencias alélicas observadas, con respecto a la diversidad genética esperada en el equilibrio mutación-deriva génica ( $H_{eq}$ ), que es calculada a partir del número de alelos, (Piry<sup>4</sup> *et al.* 1999; Cornuet y Luikart, 1996).

---

4. Piry, S., G. Luikart y J..M. Cornuet. 1999. <http://www.cnsam.inra.ft./URLB>

En poblaciones pequeñas, se llevan a cabo cambios aleatorios significantes de las frecuencias alélicas, que se hacen más evidentes con reducciones consecutivas del tamaño efectivo poblacional. Tales cambios ilustran el concepto de la deriva génica, en casos extremos, la deriva génica puede dar lugar a la fijación por azar de un alelo y a la eliminación de otro. En poblaciones grandes, con un gran rango geográfico de distribución, los individuos tienden a aparearse con los que están más cercanos sobre todo si el desplazamiento de los organismos está limitado. Esto produce un patrón de apareamiento no aleatorio que puede dar lugar a deriva génica y dividir a la población en una serie de subpoblaciones, que difieren entre sí, en las frecuencias de algunos alelos y en la eliminación por azar de otros (Klug y Cummings, 1999). Debido a la selección natural, la divergencia en las frecuencias alélicas puede estar presente aun cuando haya un moderado intercambio génico entre las subpoblaciones y también se puede mantener una homogeneidad con un intercambio génico restringido (Karl y Avise, 1992; Grijalva-Chon *et al.* 1996; Ward *et al.* 1997). Sin embargo, bajos intercambios, aproximadamente de un individuo por generación, mantendrá la presencia del mismo alelo en todas las subpoblaciones (Allendorf, 1983).

Lester (1979) y Mulley y Latter (1980) enfatizan la carencia de diferenciación genética entre poblaciones de camarones peneidos notando que poblaciones separadas por miles de kilómetros no muestran diferencias significantes en las frecuencias alélicas. Ahora está claro que puede darse este caso o que pueden diferir entre regiones, y este cambio puede ocurrir en una distancia relativamente corta (Benzie *et al.* 1992; Aubert y Lightner, 1999). Hay entonces una necesidad de hacer planes para el mantenimiento de la diversidad genética silvestre en las poblaciones de camarones (Benzie, 2000).

El monitoreo de los cambios genéticos en linajes cautivos a través de la evaluación de loci alozímicos, puede ser útil para la detección temprana de una pérdida de variabilidad genética y para prevenir efectos indeseables en la producción asociados con la misma (Pérez *et al.* 2001). En la actualidad, no existen estudios del comportamiento genético de los linajes de cultivo de camarón azul utilizados en los sistemas acuaculturales del noroeste de México. Aubert y Lightner (1999) y Rosa-Vélez *et al.* (2000) realizaron un análisis de esta especie en

varias localidades del Golfo de California, apreciando que se encuentra bien estructurada en varias subpoblaciones. Lester (1983) reportó la variación alozímica de la misma especie en una localidad cercana a Guaymas, Sonora. Por lo ya expuesto y debido al auge que está teniendo la acuacultura en el noroeste de México, se considera que el presente estudio va a ser fundamental para conocer el potencial genético de domesticación de las poblaciones estudiadas. Además, en el futuro se podrá dar seguimiento al comportamiento genético de éstas y otras líneas cultivadas y a su efecto sobre las poblaciones silvestres del Golfo de California.

## **II.- OBJETIVOS**

### **II.1.- Objetivo general**

Evaluar la variabilidad y estructuración genética a nivel de alozimas de dos poblaciones silvestres y dos linajes cultivados de camarón azul.

### **II.2.- Objetivos particulares**

- a) Determinar el grado de heterocigosis, el número promedio de alelos por locus, el porcentaje de polimorfismo y el nivel de endogamia en las poblaciones y linajes a estudiar de la especie considerada.
  
- b) Evaluar la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas entre las localidades y establecer el grado de diferenciación genética entre los linajes cultivados y las poblaciones silvestres.
  
- c) Detectar reducciones efectivas de los tamaños poblacionales, suficientes para evidenciar “cuellos de botella” genéticos en cada una de las muestras.



#### **III.1.- Material biológico**

Para el desarrollo de esta investigación se analizaron 203 camarones, repartidos en cuatro muestras. Una muestra consistió de 56 organismos silvestres provenientes de una localidad cercana a Guaymas, Sonora, proporcionados por pescadores ribereños y capturados en septiembre de 1998. La segunda muestra consistió de 50 organismos silvestres de una localidad cercana a Puerto Peñasco, Sonora y proporcionados por investigadores de la Unidad Experimental Peñasco del DICTUS en noviembre de 1998. Estos camarones se habían mantenido en cautiverio por varios meses. La tercera muestra consistió de 47 organismos de un linaje que denominaremos A, proporcionados por el Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora en julio de 1998. La última muestra fue de 50 organismos de otro linaje que denominaremos B y que fueron proporcionados por una granja del Estado de Sonora en septiembre de 1999.

Una vez obtenidas las muestras, fueron congeladas o mantenidas en hielo, para su traslado al DICTUS en Hermosillo, Sonora; en donde se procedió a introducir a los organismos, individualmente, en bolsas de plástico debidamente etiquetados. Se conservaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posteriormente obtener el extracto proteico.

#### **III.2.- Obtención del extracto protéico.**

Para este estudio de variación alozímica se homogenizaron por separado el tejido blando del cefalotórax y una porción aproximada de cinco gramos del músculo del primer segmento abdominal de cada camarón, en un volumen igual (a la masa del tejido) para el primero y volumen y medio para el segundo de una solución amortiguadora consistente de Tris-HCl 0.1M pH 8.0, NAD, NADP y Polivinilpirrolidona (10:1:1:100; v:p:p:p, modificada de Lester (1983)). Se utilizó un homogenizador eléctrico de acero inoxidable en el caso de cefalotórax y un mortero de porcelana para el músculo. Todo este proceso se realizó a bajas temperaturas para prevenir la degradación enzimática. Las muestras se centrifugaron a 5000

xg. durante 20 minutos a 4°C recuperándose el sobrenadante en viales de plástico debidamente etiquetados para después ser almacenados a -70°C para su posterior análisis electroforético.

### **III.3.- Análisis electroforético.**

Se estudiaron 17 sistemas enzimáticos más proteínas generales en los cuales lograron revelarse de manera adecuada un total de 31 loci en las cuatro muestras (tabla 1). La electroforesis se llevó a cabo siguiendo en general la metodología descrita por Aebersold *et al.* (1987). Se utilizaron los sistemas enzimáticos y soluciones amortiguadoras descritas en el apéndice 3 y reportadas por Maqueda-Cornejo (1990) y Grijalva-Chon (1995). El análisis electroforético consta de varios pasos: preparación de los geles, aplicación del extracto de proteínas al gel, montaje del gel y aplicación de la corriente eléctrica, rebanado y revelado de las proteínas. A continuación se describe paso a paso el protocolo completo de la electroforesis horizontal en geles de almidón.

#### **III.3.1.- Preparación de los geles**

Se prepararon los geles de almidón de papa hidrolizado al 12 % (18.0 × 16.0 × 0.9 cm), con el amortiguador para el gel (apéndice 3), correspondiente al sistema proteico a evaluar. En un matraz Erlenmeyer de 1000 ml se calentaron hasta ebullición 300 ml de la solución amortiguadora, mientras que en un matraz Kitazato de 2000 ml eran suspendidos 52.8 g del almidón hidrolizado en 140 ml de la misma solución a temperatura ambiente, se incorporó la solución en ebullición al matraz con el almidón en suspensión mezclando vigorosamente, para después calentar la mezcla hasta ebullición, agitando periódicamente hasta lograr un gel opalescente, espeso y viscoso (Redfield y Salini, 1980). Previa desgasificación por 40 segundos, utilizando una bomba de vacío, el gel fue vertido en un molde formado con un marco de madera y una base de vidrio. Posteriormente se cubrió con otro vidrio antes de que el gel empezara a enfriarse, removiendo cualquier grumo o contaminación y evitando la formación de burbujas que pudieran interrumpir el paso de la corriente eléctrica. Los geles fueron utilizados después de tres y antes de las 18 horas de haber sido elaborados.



Tabla 1.- Sistemas proteicos, número asignado por la Comisión de Enzimas<sup>+</sup> (No. E.C.), loci revelados y tejidos, utilizados en el estudio de variabilidad genética a nivel de aloenzimas realizado en poblaciones silvestres y linajes cultivados de camarón azul (*P. stylirostris*).

PROTEÍNAS	No. E.C.	LOCUS	TEJIDO
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	1.2.1.12	<i>GAPDH</i> *	Ab
Glutamato deshidrogenasa	1.4.1.3	<i>GDH</i> *	Ab
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	1.1.1.8	<i>G3PDH</i> *	Ab
Lactato deshidrogenasa	1.1.1.27	<i>LDH</i> *	Ab
Malato deshidrogenasa	1.1.1.37	<i>MDH-1</i> *	Ab
		<i>MDH-2</i> *	Ab
Aspartatoamino transferasa	2.6.1.1	<i>AAT-1</i> *	Ab
Fosfatasa ácida	3.1.3.2	<i>ACP-1</i> *	Ct
		<i>ACP-2</i> *	Ct
		<i>ACP-3</i> *	Ct
Fosfatasa alcalina	3.1.3.1	<i>AKP-1</i> *	Ct
		<i>AKP-2</i> *	Ct
		<i>AKP-3</i> *	Ct
Leucin-amino peptidasa	3.4.11.1	<i>LAP</i> *	Ct
Enzima málica	1.1.1.40	<i>MDHP</i> *	Ab
Glucosa-6-fosfato isomerasa	5.3.1.9	<i>GPI</i> *	Ab
Fosfoglucomutasa	5.4.2.2	<i>PGM</i> *	Ab
Alcohol deshidrogenasa	1.1.1.1	<i>ADH</i> *	Ab
Isocitrato deshidrogenasa	1.1.1.42	<i>IDH-1</i> *	Ab
Xantina deshidrogenasa	1.1.1.204	<i>XDH-2</i> *	Ab y Ct
Sorbitol deshidrogenasa	1.1.1.14	<i>SDH-1</i> *	Ab
		<i>SDH-2</i> *	Ab
Esterasas	3.1.1.-	<i>EST-2</i> *	Ct
		<i>EST-3</i> *	Ct
		<i>EST-4</i> *	Ct
		<i>EST-5</i> *	Ct
Proteína total	-----	<i>PTO-1</i> *	Ab
		<i>PTO-2</i> *	Ab
		<i>PTO-3</i> *	Ab
		<i>PTO-4</i> *	Ab
		<i>PTO-5</i> *	Ab

+ Comisión de Enzimas (IUBNC, 1984).

Tejidos: Ab= abdomen, Ct= cefalotórax

### **III.3.2.- Aplicación del extracto proteico al gel.**

Se retiró el marco de madera y se procedió a hacer un corte de lado a lado a 3 cm. de la orilla del gel, nombrándose al corte el “origen”. La pieza angosta (catodal) y la porción restante (anodal) se separaron unos centímetros y se aplicó el extracto proteico de cada organismo, utilizando pedacitos o “mechas” de papel Whatman # 3 de  $1.2 \times 0.1$  cm. que fueron tomados con pinzas cuidadosamente y sumergidos en el extracto para que se humedecieran aproximadamente una tercera parte. Los trocitos de papel con el extracto se colocaron verticalmente en el “origen” de la porción anodal del gel, de izquierda a derecha, iniciando y terminando con azul de bromofenol al 0.0002% que sirvió como marcador del corrimiento electroforético. Después, la porción catodal se acercó y alineó cuidadosamente a la pieza anodal, removiéndose las bolsas de aire que pudieran impedir el paso de la corriente eléctrica al no permitir el contacto completo entre las dos porciones del gel. Se volvió a colocar el marco de madera y se procedió al montaje del gel sobre la cámara electroforética.

### **III.3.3.- Montaje del gel y aplicación de la corriente eléctrica.**

La electroforesis se llevó a cabo en el refrigerador para remover el calor generado durante el proceso y para mantener el gel frío minimizando la degradación enzimática. La electroforesis se realizó en unidades de acrílico que contenían las soluciones amortiguadoras para el electrodo (apéndice 3), correspondientes al sistema o sistemas proteicos a evaluar.

La conexión entre el amortiguador y el gel se hizo utilizando “puentes” de  $16.5 \times 8.0$  cm de papel Whatman #1, empapándose éstos con la solución amortiguadora y colocándose desde cada reservorio hacia el gel cubriendo 2.5 cm del mismo, una vez hecho esto, se colocó una placa de vidrio sobre el gel para evitar su deshidratación, cuidando se diera un buen contacto entre el gel y el amortiguador a través de los “puentes”.

La unidad de acrílico se conectó a una fuente de poder. El electrodo de la terminal negativa se conectó en la terminal del amortiguador adyacente al “origen” (lugar donde fueron colocados los extractos proteicos). A los pH's que se manejaron en el estudio, la mayoría de las proteínas se encuentran con una carga neta negativa por lo que la separación de las proteínas se llevo a cabo en la parte anodal del gel. Se inició el corrimiento electroforético, durante el cual el voltaje varió, mientras que la corriente se mantuvo constante (tabla II).

Después de 15 min. de iniciada la electroforesis, se retiró la corriente eléctrica y los trocitos de papel fueron removidos. Para esto, se retiró solo la placa de vidrio superior y las “mechas” fueron sacadas hacia arriba, una a una, con sumo cuidado. Una vez retiradas todas las “mechas” el vidrio fue colocado de nuevo sobre el gel y se reaplicó la corriente eléctrica. Una vez transcurrido el tiempo necesario para la separación adecuada de las proteínas de interés se registraron las condiciones finales de electroforesis (tabla II), antes de suspender la corriente eléctrica y proceder con el rebanado del gel.

#### **III.3.4.- Rebanado del gel.**

Una vez que finalizó la electroforesis se procedió a desmontar el gel de la cámara electroforética, se retiraron los “puentes”, la placa de vidrio superior y el molde de madera. La porción catodal fue desechada y las esquinas del lado izquierdo del gel fueron cortadas en ángulo para indicar la dirección de la aplicación de los extractos. El gel fue rebanado horizontalmente en capas de 0.2 cm, desechando la capa superficial y las restantes rebanadas (tres o cuatro) se utilizaron para el revelado de las proteínas..

#### **III.3.5.- Revelado de las proteínas.**

Las rebanadas de gel fueron colocadas individualmente en recipientes de plástico. Para el revelado se utilizaron 50 ml de una mezcla consistente del sustrato para la enzima en particular, cofactores, estabilizadores, activadores y estimuladores de la reacción además del pigmento o los elementos necesarios para obtener un producto colorido (apéndices 4 y 5). Las mezclas de revelado fueron preparadas inmediatamente antes de detener el corrimiento electroforético. Para el revelado, con el fin de acelerar la reacción enzimática se incubaron las rebanadas del gel por lo general, a menos que se indique algo diferente, en la oscuridad a 37°C, por un tiempo determinado por la actividad de la proteína.

Tabla II.- Amortiguadores, condiciones electroforéticas y tinciones de revelado, para cada sistema proteico utilizado en el análisis de la variabilidad genética a nivel de alozimas en poblaciones silvestres y linajes cultivados de camarón azul (*P. stylirostris*). El amperaje se mantiene constante, mientras que los valores de voltaje representan las condiciones iniciales y finales.

SISTEMA PROTEICO	AMORTIGUADOR	CONDICIONES	TINCIÓN
GAPDH	G	75 mA/gel; 80-135V; 5hrs.	2
G3PDH	G	ibídem	2
LDH	G	ibídem	1
EST	G	ibídem	1
XDH	G	ibídem	2
GDH	G	50mA/gel; 64-159V; 15hrs.	2
LAP	C	75mA/gel; 66-94V; 6hrs.	1
MDH	C	ibídem	2
AAT	C	ibídem	2
AKP	C	ibídem	5
SDH	C	ibídem	2
GPI	C	50mA/gel; 50-98V; 22hrs.	1
PGM	C	ibídem	2
ACP	E	50mA/gel; 110-244V; 5hrs.	1
IDH	B	50mA/gel; 34-82V; 17hrs.	3
MDHP	B	50mA/gel; 34-59V; 9hrs.	2
ADH	B	ibídem	1
PTO	A	50 mA/gel; 80-205V; 12hrs.	4

Amortiguador

A= Tris-Citrato, pH 7.0 (Tracey *et al.* 1975).  
 B= tris-Maleato, pH 7.4 (Selander *et al.* 1971).  
 C= Tris-Citrato II continuo pH 8.0 (Selander *et al.* 1971).  
 E= Tris-Citrato discontinuo pH 8.3/8.7 (Poulik, 1957)  
 G= Tris-EDTA-Borato, pH 8.0 (Shaw y Koen, 1968).

Tinciones:

1=Shaw y Prasad, (1970).  
 2=Schaal y Anderson, (1974).  
 3=Abreu-Grobois, (1983).  
 4=Rosa-Vélez, (1986).  
 5= Shaw y Koen, (1968)

La detección de las enzimas o proteínas generales (apéndice 5), se hizo por formación de un producto colorido o precipitación del pigmento ante un producto de la reacción enzimática o de la degradación de la proteína. Una vez que aparecieron las bandas representantes de los fenotipos proteicos resultantes, se eliminó la solución reveladora y se procedió a fijar los geles para su preservación en una solución de agua, metanol y ácido acético (6:3:1). Posteriormente se procedió a la interpretación de los zimogramas obtenidos.

#### **III.4.- Interpretación de los zimogramas.**

Para la interpretación genética de los patrones de bandeo producidos por los sistemas proteicos se siguieron los criterios de Grant *et al.* (1984) y Utter *et al.* (1987), tomándose en cuenta la nomenclatura de Shaklee *et al.* (1990). De esta forma se asignó a las enzimas el nombre, abreviatura y números, conforme a lo recomendado por la IUBNC (1984), con excepción de la Enzima Málica (1.1.1.40). "Gene" y "Locus" se manejan prácticamente como términos intercambiables y para nombrarlos se utilizó el símbolo alfanumérico, italicizado con un asterisco, de la proteína que codifican. Los loci en sistemas multilocus se designaron en forma ascendente empezando con el número 1 para el locus más cercano al ánodo. Los alelos para los loci polimórficos se designaron con relación a su movilidad relativa respecto al alelo más común a quien se le otorgó un valor de 100. Se hicieron comparaciones lado a lado de todas las isoenzimas como recomiendan Busack, (1988) y Matthew *et al.* (1999), además se realizaron repeticiones de las electroforesis para las enzimas multialélicas (mas de dos alelos), en las cuales para asignar el avance relativo se introdujo un organismo heterocigoto para el alelo más común cada cuatro o cinco organismos. Para el revelado de las esterasas se siguieron las sugerencias de Laubier *et al.* (1984), realizando el revelado con los ésteres por separado y de la manera habitual con los dos ésteres juntos. Con el fin de obtener una mejor resolución del revelado de ACP, AKP, LAP y las esterasas se realizó una postunión como la efectuada en AAT (Pasteur *et al.* 1988). Una vez realizada la interpretación de los zimogramas, su imagen fue digitalizada en la computadora.

### III.5.- Análisis de datos.

Los datos se analizaron con los programas Biosys-1 de Swofford y Selander (1981), Genepop de Raymond y Rousset (1995) y Bottleneck de Piry<sup>4</sup> *et al.* (1999) y Cornuet y Luikart (1996). Un locus se consideró polimórfico si la frecuencia del alelo más común no excedió del 95%. La heterocigosis media observada y esperada sobre todos los loci se calculó de acuerdo a la fórmula insesgada de Nei (1978). El número promedio de alelos por locus se calculó como la media aritmética de los alelos en el total de loci revelados. Se realizaron pruebas t para evidenciar diferencias significativas en las heterocigosis observadas, esperadas y en el número de alelos por locus entre las localidades y entre las heterocigosis observadas y esperadas en cada localidad, así como pruebas de diferencias de proporciones para el polimorfismo entre las cuatro localidades. Se probó la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba de bondad de ajuste ji cuadrada ( $\chi^2$ ) con y sin agrupación de fenotipos, para todos los loci variables, a la que se aplicó las correcciones de Lavenne para muestras pequeñas y las de Yates para continuidad. Se calcularon las probabilidades exactas de la significancia, solo para verificar la concordancia de la prueba ji cuadrada y se aplicó el procedimiento secuencial de Bonferroni (Rice, 1989) para la corrección de todas las pruebas múltiples realizadas.

Se determinó la deficiencia o exceso de heterocigotos por medio del estimador  $D=(H_o-H_e)/H_e$ , donde  $H_o$  es la heterocigosis observada y  $H_e$  es la heterocigosis esperada. También se obtuvo el índice de fijación o coeficiente de endogamia de Wright ( $F$ ) de cada muestra, para medir las desviación de los niveles esperados de cruza consanguíneas (Hedgecock, 1977; Nei, 1987) y se probó la hipótesis nula  $F=0$  mediante  $\chi^2=F^2N$  con  $k-1$  grados de libertad, donde  $N$  es el número de organismos y  $k$  el número de alelos (Li y Horvitz, 1953). Con el fin de detectar desequilibrio genotípico, se realizaron pruebas de Ji cuadrada entre pares de loci polimórficos para probar la independencia de sus genotipos (Weir, 1996). Para detectar reducciones recientes de tamaños efectivos poblacionales (“cuellos de botella”), se probó la hipótesis de equilibrio mutación-deriva génica de cada localidad, conforme a tres modelos de mutación utilizando la prueba de Wilcoxon y un descriptor cualitativo de la distribución de las frecuencias alélicas (Cornuet y Luikart, 1996; Piry<sup>4</sup> *et al.* 1999).

Se probó la homogeneidad de las frecuencias alélicas y genotípicas en los loci polimórficos entre cada par y el total de las localidades, utilizando la prueba G log-verosimilitud (Zar, 1984). Se calculó la Distancia y Similitud genética insesgada de Nei (1978) entre las localidades, obteniéndose un dendograma a partir de Similitud Genética mediante el método aritmético de agrupación pareada no ponderada (UPGMA por sus siglas en inglés). También se estimaron los coeficientes de endogamia  $F_{it}$  y  $F_{is}$  además del  $F_{st}$  o varianza estandarizada de las frecuencias alélicas para medir la cantidad de diferenciación genética entre las localidades (Wright, 1965). Se probó la hipótesis nula  $F_{is}=0$  por medio de  $\chi^2 = F_{is}^2 N (k-1)$ , con  $k(k-1)/2$  grados de libertad, en donde  $k$  denota el número de alelos diferentes y  $N$  el número de organismos (Li y Horvitz, 1953). Se probó la hipótesis nula  $F_{st}=0$  por medio de  $\chi^2 = 2NF_{st}(k-1)$  con  $(k-1)(s-1)$  grados de libertad, en donde  $s$  indica el número de localidades (Workman y Niswander, 1970). Se estimó además el número de migrantes por generación entre las localidades de acuerdo a  $N_e m = (F_{st}^{-1} - 1)/4$  (Hartl, 1988).

#### IV.-RESULTADOS

En la tabla III se resume la variación genética en cada una de las cuatro muestras y en el total de organismos analizados. El tamaño promedio de muestra por locus para el total de organismos analizados fue de  $200.8 \pm 0.7$  y para las muestras de Guaymas, Puerto Peñasco, linaje A y linaje B por separado fue de  $55.6 \pm 0.1$ ,  $49.5 \pm 0.2$ ,  $46.2 \pm 0.3$  y  $50.0 \pm 0.0$  respectivamente.

La diversidad genética media en el total de las localidades, evaluada como número de alelos promedio por locus, heterocigosis observada y heterocigosis esperada según las expectativas de Hardy-Weinberg, fueron de  $1.81 \pm 0.2$ ,  $0.108 \pm 0.029$  y  $0.165 \pm 0.046$  respectivamente, mientras que medida como polimorfismo (criterio 0.95) fue de 35.5%. En las diferentes localidades, el número de alelos, la heterocigosis observada y la heterocigosis esperada según Hardy-Weinberg fluctuaron entre 1.48-1.71, 0.088-0.129 y 0.138-0.175 respectivamente. Los valores de heterocigosis observados fueron estadísticamente similares entre las cuatro muestras. En las muestras de Guaymas, Puerto Peñasco y Linaje A la heterocigosis observada fue significativamente menor que la esperada y solo entre los linajes cultivados la heterocigosis esperada fue significativamente diferente (tabla IV). El porcentaje de loci polimórficos tampoco presentó diferencias significativas entre las muestras siendo éste de 32.3 para Puerto Peñasco y de 29.0 para el resto de las muestras.

De los 31 loci resueltos (tabla 1), *GAPDH\**, *G3PDH\**, *LDH\**, *MDH-1\**, *MDH-2\**, *AAT-1\**, *ACP-2\**, *ACP-3\**, *AKP-2\**, *AKP-3\**, *SDH-1\**, *SDH-2\**, *MEZ\**, *ADH\**, *XDH-2\**, *PTO-1\**, *PTO-2\**, *PTO-3\**, *PTO-4\** y *PTO-5\** resultaron monomórficos, mientras que *GDH\**, *ACP-1\**, *AKP-1\**, *LAP\**, *GPI\**, *PGM\**, *IDH\*-1\**, *EST-2\**, *EST-3\**, *EST-4\** y *EST-5\**, presentaron polimorfismo bajo el criterio de 0.95 en una o más de las muestras, como se señala en la tabla V. Debido a la mala resolución de los zimogramas (quizás por la desnaturalización enzimática), no se tomó en cuenta a *AAT-2\**, *EST-1\**, *IDH\*-2*, *XDH-1\**, y una tercer banda (posiblemente híbrida) en el sistema MDH.



Tabla III.- Variabilidad genética determinada por medio de las frecuencias alélicas de 31 loci proteicos de camarón azul (*P. stylirostris*) en dos localidades silvestres, en dos linajes de cultivo y en el total de organismos analizados.

	GUAYMAS	PEÑASCO	LINAJE A	LINAJE B	TOTAL
Número de organismos analizados	56	50	47	50	203
Número de loci analizados	31	31	31	31	31
Tamaño promedio de muestra por locus	55.6 (0.1)	49.5 (0.2)	46.2 (0.3)	50.0 (0.0)	200.8 (0.7)
Número promedio de alelos por locus	1.71 (0.22)	1.71 (0.21)	1.55 (0.17)	1.48 (0.15)	1.81 (0.2)
Número de loci polimórficos	9	10	9	9	11
% de loci polimórficos*	29.0	32.3	29.0	29.0	35.5
Heterocigosis promedio. ( <i>H</i> )					
<i>H</i> esperada**	0.144 (0.043)	0.175 (0.048)	0.157 (0.047)	0.138 (0.041)	0.165 (0.046)
<i>H</i> observada	0.108 (0.033)	0.129 (0.036)	0.088 (0.029)	0.110 (0.036)	0.108 (0.029)

Error estándar entre paréntesis

\*Un locus es considerado polimórfico si la frecuencia del alelo más común es igual o menor a 0.95.

\*\*Sin sesgo

Tabla IV.- Valores de significancia obtenidos para las pruebas *t* de las heterocigosis esperadas (arriba) o heterocigosis observadas (abajo) entre localidades, y entre ambas heterocigosis en cada localidad (diagonal) de camarón azul (*P. stylirostris*) analizadas en este estudio.

	GUAYMAS	PEÑASCO	LINAJE A	LINAJE B
GUAYMAS	0.006739	0.064116	0.525364	0.769638
PEÑASCO	0.233787	0.018364	0.470836	0.149595
LINAJE A	0.477101	0.221786	0.015103	0.036889
LINAJE B	0.948645	0.565689	0.204334	0.205422



Biblioteca de Posgrado  
en Ciencias e Ingeniería

Tabla V.- Frecuencias alélicas, heterocigosis observada (Ho), heterocigosis esperada sin sesgo (He) según el equilibrio de Hardy-Weinberg, número de organismos analizados (N) por locus polimórfico y el número de alelos “privados” y “ausentes” en camarón azul (*P. stylirostris*).

LOCUS	ALELOS	FRECUENCIAS ALÉLICAS			
		GUAYMAS	PEÑASCO	LINAJE A	LINAJE B
<i>GDH*</i>	N	56	48	44	50
	100	0.589	0.531	0.557	0.620
	96	0.411	0.469	0.443	0.380
	He	0.488	0.503	0.499	0.476
	Ho	0.357	0.354	0.341	0.280
<i>ACP-1*</i>	N	55	48	47	50
	111	0.118	0.427	0.309	0.660
	103	0.336	0.156	0.266	0.060
	100	0.545	0.417	0.426	0.280
	He	0.581	0.626	0.660	0.487
<i>AKP-1*</i>	N	54	49	47	50
	114	0.037	0.429	0.117	0.610
	104	0.009	0.184	0.330	0.030
	100	0.639	0.327	0.447	0.360
	97	0.315	0.061	0.106	----
<i>LAP*</i>	N	56	46	47	50
	115	0.277	----	----	----
	103	0.134	0.359	0.160	0.090
	100	0.518	0.478	0.521	0.650
	96	0.071	0.163	0.319	0.260
	He	0.638	0.623	0.607	0.507
	Ho	0.536	0.304	0.383	0.300

Cont. Tabla V.

LOCUS	ALELOS	FRECUENCIAS ALÉLICAS			
		GUAYMAS	PEÑASCO	LINAJE A	LINAJE B
<i>GPI*</i>	N	56	50	47	50
	136	----	----	0.202	0.170
	100	1.000	0.980	0.798	0.830
	64	----	0.020	----	----
	He	0.000	0.040	0.326	0.285
	Ho	0.000	0.040	0.277	0.340
<i>PGM*</i>	N	54	50	46	50
	105	0.056	0.070	----	----
	100	0.907	0.870	0.783	0.810
	95	0.009	0.020	0.196	0.190
	90	0.009	0.010	0.022	----
	80	0.019	0.030	----	----
	He	0.175	0.239	0.353	0.311
	Ho	0.111	0.220	0.391	0.340
<i>IDH*</i>	N	53	46	42	50
	104	0.264	0.293	0.321	0.370
	100	0.736	0.707	0.679	0.630
	He	0.392	0.419	0.441	0.471
	Ho	0.302	0.326	0.119	0.140
<i>EST-2*</i>	N	56	50	47	50
	104	0.348	0.400	0.223	0.180
	100	0.527	0.430	0.606	0.600
	95	0.125	0.170	0.170	0.220
	He	0.591	0.633	0.559	0.565
	Ho	0.482	0.580	0.128	0.180
<i>EST-3*</i>	N	56	50	44	50
	120	0.098	0.150	0.193	0.160
	116	0.054	0.040	0.205	0.090
	108	0.152	0.270	0.250	0.300
	100	0.545	0.470	0.352	0.450
	94	0.152	0.070	----	----
	He	0.651	0.684	0.743	0.681
	Ho	0.482	0.660	0.159	0.460

Cont. Tabla V.

LOCUS	ALELOS	FRECUENCIAS ALÉLICAS			
		GUAYMAS	PEÑASCO	LINAJE A	LINAJE B
<i>EST-4*</i>	N	56	50	47	50
	109	0.330	0.470	----	----
	100	0.670	0.530	1.000	1.000
	He	0.446	0.503	0.000	0.000
	Ho	0.446	0.460	0.000	0.000
<i>EST-5*</i>	N	56	50	47	50
	100	1.000	0.620	1.000	1.000
	88	----	0.380	----	----
	He	0.000	0.476	0.000	0.000
	Ho	0.000	0.440	0.000	0.000
	“privados”	1	2	----	----
“ausentes”	3	2	7	9	

Comparando las localidades silvestres y los linajes de cultivo en cuanto a la heterocigosis observada por locus (tabla V), tenemos que cuatro de los nueve loci polimórficos en los dos linajes cultivados (*ACP-1\**, *AKP-1\**, *GPI\** y *PGM\**), registraron una heterocigosis mayor que la presente en los mismos loci en las localidades silvestres. El locus *LAP\** presenta una heterocigosis observada similar entre las localidades (0.300 para el linaje B, 0.304 para Puerto Peñasco y 0.383 para el linaje A), a excepción de Guaymas cuya heterocigosis observada en este locus es de 0.536; mientras que en *GDH\** y *EST-3\** la heterocigosis observada es menor en uno u otro linaje de cultivo. Por último, solo en *IDH\** y *EST-2\** fueron menores las heterocigosis observadas en ambos linajes de cultivo (linaje A 0.119 y 0.128; linaje B 0.140 y 0.180, respectivamente) con respecto a los mismos loci de las localidades silvestres (0.302 y 0.482 para Guaymas y 0.326 y 0.580 para Puerto Peñasco, respectivamente).

Por otra parte, Guaymas tiene como alelo privado a *LAP\*115*, mientras que Puerto Peñasco tiene a *GPI\*64* y *EST-5\*88*. Los linajes A y B no muestran alelos “privados” pero registran la ausencia de 7 y 9 alelos respectivamente con relación a las localidades silvestres (Tabla V). Ambos linajes de cultivo carecen de los alelos *LAP\*115*, *GPI\*64*, *PGM\*105*, *PGM\*80*, *EST-3\*94*, *EST-4\*109* y *EST-5\*88* registrados en una o ambas localidades silvestres, mismas que en lo concerniente a loci polimórficos solo difieren en la variación alélica del locus *EST-5\** en Puerto Peñasco. Aunque los linajes de cultivo comparten los mismos loci polimórficos, en el linaje B no se registraron los alelos *PGM\*90* y *AKP-1\*97* presentes en el otro linaje y en las poblaciones silvestres. En este estudio los alelos de frecuencias  $<0.05$  fueron: en Guaymas *AKP-1\*114*, *AKP-1\*104*, *PGM\*95*, *PGM\*90* y *PGM\*80*; en Puerto Peñasco *GPI\*64*, *PGM\*95*, *PGM\*90*, *PGM\*80* y *EST-3\*116*. Estos alelos, con excepción de *PGM\*90* en el linaje A y *AKP-1\*104* en el linaje B (0.022 y 0.030, respectivamente), muestran frecuencias mayores de 0.05 (0.09-0.610) o ausencia en los linajes de cultivo.

Con el fin de probar el equilibrio de Hardy-Weinberg en cada uno de los loci polimórficos, se realizaron pruebas de Bondad de Ajuste de Ji cuadrada con significancia de 0.05. Estas pruebas se llevaron a cabo de manera no agrupada para el total de loci polimórficos y, con agrupación de los fenotipos en los loci que revelaron más de dos alelos (multialélicos).

Para esta agrupación los fenotipos se reunieron en tres categorías. 1) Homo: Homocigotos para el alelo más común, 2) Hetero: Heterocigotos para el alelo más común y 3) Otros: Homocigotos para alelos diferentes al común y otros heterocigotos. Los resultados se muestran en las tablas VI, VII, VIII y IX.

En Guaymas (tabla VI), los loci *ACP-1\**, *AKP-1\**, *LAP\** y *PGM\** se encuentran en desequilibrio genético, aunque al agrupar los fenotipos solo los dos primeros sostienen este resultado. Los loci *ACP-1\**, *AKP-1\** y *LAP\** en Puerto Peñasco (tabla VII) se encuentran fuera del equilibrio según Hardy-Weinberg, tanto con la prueba para fenotipos agrupados como para no agrupados. En la tabla VIII correspondiente al linaje A se observa que sin agrupamiento, seis de sus nueve loci polimórficos (*ACP-1\**, *AKP-1\**, *LAP\**, *IDH\**, *EST-2\** y *EST-3\**), se encuentran en desequilibrio genético con respecto al modelo de Hardy-Weinberg, mientras que en la prueba para los fenotipos agrupados *ACP-1\**, *AKP-1\** y *LAP\** no presentaron desequilibrio, contradiciendo la prueba Ji cuadrada para fenotipos no agrupados. La mayoría de los loci polimórficos del linaje B (tabla IX) se muestran fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg excepto *PGM\** y *GPI\**, además de *ACP-1\** y *EST-3\** que presentan un aparente equilibrio genético en la prueba con sus fenotipos agrupados.

El agrupamiento de los fenotipos en los loci multialélicos se hace para tratar de evitar rechazar el posible equilibrio existente en loci cuyas frecuencias alélicas esperadas son tan pequeñas que pueden afectar el resultado de la prueba estadística (Wayne, 1980), como es el caso de *PGM\** de Guaymas donde se puede considerar como acertado el agrupamiento de los fenotipos y aceptada su condición de equilibrio genético, ya que cumple con el hecho de tener varias frecuencias alélicas esperadas muy pequeñas y las diferencias entre las frecuencias alélicas observadas y esperadas no son muy notables. El resto de las discrepancias entre los análisis agrupados y no agrupados (*LAP\** de Guaymas, *ACP-1\**, *AKP-1\** y *LAP\** del linaje A además de *ACP-1\** y *EST-3\** en el linaje B), se atribuyen a un enmascaramiento del desequilibrio genético demostrado sin la agrupación de sus fenotipos (Swofford y Selander, 1981). Este desequilibrio se puede ver directamente en las diferencias que muestran las frecuencias observadas y esperadas de los diferentes fenotipos en estos loci y por el hecho de

Tabla VI.- Prueba de Bondad de Ajuste de Ji cuadrada ( $\chi^2$ ), para probar el equilibrio genético de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg en cada locus analizado del camarón azul (*P. stylirostris*), en la localidad de Guaymas, Sonora.

LOCUS	FENOTIPO	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA	$\chi^2$	g.l.	P
<i>GDH</i> *	100	23	19.324	3.320	1	0.068
	100/96	20	27.351			
	96	13	9.324			
<i>ACP-1</i> *	111	1	0.716	14.145	3	0.003
	111/103	5	4.413			
	111/100	6	7.156			
	103	12	6.110			
	103/100	8	20.367			
	100	23	16.239			
	Fenotipos agrupados:					
	a) HOMO.	23	16.239	12.065	1	0.001
	b) HETERO.	14	27.523			
	c) OTROS	18	11.239			
<i>AKP-1</i> *	114	0	0.056	15.172	6	0.019
	114/104	0	0.037			
	114/100	4	2.579			
	114/97	0	1.271			
	104	0	0.000			
	104/100	1	0.645			
	104/97	0	0.318			
	100	27	21.925			
	100/97	10	21.925			
	97	12	5.243			
	Fenotipos agrupados					
	a) HOMO.	27	21.925	7.679	1	0.006
	b) HETERO.	15	25.150			
	c) OTROS	12	6.925			
<i>LAP</i> *	115	6	4.189	18.737	6	0.005
	115/103	0	4.189			
	115/100	19	16.198			
	115/96	0	2.234			
	103	4	0.946			
	103/100	7	7.838			
	103/96	0	1.081			
	100	14	14.892			
	100/96	4	4.180			
	96	2	0.252			



Cont. Tabla VI.

LOCUS	FENOTIPO	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA	$\chi^2$	g.l.	P
Fenotipos agrupados						
	a) HOMO.	14	14.892			
	b) HETERO.	30	28.216			
	c) OTROS	12	12.892	0.081	1	0.776
<i>PGM*</i>	105	1	0.140			
	105/100	4	5.495			
	105/95	0	0.056			
	105/90	0	0.056			
	105/80	0	0.112			
	100	46	44.421			
	100/95	1	0.916			
	100/90	1	0.916			
	100/80	0	1.832			
	95	0	0.000			
	95/90	0	0.009			
	95/80	0	0.019			
	90	0	0.000			
	90/80	0	0.019			
	80	1	0.009	27.858	10	0.002
Fenotipos agrupados						
	a) HOMO.	46	44.421			
	b) HETERO.	6	9.159			
	c) OTROS	2	0.421	3.569	1	0.059
<i>IDH*</i>	104	6	3.600			
	104/100	16	20.800			
	100	31	28.600	2.018	1	0.155
<i>EST-2*</i>	104	9	6.676			
	104/100	17	20.730			
	104/95	4	4.919			
	100	18	15.414			
	100/95	6	7.441			
	95	2	0.820	2.003	3	0.572
Fenotipos agrupados						
	a) HOMO.	18	15.414			
	b) HETERO.	23	28.171			
	c) OTROS	15	12.414	1.407	1	0.236

Cont. Tabla VI.

LOCUS	FENOTIPO	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA	$\chi^2$	g.l.	P
<i>EST-3*</i>	120	2	0.495			
	120/116	0	0.595			
	120/108	1	1.685			
	120/100	6	6.045			
	120/94	0	1.685			
	116	1	0.135			
	116/108	0	0.919			
	116/100	3	3.297			
	116/94	1	0.919			
	108	4	1.225			
	108/100	6	9.342			
	108/94	2	2.604			
	100	19	16.486			
	100/94	8	9.342			
94	3	1.225	10.821	10	0.372	
Fenotipos agrupados						
	a) HOMO.	19	16.486			
	b) HETERO.	23	28.027			
	c) OTROS	14	11.486	1.330	1	0.249
<i>EST-4*</i>	109	6	6.000			
	109/100	25	25.000			
	100	25	25.000	0.000	1	1.000

HOMO = Homocigoto para el alelo más común.

HETERO = Heterocigoto para el alelo más común

OTROS = Homocigotos raros y otros heterocigotos

gl = grados de libertad

Tabla VII.- Prueba de Bondad de Ajuste de Ji cuadrada ( $\chi^2$ ), para probar el equilibrio genético de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg en cada locus analizado del camarón azul (*P. stylirostris*), en la localidad de Puerto Peñasco, Sonora.

LOCUS	FENOTIPO	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA	$\chi^2$	g.l.	P
<i>GDH</i> *	100	17	13.421	3.451	1	0.063
	100/96	17	24.158			
	96	14	10.421			
<i>ACP-1</i> *	111	13	8.632	21.766	3	0.000
	111/103	4	6.474			
	111/100	11	17.263			
	103	5	1.105			
	103/100	1	6.316			
	100	14	8.211			
	Fenotipos agrupados					
	a) HOMO.	13	8.632	5.549	1	0.018
	b) HETERO.	15	23.737			
	c) OTROS	20	15.632			
<i>AKP-1</i> *	114	15	8.876	51.400	6	0.000
	114/104	1	7.794			
	114/100	10	13.856			
	114/97	1	2.598			
	104	8	1.577			
	104/100	1	5.938			
	104/97	0	1.113			
	100	10	5.113			
	100/97	1	1.979			
	97	2	0.155			
	Fenotipos agrupados					
	a) HOMO.	15	8.876	11.246	1	0.001
	b) HETERO.	12	24.247			
	c) OTROS	22	15.876			
<i>LAP</i> *	103	11	5.802	29.466	3	0.000
	103/100	11	15.956			
	103/96	0	5.440			
	100	15	10.396			
	100/96	3	7.253			
	96	6	1.154			

Cont. Tabla VII.

LOCUS	FENOTIPO	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA	$\chi^2$	g.l.	P
Fenotipos agrupados						
	a) HOMO.	15	10.396			
	b) HETERO.	14	23.209			
	c) OTROS	17	12.396	6.247	1	0.012
<i>PGM*</i>	105	1	0.212			
	105/100	5	6.152			
	105/95	0	0.141			
	105/90	0	0.071			
	105/80	0	0.212			
	100	38	37.788			
	100/95	2	1.758			
	100/90	1	0.879			
	100/80	3	2.636			
	95	0	0.010			
	95/90	0	0.020			
	95/80	0	0.061			
	90	0	0.000			
	90/80	0	0.030			
	80	0	0.030	0.460	10	1.000
Fenotipos agrupados						
	a) HOMO.	38	37.788			
	b) HETERO.	11	11.424			
	c) OTROS	1	0.788	0.000	1	1.000
<i>IDH*</i>	104	6	3.857			
	104/100	15	19.286			
	100	25	22.857	1.561	1	0.212
<i>EST-2*</i>	104	8	7.879			
	104/100	16	17.374			
	104/95	8	6.869			
	100	11	9.121			
	100/95	5	7.384			
	95	2	1.374	0.803	3	0.849
Fenotipos agrupados						
	a) HOMO.	11	9.121			
	b) HETERO.	21	24.758			
	c) OTROS	18	16.121	0.755	1	0.385

Cont. Tabla VII.

LOCUS	FENOTIPO	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA	$\chi^2$	g.l.	P
<i>EST-3*</i>	120	1	1.061			
	120/116	0	0.606			
	120/108	2	4.091			
	120/100	7	7.121			
	120/94	4	1.061			
	116	0	0.061			
	116/108	1	1.091			
	116/100	3	1.899			
	116/94	0	0.283			
	108	5	3.545			
	108/100	13	12.818			
	108/94	1	1.909			
	100	11	10.919			
	100/94	2	3.323			
	94	0	0.212	6.987	10	0.727
	Fenotipos agrupados					
	a) HOMO.	11	10.919			
	b) HETERO.	25	25.162			
	c) OTROS	14	13.919	0.000	1	1.000
<i>EST-4*</i>	109	12	10.919			
	109/100	23	25.162			
	100	15	13.919	0.165	1	0.685
<i>EST-5*</i>	100	20	19.101			
	100/88	22	23.798			
	88	8	7.101	0.102	1	0.750

HOMO = Homocigoto para el alelo más común.  
 HETERO = Heterocigoto para el alelo más común  
 OTROS = Homocigotos raros y otros heterocigotos  
 gl= grados de libertad

Tabla VIII.- Prueba de Bondad de Ajuste de Ji cuadrada ( $\chi^2$ ), para probar el equilibrio genético de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg en cada locus analizado del camarón azul (*P. stylirostris*), en el linaje A.

LOCUS	FENOTIPO	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA	$\chi^2$	g.l.	P
<i>GDH*</i>	100	17	13.517	3.606	1	0.058
	100/96	15	21.966			
	96	12	8.517			
<i>ACP-1*</i>	111	5	4.366	11.549	3	0.009
	111/103	2	7.796			
	111/100	17	12.473			
	103	8	3.226			
	103/100	7	10.753			
	100	8	8.387			
	Fenotipos agrupados					
a) HOMO.	8	8.387	0.003	1	0.955	
b) HETERO.	24	23.226				
c) OTROS	15	15.387				
<i>AKP-1*</i>	114	1	0.591	39.760	6	0.000
	114/104	0	3.667			
	114/100	9	4.968			
	114/97	0	1.183			
	104	12	5.000			
	104/100	7	14.000			
	104/97	0	3.333			
	100	12	9.258			
	100/97	2	4.516			
	97	4	0.484			
	Fenotipos agrupados					
a) HOMO.	12	9.258	1.953	1	0.162	
b) HETERO.	18	23.484				
c) OTROS	17	14.258				
<i>LAP*</i>	103	4	1.129	12.474	3	0.006
	103/100	6	7.903			
	103/96	1	4.839			
	100	16	12.645			
	100/96	11	15.806			
	96	9	4.677			

Cont. Tabla VIII.

LOCUS	FENOTIPO	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA	$\chi^2$	g.l.	P
Fenotipos agrupados						
	a) HOMO.	16	12.645			
	b) HETERO.	17	23.710			
	c) OTROS	14	10.645	3.036	1	0.081
<i>GPI*</i>	136	3	1.839			
	136/100	13	15.323			
	100	31	29.839	0.469	1	0.493
<i>PGM*</i>	100	28	28.088			
	100/95	16	14.242			
	100/90	0	1.582			
	95	0	1.681			
	95/90	2	0.396			
	90	0	0.011	4.765	3	0.190
Fenotipos agrupados						
	a) HOMO.	28	28.088			
	b) HETERO.	16	15.824			
	c) OTROS	2	2.088	0.000	1	1.000
<i>IDH*</i>	104	11	4.229			
	104/100	5	18.542			
	100	26	19.229	20.518	1	0.000
<i>EST-2*</i>	104	10	2.258			
	104/100	0	12.871			
	104/95	1	3.613			
	100	26	17.161			
	100/95	5	9.806			
	95	5	1.290	50.279	3	0.000
Fenotipos agrupados						
	a) HOMO.	26	17.161			
	b) HETERO.	5	22.677			
	c) OTROS	16	7.161	26.773	1	0.000

Cont. Tabla VIII.

LOCUS	FENOTIPO	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA	$\chi^2$	g.l.	P
<i>EST-3*</i>	120	7	1.563	76.714	6	0.000
	120/116	0	3.517			
	120/108	0	4.299			
	120/100	3	6.057			
	116	7	1.759			
	116/108	0	4.552			
	116/100	4	6.414			
	108	11	2.655			
	108/100	0	7.839			
	100	12	5.345			
	Fenotipos agrupados					
	a) HOMO.	12	5.345	17.233	1	0.000
	b) HETERO.	7	20.310			
	c) OTROS	25	18.345			

HOMO = Homocigoto para el alelo más común.

HETERO = Heterocigoto para el alelo más común

OTROS = Homocigotos raros y otros heterocigotos

gl = grados de libertad



Tabla IX.- Prueba de Bondad de Ajuste de Ji cuadrada ( $\chi^2$ ), para probar el equilibrio genético de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg en cada locus analizado del camarón azul (*P. stylirostris*), en el linaje B.

LOCUS	FENOTIPO	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA	$\chi^2$	g.l.	P
<i>GDH*</i>	100	24	19.101	7.371	1	0.007
	100/96	14	23.798			
	96	12	7.101			
<i>ACP-1*</i>	111	19	21.667	19.974	3	0.000
	111/103	1	4.000			
	111/100	27	18.667			
	103	2	0.152			
	103/100	1	1.697			
	100	0	3.818			
	Fenotipos agrupados					
	a) HOMO.	19	21.667	2.076	1	0.150
	b) HETERO.	28	22.667			
	c) OTROS	3	5.667			
<i>AKP-1*</i>	114	11	18.485	16.588	3	0.001
	114/104	3	1.848			
	114/100	36	22.182			
	104	0	0.030			
	104/100	0	1.091			
	100	0	6.364			
Fenotipos agrupados						
	a) HOMO.	11	18.485	17.870	1	0.000
	b) HETERO.	39	24.030			
	c) OTROS	0	7.485			
<i>LAP*</i>	103	3	0.364	19.959	3	0.000
	103/100	3	5.909			
	103/96	0	2.364			
	100	25	21.010			
	100/96	12	17.071			
	96	7	3.283			
Fenotipos agrupados						
	a) HOMO.	25	21.010	5.041	1	0.025
	b) HETERO.	15	22.980			
	c) OTROS	10	6.010			

Cont. Tabla IX.

LOCUS	FENOTIPO	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA	$\chi^2$	g.l.	P
<i>GPI*</i>	136	0	1.374	0.932	1	0.334
	136/100	17	14.253			
	100	33	34.374			
<i>PGM*</i>	100	32	32.727	0.090	1	0.764
	100/95	17	15.545			
	95	1	1.727			
<i>IDH*</i>	104	15	6.727	22.978	1	0.000
	104/100	7	23.545			
	100	28	19.727			
<i>EST-2*</i>	104	7	1.545	40.261	3	0.000
	104/100	1	10.909			
	104/95	3	4.000			
	100	27	17.879			
	100/95	5	13.333			
	95	7	2.333			
Fenotipos agrupados				26.576	1	0.000
a) HOMO.		27	17.879			
b) HETERO.		6	24.242			
c) OTROS		17	7.879			
<i>EST-3*</i>	120	5	1.212	19.574	6	0.003
	120/116	0	1.455			
	120/108	2	4.848			
	120/100	4	7.273			
	116	0	0.364			
	116/108	2	2.727			
	116/100	7	4.091			
	108	9	4.394			
	108/100	8	13.636			
	100	13	10.000			
	Fenotipos agrupados					
a) HOMO.		13	10.000			
b) HETERO.		19	25.000			
c) OTROS		18	15.000			

HOMO = Homocigoto para el alelo más común.  
 HETERO = Heterocigoto para el alelo más común  
 OTROS = Homocigotos raros y otros heterocigotos  
 gl = grados de libertad

que no exhiben frecuencias alélicas tan pequeñas para que sea necesario y justificable la agrupación de sus fenotipo. Por lo tanto, *ACP-1\**, *AKP-1\** y *LAP\** se encuentran en desequilibrio genético según las expectativas de Hardy-Weinberg en las cuatro localidades. Estos loci son los únicos en desequilibrio en las localidades silvestres, mientras que en los linajes de cultivo también *IDH\**, *EST-2\** y *EST-3\** muestran desequilibrio genético. Además, en el linaje B *GDH\** no presenta equilibrio genético (Tabla X). En todos los casos el análisis secuencial de Bonferroni concuerda con las significancias del análisis de  $\chi^2$ .

La tabla X muestra desviaciones significativas de los niveles esperados de cruza de organismos relacionados en cada una de las muestras (Índices de fijación), presentando los linajes cultivados mayor endogamia. También se muestran los Coeficientes D que indican la deficiencia (signo negativo) o exceso (signo positivo) de heterocigotos en cada locus polimórfico en las diferentes muestras. Los organismos silvestres muestran deficiencia de heterocigotos en todos sus loci polimórficos a excepción de *EST-4\** en Guaymas, cuyo coeficiente  $D=0.000$  indica que coincide el número de heterocigotos observado con el esperado. El linaje A presenta el mismo comportamiento en cuanto a deficiencia de heterocigotos en la mayoría de sus loci, exceptuando a *PGM\** que tiene exceso de heterocigotos. En el linaje B son cuatro los loci polimórficos que muestran un exceso de heterocigotos (*ACP-1\**, *AKP-1\**, *GPI\** y *PGM\**), el resto presenta deficiencia en el número de heterocigotos.

El efecto de Wahlund y una reducción reciente del tamaño efectivo poblacional pueden manifestar un desequilibrio genotípico, aparente en el primero o verdadero en el segundo, entre pares de loci. En el análisis de Ji cuadrada que se realizó para probar la independencia de los genotipos entre pares de loci polimórficos (equilibrio genotípico), en cada una de las localidades (tabla XI), Guaymas presentó cinco pares de loci en desequilibrio genotípico (*ACP-1\*/AKP-1\**, *ACP-1\*/LAP\**, *IDH\*/AKP-1\**, *IDH\*/LAP\** además de *EST-2\*/EST-4\**); por su parte, en Puerto Peñasco solo dos pares de loci manifestaron desequilibrio (*AKP-1\*/ACP-1\** y *AKP-1\*/PGM\**). Los linajes cultivados son los que mostraron mayor desequilibrio genotípico entre pares de loci; en el linaje A fueron nueve los pares de loci en desequilibrio

Tabla X.- Índice de fijación (F) analizados mediante la prueba Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) para la hipótesis nula  $F=0$ , y deficiencia o exceso de heterocigotos (Coeficiente D) en cada locus polimórfico evaluado, de cuatro muestras de camarón azul (*P. stylirostris*).

LOCUS	GUAYMAS		PEÑASCO		LINAJE A		LINAJE B	
	F <sup>+</sup>	D	F <sup>+</sup>	D	F <sup>+++</sup>	D	F <sup>+++</sup>	D
<i>GDH</i> *	0.262	-0.269	0.289 <sup>+</sup>	-0.296	0.309 <sup>+</sup>	-0.317	0.406 <sup>++</sup>	-0.412 $\Delta$
<i>ACP-I</i> *	0.487 <sup>+++</sup>	-0.405 $\Delta$	0.361 <sup>+</sup>	-0.468 $\Delta$	-0.044	-0.162 $\Delta$	-0.248	+0.190 $\Delta$
<i>AKP-I</i> *	0.398 <sup>+</sup>	-0.440 $\Delta$	0.500 <sup>++</sup>	-0.579 $\Delta$	0.225	-0.432 $\Delta$	0.639 <sup>+++</sup>	+0.552 $\Delta$
<i>LAP</i> *	-0.073	-0.160 $\Delta$	0.390 <sup>+</sup>	-0.511 $\Delta$	0.275	-0.369 $\Delta$	0.341	-0.408 $\Delta$
<i>GPI</i> *	----	----	----	----	0.142	-0.152	-0.205	+0.193
<i>PGM</i> *	0.339	-0.364	0.027	-0.080	-0.022	+0.110	-0.105	+0.094
<i>IDH</i> *	0.223	-0.231	0.214	-0.222	0.727 <sup>+++</sup>	-0.730 $\Delta$	0.700 <sup>+++</sup>	-0.703 $\Delta$
<i>EST-2</i> *	0.176	-0.184	0.143	-0.083	0.777 <sup>+++</sup>	-0.772 $\Delta$	0.750 <sup>+++</sup>	-0.681 $\Delta$
<i>EST-3</i> *	0.172	-0.259	-0.004	-0.035	0.651 <sup>+++</sup>	-0.786 $\Delta$	0.232	-0.324 $\Delta$
<i>EST-4</i> *	-0.009	0.000	0.077	-0.086	----	----	----	----
<i>EST-5</i> *	----	----	0.066	-0.076	----	----	----	----

+ = 0.01 < P ≤ 0.05.

++ = 0.001 < P ≤ 0.01

+++ = P ≤ 0.001.

Signo negativo = deficiencia de heterocigotos

Signo positivo = exceso de heterocigotos

$\Delta$  = fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla XI. Valores de significancia obtenidos mediante la prueba Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) realizada para evaluar el equilibrio genotípico entre pares de loci polimórficos de camarón azul (*P. stylirostris*), en dos localidades silvestres y en dos linajes de cultivo.

PARES DE LOCI	GUAYMAS	PEÑASCO	LINAJE A	LINAJE B
<i>ACP-1*</i> / <i>AKP-1*</i>	0.00267	0.01472	0.00994	0.00000
<i>ACP-1*</i> / <i>LAP*</i>	0.01057	0.89366	0.67011	0.01402
<i>LAP*</i> / <i>GPI*</i>	----	0.46413	0.04478	0.12191
<i>ACP-1*</i> / <i>PGM*</i>	0.10901	0.93249	0.21155	0.00165
<i>AKP-1*</i> / <i>PGM*</i>	0.05084	0.04626	0.23583	0.48341
<i>GPI*</i> / <i>PGM*</i>	----	0.41287	0.02752	0.01318
<i>IDH*</i> / <i>GDH*</i>	0.22933	0.21849	0.04341	0.42446
<i>IDH*</i> / <i>AKP-1*</i>	0.03236	0.47534	0.16722	0.89170
<i>IDH*</i> / <i>LAP*</i>	0.00641	0.49747	0.03697	0.12607
<i>IDH*</i> / <i>GPI*</i>	----	0.63612	0.01622	0.91694
<i>IDH*</i> / <i>PGM*</i>	1.00000	0.22044	0.04575	0.04039
<i>ACP-1*</i> / <i>EST-2*</i>	0.51363	0.68478	0.38014	0.04186
<i>GDH*</i> / <i>EST-3*</i>	0.98607	0.43583	0.70883	0.02856
<i>GPI*</i> / <i>EST-3*</i>	----	0.65216	0.02202	0.11727
<i>EST-2*</i> / <i>EST-3*</i>	0.60555	0.38687	0.00461	0.39878
<i>EST-2*</i> / <i>EST-4*</i>	0.01188	0.89298	----	----

(*AKP-1\*/ACP-1\**, *LAP\*/GPI\**, *GPI\*/PGM\**, *IDH\*/GDH\**, *IDH\*/LAP\**, *IDH\*/GPI\**, *IDH\*/PGM\**, *GPI\*/EST-3\**, incluyendo a *EST-2\*/EST-3\**), mientras que en el linaje B siete pares de loci exhibieron dependencia genotípica (*ACP-1\*/AKP-1\**, *ACP-1\*/LAP\**, *ACP-1\*/PGM\**, *GPI\*/PGM\**, *IDH\*/PGM\**, *ACP-1\*/EST-2\** incluyendo a *GDH\*/EST-3\**). De todos éstos, solo el par de loci *ACP-1\*/AKP-1\** presentó desequilibrio genotípico en las cuatro localidades, lo que podría indicar que además de manifestar un desequilibrio provocado por el efecto de Wahlund o por la reducción del tamaño efectivo poblacional, podría estar revelando una dependencia entre sus frecuencias genotípicas provocada por la posible ubicación cercana de estos dos loci en un mismo cromosoma (ligamiento).

Una población estable presenta un tamaño efectivo poblacional grande, manifestando equilibrio con respecto a modelos de mutación-deriva génica, mientras que una población en desequilibrio con algún modelo de mutación exhibirá un exceso de heterocigosidad ( $He > Heq$ ), en el sentido de diversidad genética de Nei (1987). Para establecer si alguna de las localidades de muestreo han sufrido recientemente una reducción de su tamaño efectivo poblacional o si se encuentran en equilibrio mutación-deriva génica (estables), se realizó la prueba de Wilcoxon para exceso de heterocigosidad (tabla XII), considerando tres modelos de mutación: el modelo de dos fases (TPM), el modelo de alelos infinitos (IAM) y el modelo de mutación en varios pasos (SMM) (Piry<sup>4</sup> *et al.* 1999; Nei, 1988). Además se hizo una descripción cualitativa de la distribución de las frecuencias alélicas de cada muestra (figura 1) para detectar distorsiones en la distribución de las frecuencias alélicas inducidas por un “cuello de botella”. En la tabla XII, los valores de significancia obtenidos mediante la prueba de Wilcoxon para el equilibrio conforme a los tres modelos de mutación, indican que Puerto Peñasco, el linaje A y el linaje B muestran un exceso de diversidad genética promedio significativo ( $He > Heq$ ), lo que manifiesta que han sufrido una reducción reciente de su tamaño efectivo poblacional y que no se encuentran en equilibrio mutación-deriva génica. Guaymas no presenta un exceso promedio significativo de la heterocigosis calculada ( $He$ ) a partir de las frecuencias alélicas en relación a la heterocigosis obtenida mediante el número de alelos ( $Heq$ ), lo cual indica que dicha localidad se encuentra estable. Los niveles de significancia para los tres modelos siguen la misma tendencia, ya que van aumentando a través de la tabla

Tabla XII.- Valores de significancia obtenidos mediante la prueba de Wilcoxon para exceso de heterocigosis promedio ( $He > Heq$ ), en las localidades de estudio del camarón azul (*P. stylirostris*), utilizando el modelo de alelos infinito (IAM), el modelo de mutación en varios pasos (SMM) y el modelo de mutación en dos fases (TPM).

MODELO	LOCALIDADES		
	GUAYMAS	PEÑASCO	LINAJE A LINAJE B
IAM	0.06445	0.00342	0.00098 0.00098
TPM+	0.08203	0.04199	0.00195 0.00098
SMM	0.15039	0.04199	0.00488 0.00098

He= Heterocigosis esperada calculada a partir de las frecuencias génicas.

Heq= Heterocigosis calculada a partir del número de alelos.

+ = condiciones: 70% de mutaciones paso-simple, 30 de varianza entre pasos múltiples.

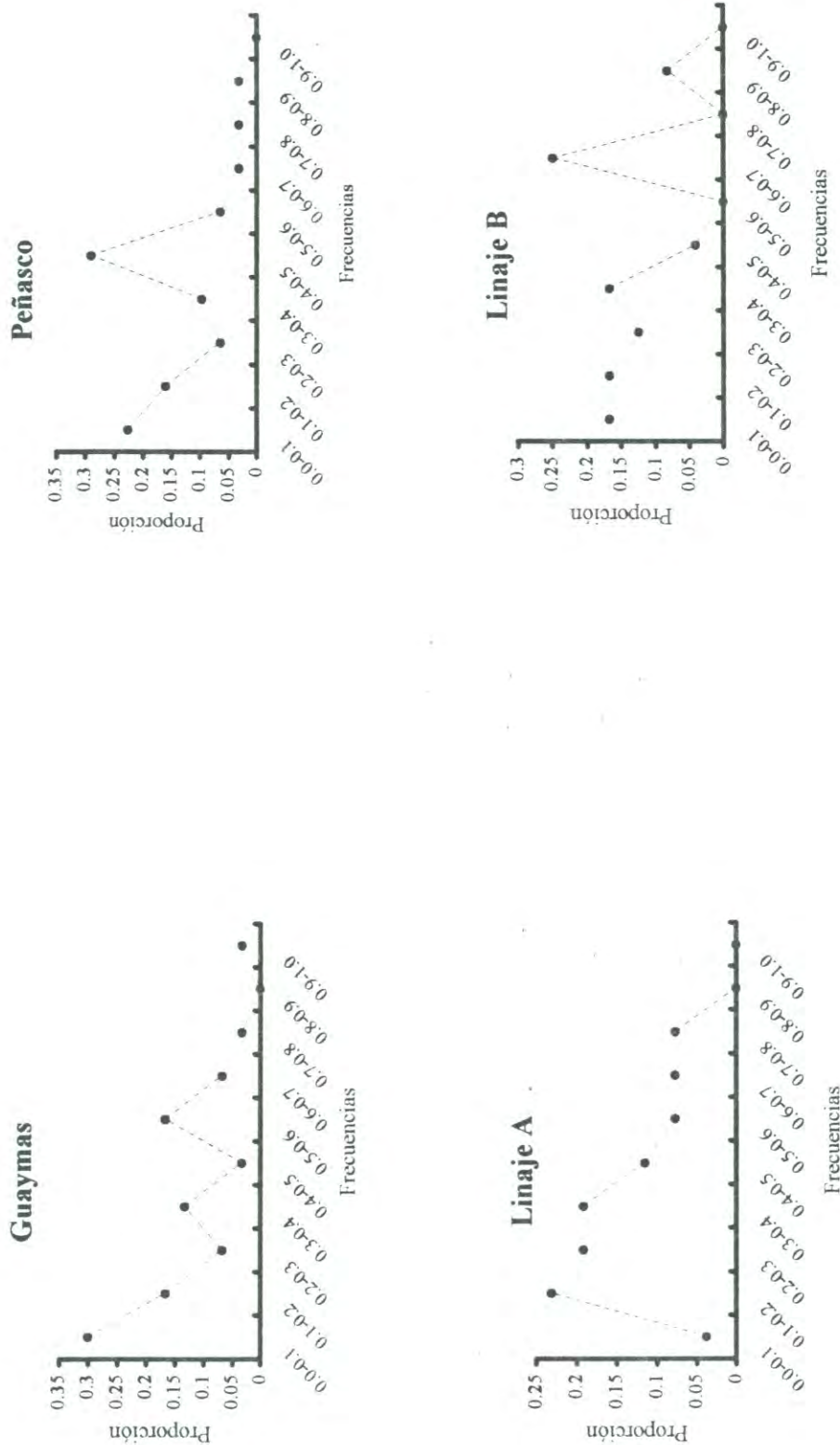


Figura 1.- Distribución de las frecuencias alélicas de 31 loci proteicos, revelados en dos localidades silvestres y en dos linajes de cultivo de camarón azul (*P. stylirostris*).



desde Guaymas (no significativo) hasta el linaje B, al mismo tiempo que disminuyen o se mantienen desde el modelo de alelos infinito (IAM) al modelo de mutación en varios pasos (SMM) en cada localidad. Un detalle importante es que con el modelo IAM se detectó el mismo nivel de reducción poblacional en ambos linajes, lo cual no ocurrió con los otros dos modelos quienes indican una mayor severidad en el linaje B.

La descripción cualitativa de la distribución de las frecuencias alélicas de los 31 loci analizados en cada una de las muestras (figura I), corrobora los resultados de la prueba de Wilcoxon para exceso de heterocigocidad en los tres modelos de mutación. En la localidad de Guaymas, la distribución de las frecuencias alélicas tiene la forma normal de L (la proporción de alelos de frecuencias bajas es mayor que en cualquiera del resto de los rangos), característica de una población estable. Mientras que en las gráficas de Puerto Peñasco y los dos linajes cultivados, se observan distorsiones de la distribución de las frecuencias alélicas (característico de una disminución reciente del tamaño efectivo poblacional). Esta distorsión se produce debido a que la proporción de alelos con frecuencias entre 0.0-0.1 es menor que la proporción de uno o varios de los rangos intermedios. En la muestra de Puerto Peñasco existen más alelos con frecuencias en un rango de 0.4-0.5 (29.0%) que en el rango de 0.0-0.1 (22.6%), en el linaje A, la proporción de alelos de frecuencias entre 0.0-0.1 es más baja (0.038) que en el resto de los rangos y el linaje B presenta un rango intermedio de frecuencias alélicas (0.3-0.4) con proporción igual y otro (0.6-0.7) con proporción mayor (0.250) que la del rango 0.0-0.1 (0.167).

En la tabla XIII se muestran los resultados del análisis de G log-verosimilitud para la homogeneidad de las frecuencias alélicas de los loci polimórficos entre las muestras. Analizando la distribución de las frecuencias alélicas en cada locus entre cada par de muestras, se observa que siete loci (*GDH\**, *GPI\**, *PGM\**, *IDH\**, *EST-2\**, *EST-3\** y *EST-4\**) se encuentran distribuidos en forma homogénea entre las localidades silvestres ( $P > 0.05$ ), mientras que los mismos loci mas *LAP\** y *EST-5\** presentan idéntico comportamiento en sus frecuencias alélicas entre los linajes de cultivo. Sin embargo, estos loci, a excepción de *IDH\** y *GDH\**, manifiestan diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas entre tipos de organismos (silvestres o cultivados), dando indicios de la formación de dos grupos. En general, la mayoría de los loci polimórficos a excepción de *GDH\** e *IDH\**,

Tabla XIII.- Valores de significancia obtenidos mediante el análisis G log verosimilitud, para la homogeneidad de las frecuencias alélicas de cada locus polimórficos analizados en camarón azul (*P. stylirostris*).

LOCUS	LOCALIDADES										Todas	
	Guaymas		Peñasco		Guaymas		Peñasco		Peñasco			
	Peñasco	Linaje A	Linaje B	Linaje A	Linaje B	Linaje A	Linaje B	Linaje A	Linaje B	Linaje A		Linaje B
<i>GDH*</i>	0.39306	0.66857	0.67708	0.76733	0.24855	0.45875	0.62274					
<i>ACP-1*</i>	0.00000	0.00443	0.00000	0.10639	0.00236	0.00000	0.00000					
<i>AKP-1*</i>	0.00000	0.00000	0.00000	0.00008	0.00000	0.00000	0.00000					
<i>LAP*</i>	0.00000	0.00000	0.00000	0.00205	0.00003	0.16874	0.00000					
<i>GPI*</i>	0.22154	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.57716	0.00000					
<i>PGM*</i>	0.89920	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.48342	0.00000					
<i>IDH*</i>	0.75154	0.42204	0.13822	0.73434	0.28548	0.53533	0.42681					
<i>EST-2*</i>	0.33112	0.13238	0.01327	0.01995	0.00314	0.60953	0.00976					
<i>EST-3*</i>	0.07348	0.00000	0.00000	0.00045	0.04660	0.11340	0.00000					
<i>EST-4*</i>	0.05020	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-----	0.00000					
<i>EST-5*</i>	0.00000	-----	-----	0.00000	0.00000	-----	0.00000					
TOTAL	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000					

Tabla XIV.- Valores de significancia obtenidos mediante el análisis G log verosimilitud, para la homogeneidad de las frecuencias genotípicas de cada locus polimórficos analizados en camarón azul (*P. stylirostris*).

LOCUS	LOCALIDADES										Todas
	Guaymas		Guaymas		Guaymas		Peñasco		Peñasco		
	Peñasco	Linaje A	Linaje A	Linaje B	Linaje A	Linaje B	Linaje A	Linaje B	Linaje A	Linaje B	
<i>GDH</i> *	0.54158	0.70561	0.72343	0.72343	0.79513	0.33067	0.53508	0.72480	0.33067	0.53508	0.72480
<i>ACP-1</i> *	0.00032	0.01496	0.00000	0.00000	0.19475	0.01374	0.00006	0.00000	0.01374	0.00006	0.00000
<i>AKP-1</i> *	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00241	0.00127	0.00000	0.00000	0.00127	0.00000	0.00000
<i>LAP</i> *	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.01658	0.00092	0.28469	0.00000	0.00092	0.28469	0.00000
<i>GPI</i> *	0.22425	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.58990	0.00000	0.00000	0.58990	0.00000
<i>PGM</i> *	0.93634	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.41610	0.00000	0.00000	0.41610	0.00000
<i>IDH</i> *	0.77664	0.50309	0.20642	0.20642	0.78625	0.37626	0.63548	0.60370	0.37626	0.63548	0.60370
<i>EST-2</i> *	0.39099	0.25519	0.03918	0.03918	0.05942	0.01339	0.74836	0.04640	0.01339	0.74836	0.04640
<i>EST-3</i> *	0.12325	0.00016	0.00006	0.00006	0.00391	0.03768	0.27322	0.00000	0.03768	0.27322	0.00000
<i>EST-4</i> *	0.05252	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-----	0.00000	0.00000	-----	0.00000
<i>EST-5</i> *	0.00000	-----	-----	-----	0.00000	0.00000	-----	0.00000	0.00000	-----	0.00000
TOTAL	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

Tabla XV.- Coeficientes de Similitud (abajo) y Distancia Genética (arriba) sin sesgo de Nei (1978) para cada par de muestras de camarón azul (*P. stylirostris*).

	GUAYMAS	PEÑASCO	LINAJE A	LINAJE B
GUAYMAS		0.018	0.015	0.027
PEÑASCO	0.983		0.021	0.021
LINAJE A	0.985	0.979		0.010
LINAJE B	0.973	0.979	0.990	

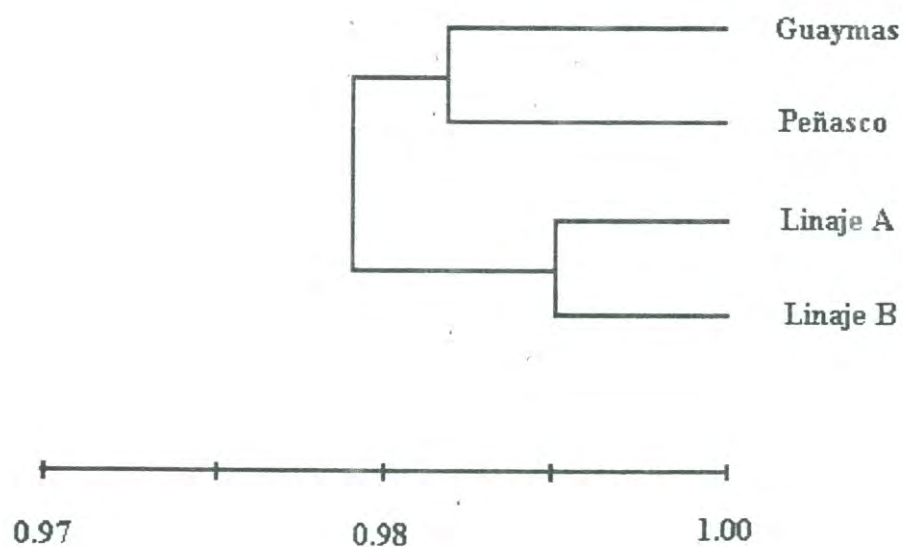


Figura 2.- Dendrograma (algoritmo UPGMA) generado de una matriz de Similitudes genéticas sin sesgo de Nei (1978) entre las localidades de camarón azul (*P. stylirostris*) analizadas en este estudio.

Tabla XVI.- Coeficiente de endogamia para los loci polimórficos del camarón azul (*P. stylirostris*), en las localidades silvestres, los linajes de cultivo y en todas ellas, analizados mediante la prueba Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) para la hipótesis nula  $F_{is}=0$ .

LOCUS	SILVESTRES		LINAJES DE CULTIVO		TODAS	
	$F_{is}$	$\chi^2$	$F_{is}$	$\chi^2$	$F_{is}$	$\chi^2$
<i>GDH*</i>	0.276	7.922++	0.356	11.913+++	0.316	19.771+++
<i>ACP-J*</i>	0.432	38.444+++	0.002	0.000	0.222	19.714+++
<i>AKP-J*</i>	0.516	81.002+++	0.001	0.000	0.258	39.938+++
<i>LAP*</i>	0.327	32.720+++	0.381	42.242+++	0.352	73.971+++
<i>GPI*</i>	----	----	-0.020	0.039	-0.020	0.162
<i>PGM*</i>	0.192	15.335	-0.114	2.495	0.004	0.013
<i>IDH*</i>	0.218	4.705+	0.713	46.770+++	0.480	44.006+++
<i>EST-2*</i>	0.124	3.260	0.723	101.409+++	0.411	68.582+++
<i>EST-3*</i>	0.136	7.842	0.560	88.4352+++	0.355	100.820+++
<i>EST-4*</i>	0.036	0.137	----	----	0.036	0.263
<i>EST-5*</i>	0.066	0.462	----	----	0.066	0.884
TOTAL	0.249	191.829+++	0.322	293.303+++	0.285	368.124+++

+ = 0.01 < P ≤ 0.05.

++ = 0.001 < P ≤ 0.01

+++ = P ≤ 0.001.

Tabla XVII.- Coeficiente de diferenciación genética para los loci polimórficos del camarón azul (*P. stylirostris*), en las localidades silvestres, los linajes de cultivo y en todas ellas, analizados mediante la prueba Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) para la hipótesis nula  $F_{st}=0$ .

LOCUS	SILVESTRES		LINAJES DE CULTIVO		TODAS	
	$F_{st}$	$\chi^2$	$F_{st}$	$\chi^2$	$F_{st}$	$\chi^2$
<i>GDH</i> *	0.003	0.624	0.004	0.752	0.005	1.980
<i>ACP-I</i> *	0.057	23.484+++	0.076	29.488+++	0.091	72.800+++
<i>AKP-I</i> *	0.129	79.722+++	0.131	76.242+++	0.146	175.200+++
<i>LAP</i> *	0.052	31.824+++	0.011	6.402	0.061	72.834+++
<i>GPI</i> *	----	----	0.002	0.388	0.094	76.328+++
<i>PGM</i> *	0.002	1.664	0.001	0.384	0.042	67.200+++
<i>IDH</i> *	0.001	0.198	0.003	0.552	0.007	2.674
<i>EST-2</i> *	0.006	2.544	0.002	0.776	0.024	19.488++
<i>EST-3</i> *	0.011	9.328	0.009	5.076	0.024	38.400+++
<i>EST-4</i> *	0.020	4.240+	----	----	0.265	107.590+++
<i>EST-5</i> *	0.235	49.820+++	----	----	0.315	127.890+++
TOTAL	0.049	203.448+++	0.033	120.06+++	0.078	762.384+++

+ = 0.01 < P ≤ 0.05.

++ = 0.001 < P ≤ 0.01

+++ = P ≤ 0.001.

Tabla XVIII.- Coeficiente de endogamia para los loci polimórficos del camarón azul (*P. stylirostris*), entre localidades silvestre y linajes cultivados, analizados mediante la prueba Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) para la hipótesis nula  $F'_{is}=0$ .

LOCUS	GUAYMAS-LINAJE A		GUAYMAS-LINAJE B		PEÑASCO-LINAJE A		PEÑASCO-LINAJE B	
	<i>F<sub>is</sub></i>	$\chi^2$	<i>F<sub>is</sub></i>	$\chi^2$	<i>F<sub>is</sub></i>	$\chi^2$	<i>F<sub>is</sub></i>	$\chi^2$
<i>GDH</i> *	0.286	8.180++	0.333	11.754+++	0.299	8.225++	0.346	11.732+++
<i>ACP-1</i> *	0.268	14.652+++	0.125	3.281	0.303	17.444+++	0.171	5.731
<i>AKP-1</i> *	0.429	55.764+++	-0.070	1.529	0.501	72.288+++	0.089	2.353
<i>LAP</i> *	0.255	20.093++	0.263	21.996+++	0.435	35.196+++	0.459	40.451+++
<i>GPI</i> *	0.142	2.077	-0.205	4.454+	0.125	3.031	0.182	6.625
<i>PGM</i> *	0.037	0.548	0.062	1.599	-0.044	0.743	0.028	0.314
<i>IDH</i> *	0.490	22.810+++	0.483	24.029+++	0.477	20.022+++	0.471	21.297+++
<i>EST-2</i> *	0.465	44.542+++	0.422	37.754+++	0.400	31.040+++	0.359	25.777+++
<i>EST-3</i> *	0.535	114.490+++	0.285	34.439+++	0.420	66.326+++	0.171	11.696
<i>EST-4</i> *	-0.009	0.008	-0.009	0.009	0.077	0.575	0.077	0.593
<i>EST-5</i> *	----	----	----	----	0.066	0.422	0.066	0.436
TOTAL	0.341	283.164+++	0.221	140.844+++	0.338	255.314+++	0.230	127.003+++

+ = 0.01 < P ≤ 0.05.

++ = 0.001 < P ≤ 0.01

+++ = P ≤ 0.001.

Tabla XIX Coeficiente de diferenciación genética para los loci polimórficos del camarón azul (*P. stylirostris*), entre localidades silvestre y linajes cultivados, analizados mediante la prueba Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) para la hipótesis nula  $F_{st}=0$ .

LOCUS	GUAYMAS-LINAJE A		GUAYMAS-LINAJE B		PEÑASCO-LINAJE A		PEÑASCO-LINAJE B	
	$F_{st}$	$\chi^2$	$F_{st}$	$\chi^2$	$F_{st}$	$\chi^2$	$F_{st}$	$\chi^2$
<i>GDH</i> *	0.001	0.200	0.001	0.212	0.001	0.184	0.008	1.568
<i>ACP-1</i> *	0.022	8.976+	0.172	72.240+++	0.010	3.800	0.036	14.112+++
<i>AKP-1</i> *	0.076	46.056+++	0.204	127.296+++	0.048	27.648+++	0.026	15.444+++
<i>LAP</i> *	0.053	32.754+++	0.055	34.980+++	0.026	9.672++	0.047	18.048+++
<i>GPI</i> *	0.112	23.072+++	0.093	19.716+++	0.093	36.084+++	0.075	30.000+++
<i>PGM</i> *	0.049	39.200+++	0.045	37.440+++	0.037	28.416+++	0.034	27.200+++
<i>IDH</i> *	0.004	0.760	0.013	2.678	0.001	0.176	0.007	1.344
<i>EST-2</i> *	0.010	4.120	0.018	7.632+	0.026	10.088++	0.033	13.200+++
<i>EST-3</i> *	0.035	28.000+++	0.022	18.656+++	0.017	12.784+	0.003	2.400
<i>EST-4</i> *	0.198	40.788+++	0.198	41.976+++	0.307	59.558+++	0.307	61.400+++
<i>EST-5</i> *	----	----	----	----	0.235	45.590+++	0.235	47.000+++
TOTAL	0.045	223.926+++	0.081	362.826+++	0.055	234.000+++	0.058	231.716+++

+ = 0.01 < P ≤ 0.05.

++ = 0.001 < P ≤ 0.01

+++ = P ≤ 0.001.



Tabla XX.- Estadística F promedio y flujo de migrantes por generación ( $N_eM$ ), entre cada par y entre el total de las localidades en estudio del camarón azul (*P. stylirostris*).

LOCALIDADES	<i>F<sub>is</sub></i>	<i>F<sub>it</sub></i>	<i>F<sub>st</sub></i>	$N_eM$
linaje A – linaje B	0.322+++	0.344	0.033+++	7.3
Guaymas – linaje A	0.341+++	0.371	0.045+++	5.3
Guaymas - Peñasco	0.249+++	0.286	0.049+++	4.8
Peñasco – linaje A	0.338+++	0.375	0.055+++	4.3
Peñasco – linaje B	0.230+++	0.275	0.058+++	4.1
Guaymas – linaje B	0.221+++	0.284	0.081+++	2.8
Entre todas	0.285+++	0.341	0.078+++	2.9

+++  $P \leq 0.001$ .

endogamia promedio (0.322), que la presente entre las localidades silvestres (0.249). Por otra parte, en la tabla XX, el valor de  $F_{st}$  entre las localidades silvestres fue de 0.049 equivalente a un flujo génico de 4.8 organismos por generación, mientras que la menor diferenciación y por lo tanto mayor flujo génico se presenta entre los linajes de cultivo (0.033 y 7.3 organismos por generación respectivamente). De los linajes de cultivo, el linaje B es la que presenta mayor divergencia genética con respecto a cualquiera de las localidades silvestres, entre el linaje B y Guaymas la diferenciación genética es de 0.081, y con respecto a Puerto Peñasco la discrepancia es de 0.058 equivalentes a un flujo génico de 2.8 y 4.1 organismos por generación respectivamente. Como se puede observar, los mismos loci que contribuyen a la distribución heterogénea de las frecuencias alélicas entre las localidades (tabla XIII), son los que presentan un  $F_{st}$  significativo (tablas XVII, XIX y XX) esto se debe a que la diferenciación genética se obtiene a partir de la distribución de las frecuencias alélicas.



## V.-DISCUSIÓN

La mayoría de los análisis de diversidad genética se han realizando mediante estudios electroforéticos de la variación de alozimas (Park y Moran, 1994; Grant, *et al.* 1999; Benzie, 2000; Hedgecock y Sly, 1990), midiendo la proporción promedio de loci heterocigotos por individuo ( $H$ ), el porcentaje de loci polimórficos ( $P$ ) y el número promedio de alelos por locus en las poblaciones silvestres y los linajes cautivos; analizando a partir de la distribución de sus frecuencias alélicas la distancia, similitud y diferenciación genética, así como los niveles de endogamia entre las poblaciones.

Para los linajes de cultivo mantenidos en cautiverio por varias generaciones, resulta importante la existencia de las poblaciones silvestres de las cuales fueron extraídos, ya que esto permite analizar los cambios genéticos provocados durante la domesticación (Hedgecock y Sly, 1990) y por la selección de los genotipos inherentes a los caracteres de interés comercial. Los linajes cautivos son reproductivamente aislados y mucho más pequeños que las poblaciones silvestres. Este aislamiento proporciona el potencial para la domesticación y el mejoramiento genético, pero también abre las posibilidades para el deterioro genético a través de la reducción del tamaño efectivo poblacional, deriva génica y de la endogamia, de tal manera que la divergencia de linajes aisladas de sus progenitores silvestres se recrudece con el paso del tiempo (Hedgecock y Sly, 1990).

En linajes cautivos de organismos marinos se ha encontrado una disminución significativa de la heterocigosis (Sbordoni *et al.* 1986, 1987; Harris *et al.* 1990; Bouza, *et al.* 1997; Agnese *et al.* 1995; Iguchi *et al.* 1999; Shikano *et al.* 2000), y esta disminución ha sido correlacionada con una reducción en su desempeño (Sbordoni *et al.* 1987; Agnese *et al.* 1995; Shikano *et al.* 2000). Sin embargo, en otros estudios no fueron observadas diferencias significativas entre poblaciones silvestres y las cultivadas (Laubier, *et al.* 1984; Sunden y Davis, 1991 Hedgecock y Sly, 1990; English *et al.* 2000). El polimorfismo ( $P$ ) y el número promedio de alelos por locus son las otras medidas comunes de diversidad genética que frecuentemente han demostrado diferencias entre poblaciones silvestres y cultivadas de organismos acuáticos, pero estas diferencias rara vez han sido significantes (Laubier, *et al.*

1984; Hedgecock y Sly, 1990), como en el caso de Hedgecock y Sly (1990), quienes encontraron diferencias significativas en el número promedio de alelos entre un linaje cultivado de ostión del Pacífico y la población silvestre de donde fue aislada. En nuestro estudio, a pesar de la superioridad evidente de Puerto Peñasco en polimorfismo y heterocigosis, la disminución de esta última en el linaje A y el número de alelos promedio por locus menor en los dos linajes, solo se observaron diferencias significativas en la heterocigosis promedio esperada entre los linajes y entre la heterocigosis promedio esperada y observada en las muestras de Guaymas, Puerto Peñasco y Linaje A.

El rango de heterocigosis obtenido en este estudio (0.088-0.129), está dentro del rango (0.004-0.128) reportado por Nelson y Hedgecock (1980) para organismos decápodos, sin embargo es mayor que los reportados para otras especies de *Penaeus* (0.007-0.049, 0.006-0.033 y 0.006-0.089, de acuerdo a Tam y Chu (1993), Mulley y Latter (1981) y Benzie (2000), respectivamente). Por otro lado, el rango que se reporta en este estudio coincide en cierto modo con el rango (0.000-0.103) para las cinco especies silvestres de *Penaeus* que dominan la producción acuícola y con los estudios disponibles de linajes de cultivo (0.011-0.118) que reporta Benzie (2000). En general, los niveles de heterocigosis son extremadamente bajos en la mayoría de las especies de *Penaeus*, las mayores heterocigosis reportadas han sido para *P. japonicus* (0.118) en De Matthaëis *et al.* (1983) y *P. aztecus* (0.091) en Lester (1979), así como el rango reportado para *P. monodon* (0.083-0.115) en el suroeste del Océano Índico (Forbes *et al.* 1999). Estos valores son los que más se acercan a los obtenidos en este estudio de variabilidad genética en *P. stylirostris*. Además, al comparar con estudios particulares de ésta y otras especies de peneidos, nuestra estimación de la heterocigosis es mayor: Rosa-Vélez *et al.* (2000) reportaron valores entre 0.023-0.037 para *P. californiensis*; Lester (1979) reportó 0.085 para *P. dourarum* y 0.071 para *P. setiferus*; para *P. kerathurus* De Matthaëis *et al.* (1983) obtuvieron un valor de 0.049 y Mattoccia *et al.* (1987) de 0.064; Rosa-Vélez *et al.* (1999) reportan 0.079 para *P. brevirostris*; Lester (1983) reportó 0.02 y García *et al.* (1994) reportaron 0.018-0.064 para *P. vannamei*. Con referencia a otros estudios sobre *P. stylirostris*, Lester (1983) reportó una heterocigosis de 0.06 para una localidad cercana a Guaymas, Sonora, y Rosa-Vélez *et al.* (2000) reportaron valores de 0.038, 0.067 y 0.086 para la parte alta, media y baja del Golfo de California, respectivamente.

Con respecto al polimorfismo, en nuestro estudio la población de camarón azul de Puerto Peñasco fue la más polimórfica con 32.3% contra 29.0% del resto de las localidades. Rosa-Vélez *et al.* (2000) reportó un rango de 15.63%-31.25% para *P. stylirostris* del Golfo de California, donde el valor inferior correspondió a la localidad representante de la parte alta del Golfo y coincidiendo de alguna manera con este estudio y el de Lester (1983), quien estimó 25% de loci polimórficos para una población cercana a Guaymas de la misma especie. El polimorfismo así como el número promedio de alelos por locus obtenidos en nuestro estudio concuerdan también con el rango (2.2%-33.3% y 1.06-1.56, respectivamente) reportado para todas las especies silvestres de peneidos, para el registrado en las cinco especies de *Penaeus* que dominan la producción acuícola (11.8%-29.5% y 1.12-1.99, respectivamente) y para el obtenido (0.0%-50% y 1.15-1.40, respectivamente) en los estudios disponibles de linajes cultivados (Benzie, 2000).

Sunden y Davis (1991) reportan que un linaje de *P. vannamei* en el cual un gran número de machos y hembras de diferentes estanques eran utilizados como reproductores en cada generación, presentaba relativamente poca pérdida de variación genética. Ellos sugieren que el manejo en la selección de los reproductores para la siguiente generación y el utilizar ciclos semi-cerrados, era suficiente para prevenir la pérdida de variabilidad genética y la consecuente depresión endogámica debido a la deriva génica. Sin embargo, Hedgecock y Sly (1990) señalan que tales conclusiones pueden ser prematuras, porque las medidas de diversidad genética, particularmente la heterocigosis, pueden ser insensibles a los cambios genéticos que pueden ocurrir en linajes en cautiverio por varias generaciones, después de ser aisladas del medio silvestre o después de un “cuello de botella” genético.

Las poblaciones que han experimentado una reducción reciente de su tamaño efectivo poblacional, presentan una correlativa reducción en el número de alelos y en la heterocigosis de sus loci polimórficos, sin embargo la pérdida de diversidad alélica resulta más notable que los cambios en la heterocigosis después de un “cuello de botella” genético (Allendorf y Ryman, 1987; Hedgecock y Sly, 1990; Piry<sup>4</sup> *et al.* 1999; English *et al.* 2000), ya que la heterocigosis en un locus es afectado tanto por el número de alelos como por las frecuencias alélicas, y un deterioro de la heterocigosis, propiciada por la pérdida de alelos al presentarse una reducción en el tamaño efectivo poblacional, puede ser compensada por el incremento de

las frecuencias de los alelos restantes. Esto concuerda con la escasa pérdida de variabilidad detectada en los linajes de cultivo analizados en este estudio, medida como heterocigosis, polimorfismo o número promedio de alelos por locus. Esto se debe principalmente al polimorfismo de *ACP-1\**, *GPI\**, *AKP-1\** y *PGM\**. A pesar de la pérdida de alelos de los dos últimos, hay una mayor proporción de heterocigotos presentes en estos loci, heterocigotos que quizás tengan estrecha relación con los caracteres de interés comercial o con la resistencia a las condiciones de cultivo de estos linajes. Sin embargo, a pesar del comportamiento de estos cuatro loci, los linajes A y B no presentaron mayor variabilidad genética que las poblaciones silvestres, en cuanto a heterocigosis y al número promedio de alelos por locus. Por esto, la pérdida de alelos puede ser una medida más útil, para detectar cómo está siendo resguardada la variabilidad genética en un linaje cautivo (Hedgecock y Sly, 1990), ya que una de las causas principales de la endogamia es la pérdida de alelos de baja frecuencia (Allendorf y Ryman, 1987; English *et al.* 2000). Los alelos raros o de baja frecuencia (frecuencias < 0.05) son componentes importantes de variabilidad, que pueden permitir a las especies responder adecuadamente a futuras presiones evolutivas, aunque su contribución a la heterocigosis o al porcentaje de loci polimórficos puede ser pequeña (Chambers y Bayless 1983).

Sunden y Davis (1991) reportan doce alelos perdidos para una cepa cautiva de *P. vannamei* con respecto a tres poblaciones silvestres distantes entre sí. Saavedra y Guerra (1996) también encontraron alelos de baja frecuencia en una población silvestre de *Ostrea edulis*, ausentes en el linaje de cultivo. García *et al.* (1994) y Alcivar-Warren *et al.* (1994), reportan en *P. vannamei* cinco alelos en un linaje libre de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés) del Anuenue Fisheries Research Center (AFRC) originada de un linaje cautivo de Ecuador, que no se encontraron en dos familias SPF del Instituto Oceánico, originadas de postlarvas producidas por al menos tres desoves de diferentes hembras en una naupliera de Sinaloa, México. Los linajes cautivos en nuestro estudio muestran la ausencia de siete alelos en el linaje A y nueve en el B contra tres de Guaymas y dos de Puerto Peñasco (tabla V). Sin embargo en el caso del alelo *LAP\*114* de Guaymas y los alelos *GPI\*64* y *EST-5\*88* de Puerto Peñasco presentes solo en esas localidades, no podemos catalogarlos como alelos perdidos en los linajes cultivados, ya que es muy probable que su presencia se deba a cuestiones de adaptaciones locales de cada población silvestre, lo mismo que el alelo *GPI\*136*

presente solo en los linajes cultivados y que sin duda se encuentran en las poblaciones silvestres que originaron estos linajes. Aun así es evidente la pérdida de diversidad alélica de los linajes cautivos analizados. La deriva génica es la probable responsable de la reducción de la variación genética en los linajes cultivados debido a “cuellos de botella” y al “efecto fundador”, además de que las condiciones de cultivo a través de la selección puede causar la pérdida de la variación genética (Iguchi *et al.* 1999).

La deficiencia de heterocigotos y el desequilibrio genotípico (por ligamiento) en poblaciones silvestres, señalan que la mezcla de varias subpoblaciones que difieren en sus frecuencias alélicas conforman la población en la localidad (Efecto de Wahlund) (Allendorf y Phelps, 1981; Ward y Grewe, 1994; Chakraborty y Leimar, 1988), este podría ser el caso de la población de *P. stylirostris* de Guaymas que muestra deficiencia de heterocigotos en ocho de sus nueve loci polimórficos (Tabla X) y desequilibrio genotípico en cinco pares de estos loci (tabla XI). En esta localidad, el efecto de Wahlund podría ser provocado por una selección diferencial en las diversas lagunas costeras en las que habita en las etapas juveniles *P. stylirostris*, dándose una recombinación de sus genes al trasladarse a aguas oceánicas durante la etapa reproductiva, produciendo una deficiencia de heterocigotos por razones estadísticas de combinación de frecuencias génicas distintas. En Puerto Peñasco solo dos pares de loci presentan desequilibrio genotípico (tabla XI), sin embargo también existe deficiencias de heterocigotos en todos sus loci polimórficos (tabla X) que podría tener la misma explicación que en la otra localidad silvestre, debido a las condiciones especiales de la zona donde esta ubicada esta localidad (Aubert y Lightner, 2000).

Por otra parte, el desequilibrio genotípico entre pares de loci, también puede ser indicio de una reducción en el tamaño efectivo poblacional (Saavedra y Guerra, 1996; Gaffney *et al.* 1996; Van Doornik y Winans, 1998), muy común en linajes de cultivo con un manejo inadecuado del número de reproductores efectivos en cada generación. Con respecto al exceso de heterocigotos, Saavedra y Guerra (1996) mencionan que en una población diploide finita, son diferentes las frecuencias génicas entre los sexos y que el tamaño efectivo poblacional es

inversamente proporcional a la diferencia promedio en las frecuencias génicas entre los sexos, por lo que un tamaño efectivo poblacional pequeño dará lugar a un exceso de heterocigotos en la progenie (Gaffney *et al.* 1996), además de un pseudo-desequilibrio por ligamiento producido por la recombinación de gametos (Van Doornik y Winans, 1998).

Los linajes de cultivo en este estudio fueron los que presentaron exceso de heterocigotos, el linaje A solo en el locus *PGM\** y el linaje B en los loci *ACP-1\**, *AKP-1\**, *GPI\** y *PGM\** (tabla X), además de que el primero presenta desequilibrio genotípico en nueve de sus pares de loci polimórficos y el segundo en siete de éstos (tabla XI). La disminución de los tamaños efectivos poblacionales en los linajes de cultivo, de los cuales ya se tenía indicios por el exceso de heterocigotos en algunos loci, sumado al desequilibrio genotípico de varios de los posibles pares de loci polimórficos, fue corroborado al encontrarse un exceso de diversidad genética significativo ( $H_e > H_{eq}$ ) y la presencia de distorsiones de la distribución de las frecuencias alélicas (figura 1) con respecto a la distribución esperada para una población estable. Este mismo comportamiento fue presentado por la población de Puerto Peñasco.

Los organismos de la muestra de la población de Puerto Peñasco formaban parte del 15% de los sobrevivientes de un lote de reproductores silvestres que se habían mantenido en cautiverio por varios meses. Debido a esto, la reducción del tamaño efectivo poblacional reciente detectado mediante la prueba de Wilcoxon para el equilibrio, conforme a los tres modelos de mutación y con el descriptor cualitativo gráfico, no se puede hacer extensivo a la localidad silvestre de donde fueron extraídos, ya que es muy probable que este “cuello de botella” genético esté indicando la selección diferencial debido al proceso de domesticación (Doyle y Hunte, 1981). Esta selección diferencial provoca la sobrevivencia de organismos con las características genéticas (frecuencias o combinaciones alélicas) más adaptables a las condiciones de cautiverio, produciendo cambios que pueden estar influyendo en la heterocigosis promedio observada y sobre todo en la esperada que podrían haber dado lugar a la deficiencia de heterocigotos en los loci polimórficos en la población de Puerto Peñasco. Cabe recordar que las poblaciones silvestres registraron el menor número de loci en desequilibrio según las expectativas de Hardy-Weinberg (tabla VII), y que en Puerto Peñasco solo se detectó un par de loci con desequilibrio genotípico (*AKP-1\*/PGM\**), además de *ACP-1\*/AKP-1\** que mostró desequilibrio en todas las muestras (tabla XI). En cuanto a variabilidad





genética, la muestra de Puerto Peñasco presenta más loci polimórficos y mayor heterocigosis promedio que el resto de las muestras, lo cual habla del gran potencial de domesticación (Doyle y Hunte, 1981) que tiene esa población.

Una explicación factible de la deficiencia de heterocigotos en el linaje A, que maneja un supuesto número de generaciones mucho mayor que el linaje B, es que nuestra muestra provenga en realidad de una mezcla de linajes o que no se trate de un linaje reproductivamente aislado por completo. Esto podría significar que en forma periódica se esté enriqueciendo su pool genético con reproductores silvestres de distinto historial genético, práctica muy común en otras especies marinas cautivas, originando una combinación de diferentes frecuencias alélicas en cada loci polimórfico dando lugar a que se produzca el efecto de Wahlund. En el linaje que se mantenía cautivo en la UEP (desaparecido por epidemia viral) se introducían reproductores silvestres cada vez que observaban disminución del desempeño general de los reproductores cautivos (Aguirre-Hinojosa, com. Pers.<sup>2</sup>). Con esto se evitaba una depresión endogámica provocada por tamaños efectivos poblacionales pequeños.

Otro de los motivos de la deficiencia de heterocigotos es que esté actuando la selección en contra de ellos. Mulley y Latter (1980) señalan que la deficiencia de heterocigotos puede ser una estrategia adaptativa de las especies a las condiciones variables del medio ambiente a nivel mundial. En este estudio, *AKP-1\**, *ACP-1\** y *LAP\**, loci de sustratos variables, son los que presentaron mayor deficiencia de heterocigotos en las poblaciones silvestres, lo que podría apoyar esta teoría. Si este fuera el caso, sería la selección natural la que favorecería genotipos que conducen hacia una disminución en la heterocigosis, lo cual lleva a un empobrecimiento de la variabilidad genética de la población. Por otra parte, la endogamia así como la presencia de alelos nulos podrían explicar la heterocigosis reducida, ya que en las cuatro muestras el Índice de fijación (*F*) fue significativo aunque mucho más en los linajes cultivados que en las poblaciones silvestres. Descartamos la posibilidad que esto se deba a alelos nulos ya que se necesitaría de una alta tasa mutacional y una selección muy pronunciada a favor de heterocigotos nulos para mantenerlos en frecuencias moderadas en la mayoría de los loci polimórficos en las cuatro localidades (Maqueda-Cornejo, 1990).

Una última causa de esta deficiencia podría ser de índole técnico. Sin embargo, se eliminaron los sistemas G6PDH y ODH, además de los loci *XDH-1\**, *EST-1\**, *AAT-2\** e *IDH-2\**, que presentaron tinciones difusas y solo se tomaron en cuenta los loci que lograron revelarse en el total de las muestras. Como se puede observar por el número de organismos (N) en los cuales se logró revelar cada locus (tabla V) y el tamaño de muestra por población (tabla III), fueron muy pocos los especímenes en los que no se detectó actividad enzimática en cada locus examinado. El manejo de las muestras desde la captura de los organismos hasta la obtención de los extractos proteicos, el tiempo de almacenamiento, los continuos procesos de descongelación-congelación y en algunas proteínas, el tiempo de electroforesis aun en temperaturas de refrigeración (como GAPDH), pueden provocar que vayan perdiendo actividad. Esto último se aplica a enzimas como AAT, ACP, AKP, LAP y EST, que además requieren para su visualización de sales diazonio (sal rápida negra K y azul rápido BB, entre otros) que pueden funcionar como inhibidores de las reacciones enzimáticas, empobreciendo la calidad del revelado (Harris y Hopkinson, 1978). Estas enzimas son codificadas por lo general por varios genes en los que es muy común el polimorfismo, por lo que se trató de evitar en lo más posible el descartar organismos que presentaran una inactividad aparente, lo cual se logró al hacer una post-unión como la recomendada para AAT, con un tiempo de incubación variada (de 15 minutos hasta una hora), que dependía de la actividad de las enzimas en cada muestra (apéndice IV). Después de la incubación y de realizar la postunión, la visualización de las bandas coloridas se produjeron en unos cuantos minutos con una resolución adecuada en la mayoría de los organismos. Debido a las ligeras diferencias en el avance electroforético entre alelos, a los loci multialélicos (mas de dos alelos) como *ACP-1\**, *AKP-1\**, *PGM\**, *LAP\**, *EST-2\** y *EST-3\** y a los loci que fueron polimórficos solo en algunas muestras como *EST-4\** y *EST-5\** les fue necesario aplicar dos o más separaciones electroforéticas para asignar el valor relativo a cada alelo. Para esto se utilizaron organismos heterocigotos, por lo general para el alelo más común seleccionados en una primera electroforesis, que tuvieron la función de “marcas”, intercalándolas cada cuatro o cinco organismos de la muestra a separar, favoreciendo de esta manera el discernir mejor entre homocigotos y los diferentes heterocigotos.

La alta heterogeneidad de las frecuencias alélicas o genotípicas, puede reflejar adaptaciones genéticas a condiciones ambientales específicas, aislamiento prolongado de las poblaciones o posibilidad repetida de extinción y eventos de recolonización por pequeñas poblaciones fundadoras (Fetzner *et al.* 1997). Las localidades en estudio muestran heterogeneidad significativa en la distribución de las frecuencias alélicas, a pesar de que las dos localidades silvestres y los dos linajes de cultivo por lo general comparten el alelo 100 como el más común, con excepción de los alelos *ACP-1\*111* y *AKP-1\*114* que resultaron ser los de mayor frecuencia en Puerto Peñasco y el linaje B. Esto difiere con el estudio realizado por Rosa-Vélez *et al.* (2000) en tres localidades del Golfo de California, quienes reportan que siete de sus 12 loci polimórficos alternaban el alelo más común. De igual manera, cada locus que presentó polimorfismo en una localidad se mostró variable en el resto de las muestras (tabla V) a excepción de *GPI\** (monomórfico para las localidades silvestres), *EST-4\** (monomórfico para los linajes de cultivo) y *EST-5\** (solo polimórfico en Puerto Peñasco) resultando este último la única diferencia (en cuanto a loci variable) entre las localidades silvestres.

El locus *GPI\** en Puerto Peñasco exhibe un alelo de menor avance electroforético que el alelo *GPI\*100* y al alelo alterno *GPI\*136* presente en las Líneas A y B. El alelo *GPI\*64* es catalogado como alelo raro por su frecuencia menor de 0.05. Lester (1983) también reportó dos alelos diferentes a *GPI\*100*, ambos con frecuencias muy bajas (0.01), solo que el de mayor avance anodal (F) lo registró en México en una localidad cercana a Guaymas y el de menor avance (S) (que podría ser el *GPI\*64* del presente estudio), en una localidad de Ecuador. En este estudio y en el de Maqueda-Cornejo (1990) *GPI\** es monomórfico al 100% en Guaymas, aunque es tan pequeña la frecuencia del alelo alterno reportado por Lester (1983) en la población de *P. stylirostris* cercana a esta localidad, que podría ser que por azar no se hubiera elegido durante los muestreos. Una evidencia de esto puede ser el alelo *GPI\*64* de la población de Puerto Peñasco, no olvidando las diferencias de tiempo que separan estos estudios, en el cual podría haberse fijado el alelo de mayor frecuencia en Guaymas.

Los niveles de diferenciación genética encontrados en *P. stylirostris* del Golfo de California en Rosa-Vélez *et al.* (2000), Aubert y Lightner, (1999) y en este estudio, difieren de la suposición de que la mayoría de las especies de peneidos están pobremente estructuradas y son generalmente panmíticas en el medio silvestre (Lester, 1979, 1983; Mulley y Latter, 1980; Sunden y Davis, 1991; Lester y Pante, 1992). Se observó una diferenciación genética ( $F_{st}$ ) con un rango de 0.045-0.081 entre pares de muestras, donde el 7.8% de la diversidad total observada entre las cuatro muestras, el 4.9% y el 3.3% de la diversidad efectiva entre las poblaciones silvestres y entre los linajes cultivados respectivamente, se debe a diferencias genéticas. Rosa-Vélez *et al.* (2000) reporta un  $F_{st}=0.372$  para tres localidades de *P. stylirostris* del Golfo de California, y Aubert y Lightner (1999) reportan que el 15% de la diversidad genética observada con la técnica de PCR-RAPD se debe a diferencias entre las seis poblaciones estudiadas de *P. stylirostris* de la misma región. Es importante mencionar que estos autores reportan que existen diferencias genéticas significativas entre las muestras provenientes del Alto Golfo y Guaymas, concordando sus resultados con los nuestros. Sin embargo la diferenciación entre siete poblaciones de *P. monodon* en Australia ( $F_{st}=0.0311$ ) en Benzie *et al.* (1992), está por debajo del rango en este estudio, lo mismo que el rango (0.0000-0.0089) para tres poblaciones y un linaje cultivado de *P. vannamei* en Sunden y Davis (1990). Mattoccia *et al.* (1987) encontraron un  $F_{st}$  promedio de 0.04 en cuatro poblaciones de *P. kerathurus* en el Mar Mediterráneo. Por otro lado, Forbes *et al.* (1999) no encontraron estructuración genética entre cinco localidades de *P. monodon* en el suroeste del Océano Índico.

Si los linajes de cultivo analizados fueron aislados completamente desde la extracción de los reproductores parentales del medio silvestre, entonces el marcado polimorfismo de  $GPI^*$  en los linajes de cultivo con la presencia de un alelo alterno de frecuencia alta, no detectado en las localidades silvestres, indica que posiblemente estos organismos provienen de una o varias poblaciones silvestres diferentes a las analizadas en este estudio. Otra probabilidad es que por azar se capturaron reproductores con el alelo  $GPI^*136$  que podría estar en baja frecuencia en el medio silvestre, y que por los procesos de domesticación y mejoramiento selectivo ha aumentando su frecuencia. También hay indicios de que el linaje B fue originado a partir de A.

Varias son las evidencias que nos indican el estrecho parentesco entre los dos linajes de cultivo analizados, mayor aún que el existente entre las dos poblaciones silvestres: a) los niveles de endogamia (tabla XVI) que señalan mayores índices de fijación de individuos relacionados entre los linajes A y B ( $F_{is}=0.322$ ) que los que se presentan entre las localidades silvestres ( $F_{is}=0.249$ ); b) mayor similitud genética entre los linajes (tabla XV); c) el agrupamiento independiente de los mismos con respecto a las localidades silvestres (figura 2); d) la menor diferenciación genética entre estos linajes ( $F_{st}=0.033$ ) con respecto a cualquier combinación de localidades; e) el correspondiente flujo génico de 7.3 migrantes por generación (tabla XX), lo cual no significa un intercambio de gametos entre los linajes sino un tiempo de aislamiento muy corto. Además, el hecho de que B manifiesta la ausencia de los alelos *AKP-1\* 97* y *PGM\*90*, presentes en el linaje A y de que ambos linajes carecen de los alelos *PGM\*105*, *PGM\*80*, *LAP\*115*, *GPI\* 64*, *EST-3\*94*, *EST-4\*109* y *EST-5\*88*, apoya la posibilidad de que el linaje B no se haya iniciado a partir de organismos silvestres sino a partir de un número limitado de organismos muy relacionados con el linaje A. El marcado desequilibrio del linaje B, de acuerdo a los modelos de mutación-deriva génica, probablemente fue provocado por un “efecto fundador” o uno o varios “cuellos de botella”, reforzando lo anteriormente expuesto.

El tamaño de muestra tanto de organismos (tabla III), como de loci (tabla I) analizados en este estudio, están dentro del rango reportado para la mayoría de los estudios poblacionales de organismos silvestres (20-60 organismos por población y de 15-35 loci) y cultivados (15-50 organismos por población y de 20-31 loci) (Benzie, 2000). Por esto, las discrepancias en la variabilidad genética en nuestro estudio, con respecto a otros realizados para *P. stylirostris* (Lester, 1983; Rosa-Vélez *et al.* 2000) y con otras especies de *Penaeus*, pueden reflejar diferencias reales entre las localidades o especies, o ser producto del análisis de loci distintos o condiciones electroforéticas desiguales. En el caso más particular del estudio de Rosa-Vélez *et al.* (2000), las discordancias pueden deberse a diferencias en las condiciones electroforéticas y de revelado, ya que en nuestro estudio los tamaños de muestra revelados fueron más homogéneos y registramos polimorfismo en los loci *IDH\** y *GDH\**.

## VI.- CONCLUSIÓN

Utilizando la electroforesis de proteínas en conjunto con las herramientas estadísticas proporcionadas por los programas Biosys-1, Genepop y Bottleneck, se estimó la variabilidad genética de *P. stylirostris*, presente en dos poblaciones silvestres del Golfo de California y dos linajes cultivados en la región, y se detectó su diferenciación genética y las discrepancias inherentes a la condición de cada una de las muestras: organismos de Guaymas extraídos directamente del medio silvestre, organismos silvestres de Puerto Peñasco en proceso de domesticación y dos linajes cultivados “independientes”.

No hubo diferencias significativas de heterocigosis observada y del porcentaje de loci polimórficos entre las cuatro muestras. Solo se observaron diferencias significativas en la heterocigosis promedio esperada entre los linajes y entre la heterocigosis promedio esperada y observada en las muestras de Guaymas, Puerto Peñasco y Linaje A. Los linajes cultivados presentaron menor diversidad genética debido principalmente a la pérdida de alelos.

Basados en las comparaciones de los valores de *Fst*, así como en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas entre las localidades, los linajes de cultivo fueron significativamente diferentes de las dos poblaciones silvestres, diferencias que se ven tácitamente por el agrupamiento generados a partir de las correlaciones fenéticas de las Similitudes entre las poblaciones. Además, el polimorfismo de *GPI\** con un alelo alterno de alta frecuencia no detectado en las poblaciones silvestres, sugiere que los linajes de cultivo provienen de una o varias poblaciones diferentes a las analizadas en este estudio.

Las poblaciones silvestres también se encontraron significativamente diferenciadas entre si, siendo los loci *ACP-1\**, *AKP-1\**, *LAP\**, *EST-4\** y *EST-5\**, los que contribuyeron a esa diferenciación. Contrario a lo esperado entre dos linajes cultivados, aislados reproductivamente de diferentes poblaciones silvestres, con diferencias grandes en el número de generaciones en cautiverio, con posibles estrategias de manejo y ambientes diferentes, sobre las que la deriva génica ha actuado aleatoriamente, los linajes de cultivo analizados en este estudio no mostraron diferencias significativa en la mayoría de sus loci polimórficos.

Solo los loci *ACP-1\** y *AKP-1\** contribuyeron a la diferencia entre ellos. Lo anterior, aunado a que el linaje B presentó menos genotipos por locus y, a que se encuentra más diferenciado con respecto a las localidades silvestres, insinuando con esto una mayor pérdida genética, sugiere que este linaje fue generado a partir del linaje A y que las diferencias en los loci *AKP-1\** y *ACP-1\** se deben principalmente a la deriva génica, “cuellos de botella” genéticos y a un efecto fundador.

Un aspecto fundamental para la camaronicultura es la localización de poblaciones silvestres con un pool genético vasto y con gran potencial de domesticación. Evaluar el potencial genético para la domesticación de las poblaciones silvestres candidatas, debe ser parte de la planeación del desarrollo de linajes cultivados. Con esto se evita hacer la elección inapropiada de poblaciones en las cuales la sobrepesca o catástrofes naturales hayan ocasionado una seria reducción de su pool genético (Nelson, 1977). Lo anterior no solo es importante al generar un linaje cautivo, sino también para refrescar en forma periódica el acervo genético con el fin de conservar la calidad en los linajes cautivos y así garantizar la estabilidad de la calidad del producto y las predicciones de la producción (Rodríguez-Romero y Gasca-Montes, 1999).

Ambos linajes de cultivo presentaron “cuellos de botella” genéticos provocados por reducciones en sus tamaños efectivos poblacionales al igual que la muestra proveniente de la población de Puerto Peñasco. A pesar de esto, la población silvestre de Puerto Peñasco demuestra un gran potencial genético de domesticación avalado sobre todo por la conservación de su diversidad alélica y por el mayor polimorfismo. Esta población, al igual que la de Guaymas, sostiene la suficiente riqueza genética como para ser considerada base para la fundación de linajes de cultivo comerciales, que puedan ser utilizados principalmente en esta misma zona del noroeste de México. Con esto se evita la introducción de genomas no adaptativos o provenientes de localidades de menor variación genética, misma que se vería reducida aun más por el manejo inadecuado generación tras generación.

Para conservar la diversidad genética de las poblaciones silvestres, los linajes de cultivo deberán de representarlas genéticamente lo más posible (Iguchi *et al.* 1999). Sin embargo, es imposible mantener la composición genética de un stock en cautiverio ya que cambiará genéticamente a través de cruzas selectivas y deberá tenerse considerable cuidado en prevenir las interacciones entre los organismos cultivados y las poblaciones silvestres con las

que podrían tener contacto (Allendorf *et al.* 1987). Además de los cambios genéticos que puedan ser logrados, la restricción del número de progenitores que están inherentes a un programa de cruza selectivas, inevitablemente tendrá como consecuencia la pérdida de variabilidad genética (Allendorf, *et al.* 1987; Iguchi *et al.* 1999). Debido a la gran expansión que está teniendo la camaricultura en el Noroeste de México y, aunque aun no se tengan evidencias de interacciones entre organismos silvestres y originados de linajes cultivados en especies de *Penaeus*, es importante monitorear y evitar esta posibilidad debido a la gran diversidad genética y estructuración poblacional de *P. stylirostris* en el Golfo de California.

Se considera que los resultados de este estudio de genética poblacional en *P. stylirostris* del Golfo de California y en dos linajes cautivos de la misma especie, no solo son importantes para cuestiones acuaculturales sino también para apoyar estrategias de manejo de las pesquerías, ya que hasta el momento se ha manejado a este recurso como una sola población.



## VII.- RECOMENDACIONES

1. Utilizar organismos de poblaciones endémicas cercanas a las regiones acuaculturales, como iniciadores de sistemas de crianza selectiva, para evitar en lo más posible problemas de adaptaciones climáticas y afectar la variabilidad genética de las poblaciones silvestres locales.
2. Tener cuidado en elegir la población con las mejores características genéticas y un número grande de reproductores fundadores para que estos representen en lo más posible a la población de donde fueron extraídos y que se conserven estas características.
3. Evaluar el potencial de domesticación de la población o poblaciones elegidas como fuente de reproductores y llevar a cabo periodos de cuarentena para asegurar la salud patológica de los organismos cuando se pretenda enriquecer al linaje cautivo.
4. Mantener un tamaño poblacional lo suficientemente grande para minimizar los efectos de la deriva génica ya que incluso una severa disminución del tamaño efectivo poblacional puede provocar los efectos severos de una depresión endogámica en los organismos cultivados.
5. Existe necesidad de monitorear todas los linajes cautivos periódicamente con el fin de evaluar su comportamiento genético en el transcurso de las generaciones, así como las poblaciones cercanas a las áreas acuaculturales donde organismos cultivados liberados puedan interactuar con poblaciones silvestres, mediante técnicas estandarizadas, como la electroforesis de alozimas, para tener resultados comparables.

## VIII.- LITERATURA CITADA

- Abreu-Grobois, A. 1983. Population Genetics of Artemia. Tesis doctoral, University College of Swansea, England.
- Aebersold, P.B. G.A. Winans, D.J. Teel, G.B. Miner y F.M. Utter. 1987. Manual for starch gel electrophoresis: A method for the detection of genetic variation. NOAA Tech. Rept. NMFS 61.
- Agnese, J-F. J.O. Ziriga y S. Gilles. 1995. Effects of domestication on genetic variability, fertility, survival and growth rate in a tropical Siluriform: *Heterobranchus longifilis*. Valenciennes 1840. Aquaculture 131(3-4):197-204.
- Alcivar-Warren, A., D.K. García, M.A. Faggart y C. Rich. 1994. Evaluation of genetic diversity of *Penaeus vannamei* shrimp using molecular genetic techniques. USMSFP 10<sup>th</sup> Anniversary Review, GCRL. Special Publication, 1:27-34.
- Allendorf, F.W. 1983. Isolation, gene flow, and genetic differentiation among population. pp: 51-65. En: Stonewald-Cox, C.M. S.M. Chambers, B. MacBryde y W.L. Thomas (Eds.). Genetic and Conservation. The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc. London.
- Allendorf, F.W. y F.M. Utter 1979. Population Genetics. pp:407-454. En: Hoar, W.S. D.J. Randall y J.R. Brett. (Eds.), Fish Biology Vol. VIII Academic Press, Inc. New York.
- Allendorf, F.W. y R. F. Leary. 1986. Heterozygosity and fitness in natural population of animals. pp:57-76. En: Soule, M. E. (Ed.), Conservation Biology. The Science of Scarcity and Diversity. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Allendorf, F.W. y N. Ryman. 1987. Genetic management of hatchery stocks. pp:121-140. En: Ryman, N. y F. Utter (Eds.), Population Genetics and Fishery Management. Washington Sea Grant program, University of Washington Press Seattle and London.
- Allendorf, F.W., N. Ryman y F.M. Utter. 1987. Genetics and fishery management. Past, present and future. pp:1-19. En: Ryman, N. y F. Utter (Eds.), Population Genetics and Fishery Management. Washington Sea Grant program, University of Washington Press Seattle and London.
- Allendorf, F.W. y M.M. Ferguson. 1990. Genetics. pp:35-63. En: Schreck, C.B. y P.B. Moyle. (Eds.), Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, U.S.A.

- Allendorf, F.W. y S.R. Phelps. 1981. Isozymes and the preservation of genetic variation in salmonid fishes. pp:37-52. En: Ryman, N. (Ed.), Fish Gene Pools. Ecology Bulletin 34 (Stockholm).
- Alvarez, J. A. 1987a. Genética y acuicultura. pp:1-31. En: Espinosa de los Monteros, J. y U. Labarta (Eds.), Genética en Acuicultura. Industrias Gráficas España, S. L., Madrid.
- Alvarez, J. A. 1987b. Marcadores genéticos en acuicultura. pp:179-213. En: Espinosa de los Monteros, J. y U. Labarta (Eds), Genética en Acuicultura. Industrias Gráficas España, S. L., Madrid.
- Apostolidis, A.P., C. Triantaphyllidis, A. Kouvatsi y P.S. Economidis. 1997. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brown trout) populations. Molecular Ecology, 6:531-542.
- Aquacop. 1979. Penaeid reared brood stock: Closing cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. Proc. World Maricul. Soc., 10:445-452.
- Aragón-Noriega, E.A. 2000. Investigación regional: Desarrollo histórico de la camaronicultura en el noroeste de México. Pesca y Conservación, 13(4):5-7.
- Argue, B.J. y A. Alcivar-Warren. 1999. Genetics and breeding applied to the Penaeid farming industry. World Aquaculture Society Meeting, 26 de abril-2 de mayo, Sidney, Australia.
- Aubert, H. y D. V. Lightner. 2000. Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, México. Marine Biology, 137:875-885.
- Ayala, F.J. 1984. Molecular polymorphism: how much is there and why is there so much?. Developmental Genetics, 4:379-39.
- Baker, A.J. 2000a. Protein Electrophoresis. pp:65-87. En: Baker, A.J. (Ed.), Molecular Methods in Ecology. Blackwell-Science. Oxford.
- Baker, A.J. 2000b. Molecular Ecology. pp:1-6. En: Baker, A.J. (Ed.), Molecular Methods in Ecology. Blackwell-Science. Oxford.
- Belyaev, D.K. 1983, Stress as a factor of genetic variation and the problem of destabilizing selection. Folia Biológica (Praha), 29:177-187
- Benzie, J.A.H. 1998. Penaeid genetics and biotechnology. Aquaculture, 164:23-47.
- Benzie, J.A.H. 2000. Population genetic structure in penaeid prawns, Aquaculture Research, 31:95-119

- Benzie, J.A.H, S. Frusher y E. Ballment. 1992. Geographical variation in allozyme frequencies of populations of *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda), in Australia. Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 43:715-725.
- Benzie, J.A.H., E. Ballment y S. Frusher. 1993. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and alluzymes. Aquaculture, 111:89-93.
- Bouza, C., L. Sánchez y P. Martínez. 1997. Gene diversity analysis in natural populations and cultured stocks of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Animal Genetics, 28:28-36.
- Browdy, L.C. 1998. Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies: improving the outlook for superior captive stocks. Aquaculture, 164:3-21.
- Busack, C.A. 1988. Electrophoretic variation in the red swamp (*Procambarus clarkii*) and white river crayfish (*P. acutus*) (Decapoda: Cambaridae). Aquaculture, 69:211-226.
- Calaprice, J. R. 1976. Mariculture-Ecological and genetic aspects of production. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 33:1068-1087.
- Carvalho, G.R. y L. Hauser. 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 4(3):326-350.
- Chakraborty, R. y O. Leimar. 1988. Genetic variation within a subdivided population. pp:89-120. En: Ryman, N. y F. Utter (Eds.), Population Genetics and Fishery Management University of Washington Press. Seattle.
- Chambers, S.M. y J.W. Bayless. 1983. Systematics conservation and the measurement of genetic diversity. pp:349-363. En: Shonewald-Cox, C.M., S.M. Chambers, B. Mc Bryde y W.L. Thomas (Eds.), Genetics and Conservation. The Benjamin/Cumming Publishing Company, INC.
- Cornuet, J.M. y G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two test for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics, 144:2001-2014.
- De Matthaeis, E., G. Allegrucci, A. Caccone, D. Cesaroni, M. Cobolli-Sbordoni y V. Sbordoni. 1983. Genetic differentiation between *Penaeus kerathurus* and *P. japonicus* (Crustacea, Decápoda). Marine Ecology Progress Series, 12:191-197.
- Doyle, R.W. y W. Hunte. 1981. Genetic changes in "fitness" and yield of a crustacean population in a controlled environment. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 22:147-156,
- Dugger, D. 1990. Shrimp farming in México yesterday, today and tomorrow. Aquaculture Magazine, 16(4):38-53.

- Einum, E. y I.A. Fleming. 1997. Genetic divergence and interactions in the wild among native, farmed and hybrid Atlantic Salmon. *Journal of Fish Biology*, 50(3):634-651.
- English, L.J. G.B. Maguire y R.D. Ward. 2000. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia. *Aquaculture*, 187:283-298.
- Ferguson, M. 1994. The role of molecular genetic markers in the management of cultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4(3):351-372.
- Fetzner, J.W. jr., R.J. Sheehan y L.W. Seeb. 1997. Genetic implications of broodstock selection for Crayfish aquaculture in the Midwestern United States. *Aquaculture*, 154:39-55.
- Forbes, A.T., N.T. Demetriades, J.A.H. Benzie y E. Ballment. 1999. Allozyme frequencies indicate little geographic variation among stocks of giant tiger prawn *Penaeus monodon* in the south-west Indian Ocean. *South African Journal of Marine Science*, 21:271-277.
- Gaffney, P.M., V.P. Rubin, D. Hedgecock, D.A. Powers, G. Morris y L. Hereford. 1996. Genetic effects of artificial propagation signals from wild and hatchery populations of red abalone in California. *Aquaculture*, 143:257-266.
- Gall, G.A.E. 1987. Inbreeding. pp:47-87. En: Ryman, N. y F. Utter, (Eds.), *Population Genetics and Fishery Management*. University of Washington Press. Seattle and London.
- García, D.K. y J.A.H. Benzie. 1995. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture*, 130:137-144.
- García, D.K., M.A. Faggart, L. Rhoades, J.A. Wyban, W.H. Carr, K.M. Ebert, J.N. Sweeney y A. Alcivar-Warren. 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3:270-280.
- Garza-Aguirre, M. C. y E. Aguirre-Hinojosa. 1999. Reproducción en cautiverio de camarones peneidos. pp:39-65. En: Martínez-Córdova, L.R. (Ed.), *Cultivo de Camarones Peneidos. Principios y prácticas*, AGT Editor S.A. México.
- Gjedrem, T. y E. Fimland. 1995. Potential benefits from high health and genetically improved stocks. pp:60-65. En: Browdy, CL. y J.S Hopkins, (Eds.), *Swimming Through Troubled Water. Proceeding of the Special Session on Shrimp Farming*, World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A., U:S:A.

- Grant, W.S., D.J. Teel y T. Kobayashi. 1984. Biochemical population genetics of Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) and comparison with Atlantic halibut (*H. hippoglossus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 41:1083-1088.
- Grant, W.S., J.P., García-Marín y F.M. Utter. 1999. Defining population boundaries for fishery management. pp:27-72. En: Mustafa, S (Ed.), Genetics in Sustainable Fisheries Management. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, UK.
- Grijalva-Chon, J.M. 1995. Análisis genético poblacional del pez espada (*Xiphias gladius*) en el Océano Pacífico. Tesis de Doctorado. División de Oceanología. Departamento de Ecología Marina. Centro de Investigaciones Científicas y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, B.C., México.
- Grijalva-Chon, J.M., J. Rosa-Vélez de la y O. Sosa-Nishizaki. 1996. Allozyme variability in two samples of swordfish. *Xiphias gladius* L., in the North Pacific Ocean. Fishery Bulletin, 94:589-594.
- Hansen, M.M., D.E. Ruzzante, E.E. Nielsen y K-L.D. Mensberg. 2000. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). Molecular Ecology, 9:583-594.
- Harris, S.E.G., R.T. Dillion, Jr., P.A. Sandifer y L.J. Lester. 1990. Electrophoresis of isozymes in cultured *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 85:330.
- Harris, H. y D.A. Hopkinson. 1978. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North-Holland, Amsterdam.
- Hartl, D.L. 1988. A Primer of Population Genetics. Sinauer Associates, Inc. Publ. Sunderland, Massachusetts.
- Hedgecock, D. 1977. Biochemical genetic markers for broodstock identification in aquaculture. pp:523-531. En: Avault, Jr. J.W. (Ed.), Proceedings of the Eight Annual Meeting. World Mariculture Society, del 9 al 13 de enero, Costa Rica.
- Hedgecock, D. y F. Sly. 1990. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture, 88:21-38.
- Hoelzel, A.R. 1992. Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach. IRL Press. Oxford, U.K.
- Ibarra-Humphries, A.M. 1998. Mejoramiento genético en la acuicultura, una realidad en peces, ¿por qué no en camarón?. pp:135-146. En: Memorias del II Simposium internacional de acuicultura. Mazatlán, Sinaloa. México, del 1 al 3 de octubre.

- Iguchi, K., K. Watanabe y M. Nishida. 1999. Reduced mitochondrial DNA variation in hatchery populations of ayu (*Plecoglossus altivelis*) cultured for multiple generations. *Aquaculture*, 178:235-243
- IUBNC (International Union of Biochemistry, Nomenclature Committee). 1984. Enzyme nomenclature. Academic Press, Orlando, Florida.
- Jory, D. E. 1995. Global situation and current megatrends in marine shrimp farming. *Aquaculture Magazine*, 21(4):74-83.
- Karl, S.A. y J.C. Avise. 1992. Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLPs. *Science*, 256:100-102.
- Kimura, M. 1982. The Neutral Theory as a Basis for Understanding the Mechanism of Evolution and Variation at the Molecular Level. pp:3-56. En: Kimura, M. (Ed.). *Molecular Evolution, Protein Polymorphism and the Neutral Theory*. Japan Scientific Societies Press, Tokio/Springer-Verlag, Berlin.
- Klug, W.S. y M.R. Cummings. 1999. *Conceptos de Genética*. quinta edición. Prentice Hall, España.
- Laubier, A., N. Pasteur y M. Morycasu. 1984. Estimation du polymorphisme enzymatique d'une population de *Penaeus japonicus* maintenue en élevage depuis quatre générations. *Océanológica, Acta* 7:451-456.
- Lavery, S. y C. Keenan. 1995. Genetic analyses of crustacean stock structure and stock size. pp:116-121. En: Courtney, A.J. y M.G. Cosgrove (Eds.), *Proceedings Of The Workshop On Spawning Stock Recruitment Relationships Srrs*. In *Australian Crustacean Fisheries*. Primero de junio de 1994. Brisbane, Qld Australia Department Of Primary Industries.
- Lester, L.J.. 1979. Population genetics of penaeid shrimp from the Gulf of Mexico. *Journal of heredity*, 70:175-180.
- Lester, L.J. 1983. developing a selective breeding program for penaeid shrimp mariculture. *Aquaculture*, 33:41-50.
- Lester, L.J. y M.J.R. Pante. 1992. Genetics of *Penaeus* Species. pp:29-52. En: Fast, A.W. y L.J. Lester. (Eds.), *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Li, C.C. y D.G. Horvitz. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics*, 5:107-117.
- Luikart, G., J.M. Cornuet y F.W. Allendorf. 1999. Temporal changes in allele frequencies provide estimates of population bottleneck size. *Conservation Biology*, 3(13):523-530

- Lutz, C.G. 1996. Genetics & breeding. Quantifying genetic variance: Heritability. *Aquaculture Magazine*, 22:(4):79-86.
- Maqueda-Cornejo, M.M. 1990. Variación genética intrapoblacional y grado de diferenciación interpoblacional del camarón azul *Penaeus stylirostris* del Golfo de California. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California.
- Martínez-Córdova, L.R., E. Aguirre-Hinojosa y H. Duarte-Moreno. 1993. Sistemas de Cultivo de camarón. pp:41-117. En: Martínez-Córdova, L.R. (Ed.), *Camaronicultura. Bases Técnicas y Científicas para el Cultivo de Camarones Peneidos*. AGT Editor, S.A. México.
- Matthew, R.M. e I.F. Greenbaum. 1999. Allozymic variation and biogeography of snapping shrimp (*alpheus*) from the gulf of Mexico and northwestern Atlantic coasts.. *The Southwestern Naturalist*, 44(4):462-469.
- Mathews, C.K. y K.E. Van Holde. 1996. *Biochemistry*. Segunda edición. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 2725 Sand Hill Road Menlo Park, C.A. 94025.
- Mattocchia, M., G. La Rosa, E. De Matthaeis, M. Cobolli-Sbordoni y V. Sbordoni. 1987. Patterns of genetic variability and differentiation in Mediterranean populations of *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda). pp:131-142. *Proceedings of the World of Symposium on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux, 23-30 de mayo de 1986, Vol. I, Berlin, Germany*.
- May, B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes. pp:1-27. En: Hoelzel, A.R. (Ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*. IRL Press. Oxford, U.K.
- Mitton, J.B. y W. M. Lewis Jr. 1989. Relationships between genetic variability and life-history features of bony fishes. *Evolution*, 43(8):1712-1723.
- Moore, S.S. V. Whan, G.P. Davis, K. Byrne, D.J.S. Hetzel y N. Preston. 1999. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 173:19-32.
- Morán, P. A.M. Pendás y E. Garcia-Vázquez. 1996. Mitochondrial DNA variation in wild and hatchery brown trout (*Salmo trutta* L) populations from Spain. *Aquaculture*, 141:59:65.
- Müller-Starck, G. 2001. Isozymes. pp:75-81. En: Kary, A., P.G. Issac y D.S. Ingram (Eds.), *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.



- Mulley, J.C. y B.D.H. Latter. 1980. Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid prawn. *Evolution*, 34:904-916.
- Murphy, R.W., J.W. Sites, Jr., D.G. Buth y C.H. Haufler. 1990. Proteins I: Isozyme electrophoresis. pp:45-126. En: D. M. Hillis y C. Moritz. (Eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89:583-590.
- Nei, M. 1983. Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. pp:165-190. En: Nei, M. y K. R. Koehn, (Eds.), *Evolution of genes and proteins*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.
- Nei, M. 1988. Genetic distance and molecular phylogeny. pp:193-215. En: Ryman, N. y F. Utter (Eds.), *Population Genetics and Fishery Management* University of Washington Press. Seattle.
- Nelson, K. 1977. Genetic Considerations in Selecting Crustacean Species. pp:543-555. En: Avault, Jr. J.W. (Ed.), *Proceedings of the Eight Annual Meeting, World Mariculture Society*, del 9-13 de enero, San José Costa Rica.
- Nelson, K. y D. Hedgecock. 1980. Enzyme polymorphism and adaptive strategy in the decapod crustacea. *The American Naturalist*, 116(2):238-280.
- Newkirk, G.F. y L.E. Haley. 1977. The role of natural populations in the genetic improvement of species used in aquaculture. pp:567-579. En: Avault, jr. J.W. (Ed.), *Proceedings of the Eight Annual Meeting. World Mariculture Society*, del 9 al 13 de enero, Costa Rica.
- Ohta, T. 1992. The Nearly Neutral Theory of Molecular Evolution. *Annual Reviews Ecology Systematic*, 23:263-286.
- Ottogalli, L., C. Galinie y D. Goxe. 1988. Reproduction in captivity of *Penaeus stylirostris* over ten generations in New Caledonia. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 3:111-125.
- Park, L.K. y P. Moran. 1994. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4:272-299.
- Parker, P.G., A.A. Snow, M.D. Schug, G.C. Booton y P.A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79(2):361-382.

- Pasteur, N., G. Pasteur, F. Bonhomme, J. Catalan y J. Britton-Davidian. 1988. Practical Isozyme Genetics. ELLIS Horwood Limited, England.
- Pella, J.J. y G.B. Milner. 1988. Use of genetic marks in stock composition analysis. pp: 247-276. En: Ryman, N. y F. Utter (Eds.), Population Genetics and Fishery Management University of Washington Press. Seattle.
- Pérez-Farfante, I. y B. Kensley. 1997. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Families and Genera. Mémoires du Muséum National D'Histoire Naturelle, Tomo 175. Éditions du Muséum Paris.
- Pérez, L.A., F.M. Winkler, N.F. Díaz, C. Cárcamo y N. Silva. 2001. Genetic variability in four hatchery strains of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in Chile. Aquaculture Research, 32:41-46.
- Poulik. M.D. 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. Nature, 180: 1477-1479.
- Pruder, G.D., C.L. Brown, J.N. Sweeney y W.H. Carr. 1995. High health shrimp systems: seed supply-theory and practice. pp:40-52. En: Browdy, C.L. y J.S. Hopkins, (Eds.), Swimming Through Troubled Water. Proceeding of the Special Session on Shrimp Farming, World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A., U:S:A.
- Pusey, A. y M. Wolf. 1996. Inbreeding avoidance in animals. TREE, vol. II, 5:201-206.
- Rannala, B. y J.L. Mountain. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. Proceedings National Academic Science, U:S:A., Aug., 94(17):197-201
- Raymond, M. y F. Rousset. 1995. Genepop (version 1.2): a population genetics software for exact test and ecumenism. Journal of Heredity, 86:248-249.
- Richardson, B.J., P.R. Baverstock y M. Adams. 1986. Allozyme Electrophoresis. A Handbook for Animal Systematics and Population Studies. Academic Press, Sidney.
- Redfield, J.A. y J.P. Salini. 1980. Techniques of starch-gel electrophoresis of penaeid prawn enzymes (*Penaeus spp.* and *Metapenaeus spp.*) CSIRO. Division of Fisheries and Oceanography. Cronulla, SSW., Australia.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. Evolution, 43:223-225.
- Rodríguez-Romero, F. y M. Gasca-Montes de Oca. 1999. La genética y sus aplicaciones en el desarrollo de la camaronicultura moderna. pp:261-283. En: Martínez-Córdova, L.R. (Ed.), Cultivo de Camarones Peneidos. Principios y prácticas, AGT Editor S.A. México.

- Rosa-Vélez, J. de la 1986. Variabilidad Genética Poblacional en Ostiones de la especie *Crassostrea virginica* del Golfo de México. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rosa-Vélez, J. de la., R. Escobar-Fernández, F. Correa y E. Felix. 1999. High Allozyme variation and genetic similarity of two populations of commercial penaeids, *Penaeus brevirostris* (Kingsley) and *P. vannamei* (Boone) from the Gulf of California. *Aquaculture Research*, 30:459-463.
- Rosa-Vélez, J. de la., R. Escobar-Fernández, F. Correa, M. Maqueda-Cornejo y J. de la Torre-Cueto. 2000. Genetic structure of two commercial penaeids (*Penaeus californiensis* and *P. stylirostris*) from the Gulf of California, as revealed by allozyme variation. *Fishery Bulletin*, 98:674-683.
- Saavedra, C. y A. Guerra. 1996. Allozyme heterozygosity, founder effect and fitness traits in a cultivated population of the European oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 139:203-224.
- Santos, M. 1987. La estructura genética de las poblaciones. pp: 59-75. En: Espinosa de los Monteros, J. y U. Labarta (Eds.), *Genética en Acuicultura*. Industrias Gráficas España, S.L., Madrid.
- Sbordoni, V. E. de Matthaeis, M. Cobolli-Sbordoni, G. la Rosa y M. Mattoccia. 1986. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Aquaculture*, 57:239-251.
- Sbordoni, V., G. la Rosa, M. Mattoccia, M. Cobolli-Sbordoni y E. De Matthaeis. 1987. Genetic changes in seven generations of hatchery stocks of the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Proceedings of the World of Symposium on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 23-30 Mayo, 1986, Vol. I. Berlin, Germany.*
- Schaal, B.A. y W.W. Anderson. 1974. An outline of techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from the American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Technical Reports Series. Georgia Marine Sciences Center 74.*
- Selander, R.K., M.H. Smith, S.Y. Tang, W.E. Johnson y J.B. Gentry. 1971. Biochemical polymorphisms and systematics in the genus *Peromyscus* I. Variation in the old field mouse (*Peromyscus polonatus*) *Studies on Genetics VI. University of Texas Publications, New York.*
- Shaklee, J.B, F.W. Allendorf, B.C. Morizot y G.S. Whitt. 1990. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 119:2-15.
- Shaw, C.R. y A.L. Koen. 1968. Starch gel zone electrophoresis of enzymes. pp:325-364. En: Smith, I. (Ed.), *Chromatography and Electrophoresis. Interscience Publishers. New York.*

- Shaw, C.R. y R. Prasad. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochemical Genetic*, 4:297-320.
- Shikano, T., T. Chiyokubo, M. Nakadate y Y. Fujio. 2000. The relationship between allozyme heterozygosity and salinity tolerance in wild and domestic populations of the guppy (*Poecilia reticulata*). *Aquaculture*, 184:233-245.
- Shultz, F.T. 1986. Developing a commercial breeding program. *Aquaculture*, 57:65-76.
- Sunden, S.L.F. y S.K. Davis. 1991. Evaluation of genetic variation in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. *Aquaculture*, 97:131-142.
- Swofford, D. y R. Selander. 1981. BIOSYS-1 - A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoresis data in population genetics and systematics. *Journal of Heredity*, 72:281-283.
- Tam, K.T. y K.H. Chu. 1993. Electrophoretic study on the phylogenetic relationships of some species of *Penaeus* and *Metapenaeus* (Decapoda: Penaeidae) from the south China sea. *Journal of Crustacean Biology*, 13(4):697-705.
- Tang, K.F.J., S.V. Durand, B.L. White, R.M. Redman, C.R. Pantoja y D.V. Lightner. 2000. Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, 190:203-210.
- Tassanakajon, A., S. Pongsomboon, V. Rimphanitchayakit, P. Jarayabhand y V. Boonsaeng. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6(2):110-115.
- Tassanakajon, A., S. Pongsomboon, P. Jarayabhand, S. Klinbunga y V. Boonsaeng. 1998. Genetic structure in wild populations of black tiger (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Marine Biotechnology*, 6:249-254.
- Toline, C.A. y A.J. Baker. 1995. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the northern redbelly dace (*Phoxinus eos*). *Molecular Ecology*, 4:745-542.
- Toro M.A.I. 1987. Mejora genética de organismos acuáticos. II. Cruzamientos. pp:157-178. En: Espinosa de los Monteros, J. y U. Labarta (Eds.), *Genética en Acuicultura*. Industrias Gráficas España, S. L., Madrid.

- Tracey, M.L., K. Nelson, D. Hedgcock, R.A. Shleser y M.L. Pressick. 1975. Biochemical genetics of lobsters: Genetic variation and the structure of American lobster (*Homarus americanus*) populations. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32: 2091-2101.
- Unzueta-Bustamante, M.L., K.H. Holtschmit, J.A. Olivas-Valdez, L.R. Martínez-Córdova, M.A. Porchas-Cornejo y M.I. Lizárraga-Partida. 1998. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) in wild parent stocks of blue shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson), in Guaymas Bay, Sonora, México. *Ciencias Marinas*, 24 (4):491-498)
- Utter, F. P. Aebersold y G. Winans. 1987. Interpreting genetic variation detected by electrophoresis. pp:21-45. En: Ryman, N. y F. Utter, (Eds.), *Population Genetics and Fishery Management*. University of Washington Press. Seattle.
- Van-Doornik, D.M. y G.A. Winans. 1998. Inheritance of allozymes in Coho Salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 127:833-837.
- Ward, R.D. y P.M. Grewe. 1994. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4:272-299.
- Ward, R.D. N.G. Elliot, B.H. Innes, A.J. Smolenski y P.M. Grewe. 1997. Global population structure of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, inferred from allozyme and mitochondrial DNA variation. *Fishery Bulletin*, 95:566-575.
- Wayne, W.D. 1980. *Bioestadística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud*. Editorial primera edición. Limusa, S.A. México.
- Weir, B. S. 1990. Intraspecific differentiation. pp:373-410. En: D. M. Hillis y C. Moritz. (Eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Weir, B. S. 1996. *Genetic Data Analysis II. Methods for discrete population genetic data*. Sunderland, Sinauer Associates.
- Wilkins, N.P. 1981. The rationale and relevance of genetics in aquaculture: an overview. *Aquaculture*, 22:209-228.
- Workman, P.L. y J.D. Niswander. 1970. Population studies on Southwestern indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics*, 22:24-29.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, 19: 395-420.
- Wyban, J.A., J.S. Swingle, J.N. Sweeney y G.D. Pruder. 1993. Specific pathogen free *Penaeus vannamei*. *World Aquaculture*, 24(1):39-45.

- Zapata, C. 1987. Variabilidad genética de las poblaciones. pp:33-57. En: Espinosa de los Monteros, J. y U. Labarta (Eds.), *Genética en Acuicultura*. Industrias Gráficas España, S. L., Madrid.
- Zar, J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Zouros, E. 1987. On the Relation Between Heterozygosity and Heterosis: Evaluation of the Evidence from Marine Mollusks. *Isozymas: Current Topics in Biological and Medical Research. Genetics, Development and Evolution*, 15:255-270.
- Zouros, E. y D.W. Foltz. 1987. The Use of Allelic Isozyme Variation for the Study of Heterosis. *Isozymas: Current Topics in Biological and Medical Research. Genetics, Development and Evolution*, 12:1-59.

## IX.-APÉNDICES

**IX.1-Apéndice 1.-** Comparaciones de la utilidad de varios métodos moleculares genéticos para detectar estructura genética poblacional a diferentes niveles de relación. La línea sólida indica el rango óptimo.

	Individuos estrechamente relacionados	Poblaciones de una especie	Especies de un género	Especies interfamiliares
Loci VNTR	-----	-----	-----	-----
ADNn	-----	-----	-----	-----
ADNmt	-----	-----	-----	-----
Alozimas	-----	-----	-----	-----

Adaptación de (Grant *et al.* 1999)



**Biblioteca de Posgrado  
en Ciencias e Ingeniería**

IX.2.-Apéndice 2.- El Código Genético Universal.

		Segunda Posición del Codón																						
P r i m e r a	T	C				A				G														
		TTT	TTC	TTA	TTG	TCT	TCC	TCA	TCG	TAT	TAC	TAA	TAG	TGT	TGC	TGA	TGG							
	Phe	(F)	Ser	(S)	Tyr	(Y)	Cys	(C)	Tyr	(Y)	Cys	(C)	Tyr	(Y)	Cys	(C)	Tyr	(Y)	Cys	(C)	Tyr	(Y)	Cys	(C)
	Leu	(L)	Pro	(P)	His	(H)	Arg	(R)	His	(H)	Arg	(R)	His	(H)	Arg	(R)	His	(H)	Arg	(R)	His	(H)	Arg	(R)
	Leu	(L)	Pro	(P)	Gln	(Q)	Arg	(R)	Gln	(Q)	Arg	(R)	Gln	(Q)	Arg	(R)	Gln	(Q)	Arg	(R)	Gln	(Q)	Arg	(R)
	Ile	(I)	Thr	(T)	Asn	(N)	Ser	(S)	Asn	(N)	Ser	(S)	Asn	(N)	Ser	(S)	Asn	(N)	Ser	(S)	Asn	(N)	Ser	(S)
	Ile	(I)	Thr	(T)	Asn	(N)	Ser	(S)	Asn	(N)	Ser	(S)	Asn	(N)	Ser	(S)	Asn	(N)	Ser	(S)	Asn	(N)	Ser	(S)
	Met	(M)	Thr	(T)	Lys	(K)	Arg	(R)	Lys	(K)	Arg	(R)	Lys	(K)	Arg	(R)	Lys	(K)	Arg	(R)	Lys	(K)	Arg	(R)
	Val	(V)	Ala	(A)	Asp	(D)	Gly	(G)	Asp	(D)	Gly	(G)	Asp	(D)	Gly	(G)	Asp	(D)	Gly	(G)	Asp	(D)	Gly	(G)
	Val	(V)	Ala	(A)	Asp	(D)	Gly	(G)	Asp	(D)	Gly	(G)	Asp	(D)	Gly	(G)	Asp	(D)	Gly	(G)	Asp	(D)	Gly	(G)
	Val	(V)	Ala	(A)	Glu	(E)	Gly	(G)	Glu	(E)	Gly	(G)	Glu	(E)	Gly	(G)	Glu	(E)	Gly	(G)	Glu	(E)	Gly	(G)
	Val	(V)	Ala	(A)	Glu	(E)	Gly	(G)	Glu	(E)	Gly	(G)	Glu	(E)	Gly	(G)	Glu	(E)	Gly	(G)	Glu	(E)	Gly	(G)

Adaptado de Black, S.D. 1998. University of Texas. <http://psyche.uthct.edu/shaun/SBlack/geneticd.html>.



**IX.3.-Apéndice 3.-** Soluciones amortiguadoras para la electroforesis.

## Amortiguador A

Electrodo:  
Tris 0.135M  
Ácido cítrico 0.045M  
pH 7.0

Gel:  
Tris 0.009M  
Ácido cítrico 0.003M  
pH 7.0

## Amortiguador E

Electrodo:  
Ac. bórico 0.3M  
NaOH 0.3M  
pH 8.3

Gel:  
Tris 0.076M  
Ac. Cítrico 0.005M  
PH 8.7

## Amortiguador B

Electrodo:  
Tris 0.1 M  
Ácido maléico 0.1M  
EDTA-Na<sub>2</sub> 0.01M  
Cloruro de magnesio 0.01M  
pH 7.4

Gel:  
Dilución 1:9 del amortiguador  
del electrodo.

## Amortiguador G

Electrodo:  
Tris 0.5 M  
EDTA-Na<sub>2</sub> 0.02M  
Ácido bórico 0.65M  
pH 8.0

Gel:  
Dilución 1:9 del amortiguador  
del electrodo.

## Amortiguador C

Electrodo:  
Tris 0.687 M  
Ácido cítrico 0.157 M  
pH 8.0

Gel:  
Tris 0.02289M  
Ácido cítrico  
0.00522M  
pH 8.0

**IX.4.-Apéndice 4.-** Mezclas reveladoras de los sistemas proteicos y soluciones varias, necesarias para estas mezclas.

Nota.- La mezcla de los reactivos secos con las soluciones o el agua se hace, con un máximo de 20 minutos, antes de finalizar la electroforesis, a menos que se indique algo diferente. Se pueden pesar los reactivos necesarios para cada revelado almacenándolos, hasta el momento de preparar las mezclas reveladoras, en las condiciones especificadas para cada reactivo.

**PROTEÍNAS GENERALES**

Cubrir el gel con solución azul de Coomasie R250 (2.5%) de una a 12 horas.

Enjuagar con solución fijadora y desteñidora y dejar en esta solución 24 horas o el tiempo requerido para que se dé un buen contraste entre las bandas y el gel. Hacer recambios periódicos de la solución.

**MEZ**

NADP	0.01 g
NBT	0.01 g
Solución sustrato MDH	2.5 ml
PMS 0.1%	10 ml
MgCl <sub>2</sub> 10%	0.1 ml
Tris-HCl 0.1 M pH 8.4	10 ml
Agua	27.5 ml

Incubación a 37°C hasta que se visualicen las bandas. Fijar y registrar.

**Solución sustrato MDH**

DL-ácido málico	1.34 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2M	4.9 ml
Agua	5.1 ml

Almacenamiento en refrigeración hasta por un mes.

**IDH**

Isocitrato de sodio	0.07 g
NBT	0.01 g
NADP	0.015 g
PMS 0.1%	1 ml
MgCl <sub>2</sub> 10%	0.2 ml
Tris_HCl 0.1M pH 8.0	48.8 ml

Incubación a 37 °C, el revelado puede requerir de varias horas. Fijar y registrar.

## ADH

Etanol 95%	2.5 ml
NAD	0.025 g
MTT 1%	1.5 ml
PMS 0.1%	1 ml
Amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 7.0	5 ml
Agua	40ml

Incubación a 37 °C C hasta que se visualicen las bandas. Fijar y registrar.

## AAT

Solución sustrato AAT pH 7.4	25 ml
Agua	25 ml

Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (con 45 ml de la solución sustrato diluida), realizar la post-uniión.

POST-UNIÓN tomar 5 ml de la mezcla de la solución de sustrato + agua y agregarle:

Azul rápido BB	0.125 g
----------------	---------

Incorporar la mezcla con el pigmento Incubación a temperatura ambiente hasta que se definan las bandas teniendo cuidado de fijar antes de que se oscurezca el gel (aproximadamente 30 min.). Registrar.

## Solución sustrato AAT pH 7.4

Ácido $\alpha$ cetoglutárico	0.01825 g
Ácido L-aspártico	0.0665 g
Polivinil pirrolidona	0.25 g
EDTA-Na <sub>2</sub>	0.025 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.71 g
Agua	25 ml

Almacenamiento en refrigeración hasta por un mes.

## PGM

$\alpha$ -D- glucosa 1 fosfato	0.25 g
EDTA-Na <sub>2</sub>	0.025 g
NBT	0.01 g
NADP	0.005 g
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (100 u/ml)	0.4 ml
MgCl <sub>2</sub> 10%	0.1 ml
PMS 0.1%	1 ml
Tris_HCl 0.1MJ pH 7.1	48.5 ml

Incubación a 37° C. hasta que se visualicen las bandas. Fijar y registrar.

## GPI

D-fructuosa 6 fosfato	0.08 g
NADP	0.005 g
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (100 u/ml)	0.8 ml
MTT 1 %	0.7 ml
PMS 0.1%	0.7 ml
Tris_HCl 0.1M. pH 8.0	48.2 ml

Incubación a 37°C (puede ser a temperatura ambiente para mejor seguimiento de la reacción), por solo 2-7 minutos, fijar inmediatamente, registrar y digitalizar la imagen del gel lo antes posible, ya que es muy inestable el producto de la reacción..

## LAP

L-Leucil β-naftilamida	0.01 g
Tris-maleato pH 6.0	25 ml
Agua	25 ml

Después de 15 minutos de incubación a 37°C realizar una post-uni6n.

POST-UNI6N: a 5 ml de agua agregarle:

Sal r1pida negra K 0.025 g

Incorporar la mezcla con el pigmento. Incubaci6n a 37°C hasta que se definan las bandas. Fijar y registrar.

## MDH

NAD	0.025 g
Soluci6n sustrato MDH pH 7.0	5 ml
MTT	1.5 ml
PMS 0.1%	1 ml
Tris-HCl 0.1 M pH 7.0	5 ml
Agua	37.5 ml

Incubaci6n a 37° C hasta que se definan las bandas. Fijar y registrar.

## Soluci6n sustrato MDH pH 7.0

DL-1cido m1lico	1.34 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2M	4.9 ml
Agua	5.1 ml

Almacenamiento en refrigeraci6n hasta por un mes.

## AKP

1-naftil fosfato 1cido	0.025 g
Sulfato de magnesio anhidro	0.030 g
Amortiguador de boratos pH 9.7	50 ml

Después de 15 minutos de incubaci6n a 37°C realizar una post-uni6n.

POST-UNIÓN: a 5 ml del amortiguador de boratos agregarle:

Azul rápido BB

0.025 g

Incorporar la mezcla con el pigmento. Incubación a 37°C hasta que se definan las bandas.  
Fijar y registrar.

#### ACP

1-naftil fosfato ácido

0.05 g

Amortiguador de acetatos 0.05 M pH 5.0

50 ml

Después de 15 minutos de incubación a 37°C realizar una post-unión.

POST-UNIÓN: a 5 ml del amortiguador de boratos agregarle:

Azul rápido BB

0.05 g

Incorporar la mezcla con el pigmento. Incubación a 37°C hasta que se definan las bandas.  
Fijar y registrar.

#### XDH

Hipoxantina

0.05 g

Tris-HCl 0.5 M pH 7.0

5 ml

Agitar perfectamente durante 15 minutos y mezclar con:

NAD

0.015 g

MTT 1%

1 ml

PMS 0.1%

1 ml

Agua

43 ml

Incubación a 37 °C hasta que se visualicen las bandas. Fijar y registrar.

#### GDH

NAD

0.025 g

Solución sustrato GDH

2.5 ml

MTT 1%

1.5 ml

PMS 0.1%

1 ml

Amortiguador de fosfatos 0.5 M. pH 7.0

12.5 ml

Agua

32.5 ml

Incubación a 37 °C hasta visualizar las bandas. Fijar y registrar.

#### Solución sustrato GDH

Glutamato de sodio

0.425 g

Amortiguador de fosfatos 0.5 M. pH 7.0

10 ml

Almacenamiento en refrigeración hasta por un mes.

## GAPDH

NAD	0.025 g
Arseniato de sodio	0.09 g
Solución sustrato GAPDH	5 ml
MTT 1%	1.5 ml
PMS 0.1%	1 ml
Tris-HCl 0.5 M. pH 7.1	10 ml
Agua	32.5 ml

Incubación a 37 °C hasta visualizar bandas. Fijar y registrar. Si los organismos muestran poca o nula actividad es muy posible se deba al tiempo de corrida electroforéticas. Enzima muy susceptible a temperaturas aun de refrigeración.

## Solución sustrato GAPDH

Fructuosa 1,6 difosfato	0.273 g
Aldolasa	0.09 ml
Tris-HCl 0.5 M. pH 7.1	2 ml
Agua	3 ml

Mezclar e incubar a 37° C por 30 minutos. Preparar cada vez que se vaya a revelar este sistema enzimático.

## G3PDH

NAD	0.025 g
Solución sustrato G3PDH	5 ml
MTT 1%	1.5 ml
PMS 0.1%	1 ml
Tris-HCl 0.5 M. pH 7.1	7.5 ml
Agua	35 ml

Incubación a 37° C hasta visualizar las bandas. Fijar y registrar.

## Solución sustrato G3PDH

DL- $\alpha$ -glicerofosfato	1.08 g
Agua	5 ml

Almacenamiento en refrigeración hasta por 15 días.

## LDH

NAD	0.025 g
Solución sustrato LDH	5 ml
MTT 1%	1.5 ml
PMS 0.1%	1 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 7.1	7.5 ml
Agua	35 ml

Incubación a 37° C hasta visualizar bandas. Fijar y registrar.

## Solución sustrato LDH

Ácido láctico 80%	1.125 ml
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1M	4.9 ml
Agua	3.975 ml

Almacenamiento en refrigeración hasta por un mes.

## EST

Solución sustrato EST	1.5 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 7.1	5 ml
Agua	43.5

Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, realizar una post-uniión.

POST-UNIÓN: a 5 ml de agua agregarle:

Azul rápido BB	0.05 g
----------------	--------

Incorporar la mezcla con el pigmento. Incubación a temperatura ambiente hasta que se definan las bandas. Fijar y registrar.

## Solución sustrato EST

1-Naftil acetato	0.05 g
2-Naftil acetato	0.05 g
Acetona	2.5 ml
Agua	2.5 ml

Almacenamiento en refrigeración hasta por 15 días.

Nota: Las post-uniones se realizan con el fin de evitar el efecto inhibitorio de los pigmentos sobre las reacciones enzimáticas.

Nota: el tiempo de incubación antes de la post-uniión, pueden variar dependiendo de que tan activa se encuentre la enzima de interés en las muestras, por lo tanto puede ser diferente de muestra en muestra y es determinado a prueba y error.

## Solución Homogenizadora

A 100 ml de solución Tris-HCl 0.1M pH 8.0 se le adicionan:

NAD	0.01 g
NADP	0.01 g
PVP	1.0 g

Utilizar la solución homogenizadora recién preparada cada vez que se requiera. Mantener en refrigeración o en una cama de hielo al realizar el homogenizado de los tejidos.

## Solución fijadora y desteñidora

Metanol	600 ml
Ácido acético	200 ml
Agua	1200 ml
Almacenamiento a temperatura ambiente, puede ser recuperada y utilizada en varias ocasiones.	

MgCl<sub>2</sub> 10%

MgCl <sub>2</sub>	1.0 g
Agua	10 ml
Almacenamiento a temperatura ambiente.	

## PMS 0.1%

PMS	0.01 g
Agua	10 ml
Almacenamiento en refrigeración, en recipiente adecuado para no exponer la solución a la luz, actividad por 15 días.	

## MTT 1%

MTT	0.25 g
Agua	25 ml
Almacenamiento en refrigeración, en recipiente adecuado para no exponer la solución a la luz, actividad por 15 días.	

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2M

Carbonato de sodio	21.2 g
Agua	100 ml
Almacenamiento a temperatura ambiente	

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M

Carbonato de sodio	10.6 g
Agua	100 ml
Almacenamiento a temperatura ambiente.	

## NaOH 1M

Hidróxido de sodio	2.0 g
Agua	50 ml
Almacenamiento a temperatura ambiente.	



Nota.-Preparar las soluciones en un volumen un poco menor al deseado, ajustar el pH y llevar al volumen requerido.

Tris-HCl 0.1M

Tris	1.211 g
Agua	100 ml

Ajustar al pH deseado con HCl  
Almacenamiento en refrigeración hasta por seis meses.

Tris-HCl 0.5M

Tris	6.055 g
Agua	100 ml

Ajustar al pH deseado con HCl.  
Almacenamiento en refrigeración hasta por seis meses.

Amortiguador de acetatos 0.05M pH 5.0

Acetato de sodio trihidratado	0.6805g
Agua	100 ml

Ajustar el pH con ácido acético. Almacenar a temperatura ambiente.

Amortiguador de boratos pH 9.7

Ácido bórico	0.935 g
NaOH 1M	12.5 ml
Agua	250 ml

Almacenamiento en refrigeración hasta por seis meses.

Tris maleato pH 6.0

Solución A

Tris	1.21 g
Ácido maléico	1.16 g
Agua	50 ml

Almacenamiento en refrigeración hasta por seis meses.

Solución B

NaOH	0.4 g
Agua	50 ml

Almacenamiento a temperatura ambiente

Mezclar 50 ml de la solución A con 26 ml de la solución B y aforar a 200 ml  
Ajustar el pH a 6.0. Almacenamiento de la mezcla hasta por un mes en refrigeración.

## Amortiguador de fosfatos 0.5M pH 7.0

Solución A ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5M)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (anhidro)	14.196 g
Agua	200 ml

Solución B ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.5M)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (monohidratado)	3.45 g
Agua	50 ml

Ajustar el pH a 7.0 titulando la solución B con la solución A

Almacenamiento de la solución A, B y la mezcla a temperatura ambiente.

## Solución Azul de Coomasie

Azul de Coomasie R-250	1.25 g
Metanol	227 ml
Ácido acético	46 ml
Agua	227 ml

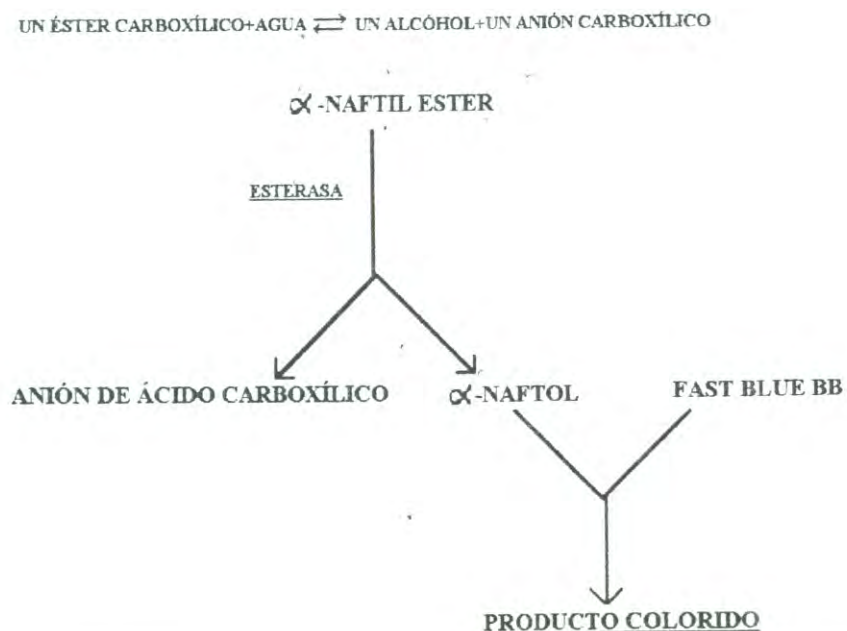
Almacenamiento a temperatura ambiente, protegiendo la solución de la luz, se puede utilizar varias veces solo que puede variar el tiempo de tinción requerido para el revelado.

### IX.5.-Apéndice 5.- Fundamento de las reacciones de revelado.

En el revelado se aplicaron técnicas de tinción de productos de la desnaturalización de una proteína y técnicas enzima-específicas, para la detección directa de las proteínas en la matriz electroforética.

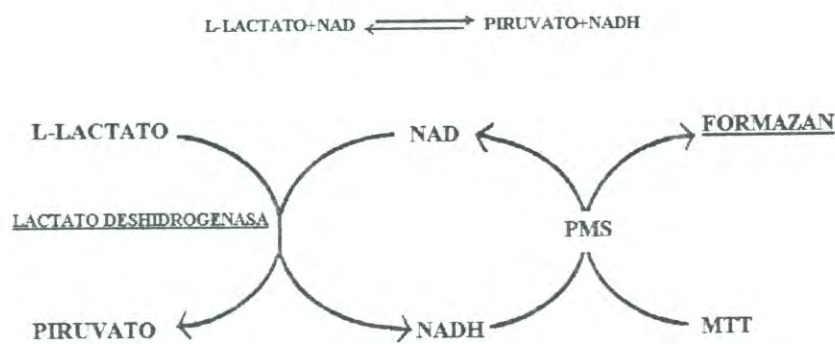
Proteínas generales: las proteínas contienen un gran número de grupos nitrogenados, los cuales pueden ser teñidos, en nuestro caso con Coomasie Blue, después de su liberación por desnaturalización de la proteína en medio ácido. Esta tinción no es específica y en la práctica solo revela aquellas proteínas que existen en grandes cantidades en el extracto proteico.

El método para visualizar a AKP, ACP, AAT, EST, y LAP es el nombrado por Harris y Hopkinson (1978) como método de detección química. Este método ha sido ampliamente utilizado en ensayos con hidrolasas, ya sea que el color sea formado por una reacción con el producto de la actividad enzimática o directamente con el sustrato.



Deshidrogenasas: la mayoría catalizan la transferencia de un átomo de hidrógeno de su sustrato a una coenzima ( $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ ) con base en una reacción química espontánea, la cual tiene lugar en presencia de phenazine methosulfato (PMS) que actúa como un catalizador intermediario. El átomo de hidrógeno puede ser transferido a una sal tetrazolium, tal como el nitroblue tetrazolium (NBT) o thiazolyl blue (MTT), para formar un producto colorido altamente insoluble de color azul (formazan), en la posición de la enzima evaluada.

El sistema tetrazolium (NBT o MTT y PMS) es utilizado como un aceptor de hidrógenos para revelar una gran variedad de actividades enzimáticas. Puede ser directamente, cuando la enzima que se está estudiando utiliza  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  como el caso de SDH, XDH, MDHP, G3PDH, GAPDH, GDH, MDH, IDH y LDH.



También puede ser indirectamente, a través de una enzima exógena y una de sus coenzimas, para atrapar y cambiar el producto de la reacción enzimática bajo prueba en una sustancia, la cual puede ser detectado por su color al precipitar en el sitio en el que la isoenzima cataliza la primera reacción, como el caso de PGM y GPI.

