



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

**VARIACION GENETICA DEL CAMARON ROSADO
(Penaeus brevirostris Kingsley)
DEL GOLFO DE CALIFORNIA.**



TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

OCEANOLOGO

PRESENTA

EFRAIN FELIX CARRILLO

ENSENADA, B.C.

FEBRERO 1991

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

VARIACION GENETICA DEL CAMARON ROSADO *Penaeus brevirostris*

KINGSLEY DEL GOLFO DE CALIFORNIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

O C E A N O L O G O

PRESENTA:

EFRAIN FELIX CARRILLO


ENSENADA, B. C., FEBRERO DE 1991

VARIACION GENETICA DEL CAMARON ROSADO *Penaeus brevisrostris*
KINGSLEY DEL GOLFO DE CALIFORNIA

TESIS QUE PRESENTA

Efraín Félix Carrillo


APROBADA POR




Dc. Roberto Escobar Fernández
Presidente del Jurado



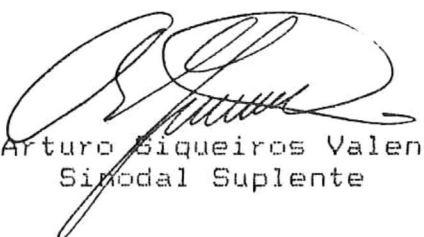
Dr. Jorge De La Rosa Vélez
Sinodal Propietario



Dc. Eugenio Carpizo Ituarte
Sinodal Propietario



Dc. Juan A. Fernández Apango
Sinodal Suplente



Dc. Arturo Biqueiros Valencia
Sinodal Suplente

DEDICATORIA

A MI MADRE Y A MI PADRE

Tita y Beto

A MIS HERMANOS

Nena, Vicky, Beto, To, Gonory, Lila y Rubén

AGRADECIMIENTOS

A mi Director de Tesis Oc. Roberto Escobar F. por dirigirme en este trabajo y por haberme ayudado con sus consejos.

A mis sinodales Dr. Jorge De La Rosa, Oc. Eugenio Carpizo Ituarte, Oc. Juan Antonio Fernández Apango y Oc. Arturo Siqueiros Valencia por la revisión del escrito y su apoyo incondicional.

Al equipo de Genética del I.I.O. Javier (aunque se acabo mi cinta) y Meche por la ayuda prestada en los experimentos realizados.

A la generación XXVIII de Oceanólogos de la F. C. M "Los Mandrakos" por sus criticas a todo lo largo de mi carrera en esta universidad.

RESUMEN

Se determinó la variabilidad genética del camarón rosado, *Penaeus brevistris*, de una población en el extremo septentrional de su distribución, por medio de electroforesis en gel de almidón al 12%. Se trabajaron 17 sistemas enzimáticos en 3 sistemas amortiguadores. El polimorfismo fue de 15.63% loci polimórficos de 32 loci enzimáticos bajo el criterio del alelo más común con frecuencia < 0.95 , la heterocigosis observada fue de $0.079 + 0.035$ y la esperada según el equilibrio de Hardy-Weinberg de $0.076 + 0.031$. La población en general se encuentra dentro de este equilibrio. El nivel de variabilidad genética de la especie está dentro del rango de las demás especies de peneidos. Los loci polimórficos que resultaron fuera del equilibrio fueron ACP-3, con exceso de heterocigosis y EST-2, con deficiencia de heterocigotos, el primero posiblemente debido a la selección natural y el segundo a causa probablemente del efecto de Wahlund y/o la selección natural.

Índice

Resumen.....	i
Índice.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tablas.....	iv
Introducción.....	1
Materiales y Métodos.....	7
Resultados.....	24
Discusión.....	29
Conclusión.....	40
Literatura Citada.....	41

Lista de figuras

Figura 1.- Localización del Área de Colecta del camarón rosado (<i>Penaeus brevirostris</i>)	8
--	---

Lista de tablas

Tabla I.- Frecuencias alélicas (f), número de organismos estudiados por locus (n) y Heterocigosis observada (ho) y esperada (he) bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg del camarón rosado <i>Penaeus brevirostris</i> Kingsley del Golfo de California.....	26
Tabla II.- Resumen de la variación genética del camarón rosado <i>Penaeus brevirostris</i> Kingsley, del Golfo de California.....	27
Tabla III.- Prueba de bondad de ajuste "ji-cuadrada" para los loci polimórficos y valor estadístico " D " del camarón rosado <i>Penaeus brevirostris</i> del Golfo de California.....	28

INTRODUCCION

La variación genética de una población es un parámetro fundamental en los estudios evolutivos, dado que la variación genética determina el potencial evolutivo de las poblaciones (Ayala, 1980). Si para cierto locus génico todos los individuos de una población son homocigotos, la evolución no puede tener lugar en este locus, porque las frecuencias alélicas no pueden cambiar de generación en generación. En cambio si en una población hay dos alelos o más en ciertos loci, en ellos pueden tener lugar cambios evolutivos: un alelo puede aumentar su frecuencia a expensas del otro. Cuando mayor sea el número de loci variables y cuantos más alelos hayan en cierto locus variable mayor, será la posibilidad de cambiar las frecuencias alélicas (Ayala y Kiger, 1984).

Los organismos individuales pueden cambiar a lo largo de su vida, pero su constitución genética permanece constante. Por el contrario, la constitución genética de una población puede cambiar de una generación a otra; esto último a través de los procesos de mutación, migración, deriva al azar y selección natural. (Ayala, 1980).

Para inferir la estructura genética de una población se requiere obtener el valor de la variabilidad genética de dicha población, con base en las frecuencias de los genotipos de diferentes loci. Si se estudia la secuencia de aminoácidos de una proteína, cualquier cambio en ésta puede ser equiparada con un cambio en la secuencia de nucleótidos del DNA del cual se originó y, por lo tanto, podemos estudiar la variación genética. La secuencia lineal de nucleótidos en el DNA determina la estructura primaria de un polipéptido, si se siguen las reglas del código genético. La alteración en la secuencia del DNA modificará la secuencia de los aminoácidos de la proteína que codifica, esta alteración cambia la carga eléctrica y/o la conformación de la proteína debido a que algunos aminoácidos poseen cadenas laterales ionizables. La variación molecular es entonces detectada en la separación de proteínas ante la aplicación de un campo eléctrico, mediante la técnica llamada electroforesis (Suárez-Vásquez, 1989).

La proteína se coloca en un gel de almidón, agar, poliacrilamida, o alguna otra sustancia gelatinosa: cada proteína del gel migra en una dirección y a una velocidad que depende de su carga eléctrica neta y su tamaño molecular. Después de sacar el gel del campo eléctrico, se

trata con una solución química que contiene el sustrato para la enzima y una sal que reacciona con el producto de la reacción catalizada por la enzima (Ayala y Kiger, 1984).

Por otra parte, para medir la variabilidad genética de las poblaciones se utilizan la heterocigosis y el polimorfismo, de los cuales el primero es el mejor estimador de estas mediciones, pues cuantifica la cantidad de individuos heterocigotos por locus a partir de frecuencias alélicas generadas por éstos y además tiene la ventaja adicional que su error de muestreo es dependiente del número de loci estudiados en cada individuo en vez del número de individuos estudiados (Nei y Roychoudhury, 1974; citado por Tracey, *et al.* 1975).

La otra forma de medición (el polimorfismo) es una medida útil para medir la variabilidad porque nos da una estimación de la cantidad de loci polimórficos en una población, pero es imprecisa y arbitraria. Imprecisa porque un locus poco polimórfico cuenta tanto como un locus muy polimórfico y arbitraria porque depende del criterio de polimorfismo del autor para definir si es un locus polimórfico o no (criterios de $f < 0.95$ o $f < 0.99$).

La investigación de los niveles de variabilidad genética en poblaciones sujetas a explotación, dan una evaluación del estado de "salud genética poblacional", que permite obtener un criterio más preciso para la utilización del recurso (Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989).

Lewontin y Hubby (1966) y Harris (1966), citados por Selander (1980) intentaron medir sistemáticamente la variación génica en poblaciones naturales al seleccionar muestras de proteínas al azar para encontrar las aleloenzimas, que son variantes genéticamente controladas de las isoenzimas o formas moleculares múltiples de enzimas. Estos autores llegaron a la conclusión de la existencia casi universal de un amplio polimorfismo proteínico en las poblaciones naturales.

Según Nelson (1977), los crustáceos decápodos representan los invertebrados con más bajos número de loci heterocigóticos, con $H=4-5\%$.

Lester (1979) realizó estudios de estructura poblacional de tres especies explotadas comercialmente de camarones del Golfo de México; *Penaeus aztecus*, *P. duorarum*, *P. setiferus* que son los principales miembros del género *Penaeus* del golfo. El propósito de este estudio fue

determinar el nivel de variación aloenzimática y el grado de subdivisión interespecífico, los resultados mostraron que la variación genética es bastante similar y los valores de distancia e identidad génica indican la ausencia de una diferenciación genética entre las poblaciones de las tres especies.

Mulley y Latter (1980) trabajaron con las especies de camarones de Australia con diferenciación genética en un grupo de especies caracterizadas por su extremadamente bajo nivel de heterocigosis que fue desde 0.6% a 3.3%.

Lester (1983) investigó cuatro especies de camarones considerados para producción en maricultivo en el sur de Estados Unidos (*Penaeus aztecus*, *P. setiferus*, *P. stylirostris* y *P. vannamei*; con el propósito de ver su diferenciación genética. Estos organismos fueron colectados de diferentes partes del Golfo de México, Océano Atlántico, Golfo de California y Océano Pacífico. La utilidad de sus resultados se prevé en la elección de una población selecta para un programa de cultivo. Los valores de heterocigosis encontrados son 0.09 y 0.07 para *P. aztecus* y *P. setiferus*, respectivamente, 0.02 en *P. vannamei* y 0.06 en *P. stylirostris*.

El presente trabajo se ubica en el proyecto de "Caracterización Genética de las Poblaciones de Peneidos Comerciales del Golfo de California" (Rosa-Vélez, 1989) el cual servirá para obtener información acerca de los aspectos genéticos básicos de estas especies, entre la cuales se encuentra el camarón rosado, *Penaeus brevirostris* Kingsley. Que se distribuye desde el norte de Sinaloa, México hasta el Golfo de Guayaquil, Ecuador.

OBJETIVO

Determinar la variabilidad genética del camarón rosado, *Penaeus brevirostris*, Kingsley, de una población del Golfo de California.

MATERIALES Y METODOS

Area de colecta

La muestra se obtuvo de la flota de pescadores ribereños que opera en el puerto de Guaymas, Son., por parte de la Secretaria de Pesca. Dicha flota opera en la zona comprendida de Guaymas y Empalme, Son., situados al sur del estado mexicano de Sonora (fig. 1). Sin embargo, dicha localidad se encuentra al norte del límite septentrional de la distribución de la especie, por lo tanto, como no se participó directamente en la colecta no se puede afirmar categóricamente el origen de la muestra.

Material Biológico

Se obtuvieron 36 organismos adultos y se transportaron congelados hasta el laboratorio de Genética del I.I.O.-F.C.M., donde permanecieron a una temperatura de -76°C . Se disecaron para extraer los tejidos representativos del cefalotórax (glándula verde, estómago y glándula digestiva) y abdominal, los cuales se homogeneizaron en un amortiguador (Tris-HCl, 0.1 M, pH 8.0 + NAD^{+} + NADP^{+} + PVP;



FIG. 1 LOCALIZACION DEL AREA DE COLECTA DEL CAMARON ROSADO (*Penaeus brevirostris*)

10:1:1:100, v:p:p:p) y centrifugaron a 12,000 x g durante 15 min., el sobrenadante resultante, en el cual se concentran las enzimas solubles características del tejido seleccionado, fue utilizado para el estudio electroforético.

Electroforesis

Se llevó a cabo una electroforesis horizontal en gel de almidón, de acuerdo a la metodología de Lewontin y Hubby (1966) (citados por Selander, 1980). En la cual el gel se preparó al mezclar 52.8 g de almidón Sigma con 440 ml de una solución amortiguadora específica para lograr una suspensión caliente que queda espesa y viscosa. Se desgasificó por medio de vacío por espacio de 30 seg para evitar las burbujas de aire. Posteriormente se vertió en un contenedor de acrílico de 15 x 25 x 1 cm para que quedase en forma de placa.

Una vez enfriado a temperatura ambiente se hizo una incisión a lo largo del gel aproximadamente a 3.5 cm del borde, donde se insertaron las mechas de papel filtro Whatman 3 de 1 x 0.5 cm empapadas con la muestra (sobrenadante). El gel con las mechas se colocó en una cuba electroforética, en la cual las mechas quedan del lado

catódico. Esta parte a su vez contiene otra solución amortiguadora específica (electrodo), que está comunicada con el gel con tiras de papel filtro Whatman 1 de 8 x 25 cm, por las cuales se transmite el flujo eléctrico. Dicho flujo es provisto por una fuente de poder Buchler modelo HBI, con la cual se fijan los valores máximos de los parámetros utilizados en los programas para el desplazamiento de las proteínas (voltaje, amperaje, wattaje y tiempo).

Las cubas electroforéticas se colocaron en un refrigerador a 4 °C para el corrimiento electroforético. A los 15 min. del inicio de la electroforesis se retiraron las mechas de los geles. Al término del corrimiento se rebanó el gel en capas y se reveló con soluciones histoquímicas de tinción específicas para cada sistema de enzimas y se dejó incubar a 37 °C hasta que aparecieron las bandas teñidas, después se eliminó la solución histoquímica y se fijó el gel con una solución de metanol, ácido acético y agua (3:1:6, v:v:v).

Las soluciones amortiguadores, las soluciones histoquímicas de tinción y los sistemas enzimáticos que se utilizaron fueron los que presentaron mejor resolución en

los experimentos de estandarización, los cuales son los siguientes:

Sistemas enzimáticos

Enzima málica.....	MEZ
Esterasas.....	EST
Fosfatasa ácida.....	ACP
Fosfatasa alcalina.....	AKP
Fosfogluco mutasa.....	PGM
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.....	G6P
Glucosa 3 fosfato deshidrogenasa.....	G3P
Glutamato deshidrogenasa.....	GDH
Isocitrato deshidrogenasa.....	IDH
Leuciamino peptidasa.....	LAP
Lactato deshidrogenasa.....	LDH
Malato deshidrogenasa.....	MDH
Sorbitol deshidrogenasa.....	SDH
Transaminasa glutámico oxalacético.....	GOT
Xantina deshidrogenas.....	XDH
Proteína total.....	PTO

Sistemas amortiguadores

Sistemas utilizados en los corrimientos electroforéticos:

Sistema amortiguador C (Selander *et al.*, 1971).

Electrodo:

Tris (0.687 M).....83.196 g
 Acido citrico (0.157 M).....30.164 g
 Agua.....1000 ml
 pH 8.0

Gel:

Tris (0.022 M).....2.722 g
 Acido citrico.....1.003 g
 Agua.....1000 ml
 pH 8.0

Sistemas enzimáticos corridos con este amortiguador:

Abdomen		Cefalotórax
AKP	PGM	AKP
GOT	XDH	LAP
MEZ	SDH	

Programa utilizado en la fuente de poder:

Voltaje.....100 V
 Amperaje.....50 mA
 Wattaje.....20 W
 Tiempo.....6 h

Sistema amortiguador E (Poulik, 1957).

Electrodo:

Acido bórico (0.30 M).....18.549 g

Hidróxido de sodio.....2.400 g
 Agua.....1000 ml
 pH 8.2

Gel:

Tris (0.076 M).....9.204 g
 Acido cítrico (0.005 M).....0.916 g
 Agua.....1000 ml
 pH 8.7

Sistemas enzimáticos corridos con este amortiguador:

Abdomen	Cefalotórax
PTD	PTD
	ACP

Programa utilizado en la fuente de poder

Voltaje.....250 V
 Amperaje.....50 mA
 Wattaje.....50 W
 Tiempo.....5 h

Sistema amortiguador G (Shaw y Koen, 1968).

Electrodo:

Tris (0.5 M).....60.550 g
 EDTA (0.02 M).....7.445 g
 Acido bórico (0.65 M).....40.190 g
 Agua.....1000 ml
 pH 8.0

Gel:

Se prepara el gel con una dilución 1:9 de la solución amortiguadora del electrodo.

Sistemas enzimáticos corridos con este amortiguador:

Abdomen			Cefalotórax
MDH	G6P	IDH	EST
GDH	GPD		
G3P	LDH		

Programa utilizado en la fuente de poder:

Voltaje.....	200 V
Amperaje.....	50 mA
Wattaje.....	40 W
Tiempo.....	6 h

Tinciones Histoquímicas**Soluciones usadas para sistema enzimáticos:****Enzima mállica (MEZ) (Schaal y Anderson, 1974).****1.- Solución tñtidora:**

a) NADP.....	10 mg
b) NBT.....	10 mg
c) PMS.....	5 mg
d) MgCl ₂ (10%).....	0.1 ml
e) Tris-HCl (0.1 M, pH 8.4).....	10 ml
f) Agua.....	37.5 ml

- g) Solución sustrato MDH.....2.5 ml
- i) Acido málico.....13.4 g
 - ii) Na_2CO_3 (2 M).....49 ml
 - iii) Agua.....51 ml
- pH 7.0

Esterasas (EST) (Shaw y Prasad, 1970)

1.- Solución tefidora:

- a) Azul rápido BB.....50 mg
- b) Tris-HCl (0.5 M, pH 7.1).....5 ml
- c) Agua.....43.5 ml
- d) Solución sustrato EST.....1.5 ml
 - i) α -Naftil acetato.....100 mg
 - ii) β -Naftil acetato.....100 mg
 - iii) Acetona.....5 ml
 - iv) Agua.....5 ml

2.- Dejar incubar a temperatura ambiente en un lugar oscuro.

Fosfatasa Ácida (ACP) (Shaw y Prasad, 1970)

1.- Solución tefidora:

- a) α -Naftil fosfato ácido..... 50 mg
- b) Azul rápido BB.....50 mg
- c) Acetato de Sodio (0.05 M, pH 5.0).....50 ml

Fosfatasa alcalina (AKP) (Shaw y Koen, 1968)

1.- Solución tefidora:

- a) Na Naftil fosfato.....25 mg

- b) Azul rápido BB.....25 mg
- c) MgSO₄ anhidro.....30 mg
- d) Amortiguador de Boratos (pH 9.7).....50 ml
 - i) Acido bórico.....0.374 g
 - ii) NaOH (1.0 M).....5 ml
 - iii) Agua.....100 ml

Fosfoglicerol mutasa(PGM) (Schaal y Anderson, 1974)

1.- Solución teñidora:

- a) Glucosa 1 fosfato.....250 mg
- b) EDTA.....25 mg
- c) NBT.....10 mg
- d) NADP.....5 mg
- e) MgCl₂ (10%).....0.1 ml
- f) Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.....40 u
- g) PMS.....1 mg
- h) Tris-HCl (0.1 M, pH 7.1).....50 ml

Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6P) (Schaal y

Anderson, 1974).

1.- Solución teñidora:

- a) Glucosa 6 fosfato.....75 mg
- b) NADP.....15 mg
- c) MTT.....10 mg
- d) PMS.....1 mg
- e) Tris-HCl (0.5 M, pH 7.1).....12.5 ml
- f) Agua.....37.5 ml

Glicerol fosfato deshidrogenasa (GPD) (Schaal y Anderson, 1974).

1.- Solución tefidora:

- a) NAD.....25 mg
- b) MTT.....15 mg
- c) PMS.....1 mg
- d) Tris-HCl (0.5 M, pH 7.1).....7.5 ml
- e) Agua.....37.5 ml
- f) Solución sustrato.....5 ml
 - i) Na α -glicerolfosfato..2.16 g
 - ii) Agua.....10 ml

pH 7.0

Glucosa 3 fosfato deshidrogenasa (G3P) (Schaal y Anderson, 1974)

1.- Solución tefidora:

- a) NAD.....25 mg
- b) MTT.....15 mg
- c) PMS.....1 mg
- d) Arseniato de sodio.....90 mg
- e) Tris-HCl (0.5 M, pH 7.1).....10 ml
- f) Agua.....35 ml
- g) Solución sustrato G3P.....5 ml
 - i) Fructuosa 1,6 difosfato...273 mg
 - ii) Aldolasa.....50 u
 - iii) Tris-HCl (0.5 M, pH 7.1)....2 ml

iv) Agua.....3 ml

2.- Mezclar la solución sustrato e incubar a 37 °C (30 min).

Glutamato deshidrogenasa (GDH) (Schaal y Anderson, 1974)

1.- Solución tefidora:

a) NAD.....25 mg

b) MTT.....15 mg

c) PMS.....1 mg

d) Amortiguador de fosfatos (.5 M, pH 7).12.5 ml

e) Agua.....35 ml

f) Solución sustrato GDH.....2.5 ml

i) Glutamato de sodio.....4.25 g

ii) Amort.de fosfatos (0.5 M, pH 7.0)..100 ml

Isocitrato deshidrogenasa (IDH) (Abreu, 1982).

1.- Solución tefidora:

a) NADP.....15 mg

b) Isocitrato de Sodio.....67.5 mg

c) NBT.....10 mg

d) MgCl₂.....15 mg

e) PMS.....1 mg

f) Tris-HCl (0.1 M, pH 8.0).....50 ml

Leucinamino peptidasa (LAP) (Schaw y Prasad, 1970).

1.- Solución tefidora:

a) Tris-Malato (pH 6.0).....25 ml

- b) Sal rápida negra K.....25 mg
- c) L-leucil β -naftilamida.....10 mg
- d) Agua.....25 ml

Lactato deshidrogenasa (LDH) (Shaw y Prasad, 1970)

1.- Soluci3n teñidora:

- a) NAD.....25 mg
- b) MTT.....15 mg
- c) PMS.....1 mg
- d) Tris-HCl (0.5 M, pH 7.1)..... 7.5 ml
- e) Agua.....37.5 ml
- f) Soluci3n sustrato LDH5 ml
 - i) Acido láctico (85%)..5.3 ml
 - ii) Carbonato de sodio..24.5 ml
 - iii) Agua hasta 50 ml

Malato deshidrogenasa (MDH) (Schaal y Anderson, 1974).

1.- Soluci3n teñidora:

- a) NAD.....25 mg
- b) MTT.....15 mg
- c) PMS.....1 mg
- d) Tris-HCl (0.1 M, pH 7.0).....5 ml
- e) Agua.....40 ml
- f) Soluci3n sustrato MDH.....5 ml
 - i) Acido málico.....13.4 g
 - ii) Na_2CO_3 (2 M).....49 ml
 - iii) Agua.....51 ml

Sorbitol deshidrogenasa (SDH) (Schaal y Anderson, 1974).

1.- Solución teñidora:

- a) Sorbitol.....250 mg
- b) NAD.....5 mg
- c) MTT.....7.5 mg
- d) PMS.....1 mg
- e) Tris-HCl (0.5 M, pH 8.0).....50 ml

Transaminasa glutámico oxal (GOT) (Schaal y Anderson, 1974)

1.- Solución teñidora:

- a) Azul rápido BB.....125 mg
- b) Agua.....25 ml
- c) Solución sustrato GOT.....25 ml
 - i) Acido cetoglutámico..0.73 g
 - ii) Acido L-aspártico...0.266 g
 - iii) Polivinil pirrolidona...1 g
 - iv) EDTA.....0.1 g
 - v) Na_2HPO_42.84 g
 - vi) Agua.....100 ml

2.- 20 min. después de colocarse la solución histoquímica (sin el azul rápido BB) realizar una post-uni6n con 5 ml de agua y soluci6n sustrato, m6s los 125 mg de azul r6pido BB.

Xantina deshidrogenasa (XDH) (Schaal y Anderson, 1974)

1.- Solución tefidora:

- a) Hipoxantina.....50 mg
- b) Tris-HCl (0.5 M, pH 7.0).....5 ml
- c) NAD.....15 mg
- d) MTT.....10 mg
- e) PMS.....1 mg
- f) Agua.....45 ml

2.- Mezclar primero la hipoxantina y el Tris-HCl con un ligero calentamiento y combinar con el resto de los compuestos.

Proteína total (PTD) (Rosa-Vélez, 1986)

1.- Solución tefidora:

- a) Azul de Coomasie R-250.....1.25 g
- b) Metanol.....227 ml
- c) Acido acético.....46 ml
- d) Agua.....227 ml

El revelado de estos sistemas enzimáticos nos proporciona información para determinar el grado de heterocigosis de los organismos.

Manejo estadístico

El polimorfismo se calcula como la razón de loci polimórficos entre los loci estudiados, donde se considera

polimórfico a un locus si la frecuencia del electromorfo (alelo) más común es ≤ 0.95 (Selander, 1980).

$$\text{Polimorfismo} = \frac{\text{Loci polimórficos}}{\text{loci estudiados}}$$

La heterocigosis de un locus (h) se va a definir como $1 - \sum X_i^2$, donde X_i es la frecuencia del alelo y la heterocigosis media (H) es la media de h a partir de todos los loci examinados.

Se realizó la prueba de bondad de ajuste de "ji-cuadrada" a los loci polimórficos para ver si se encontraban dentro del equilibrio de la ley Hardy-Weinberg.

Para observar el exceso o deficiencia de heterocigotos en los loci polimórficos se calculó el valor estadístico D por medio de la siguiente ecuación (Zouros y Foltz, 1984)

$$D = \frac{(H_o - H_e)}{H_e}$$

Nomenclatura

Los sistemas enzimáticos que presentaron más de un locus en el zimograma fueron numerados en orden ascendente desde la mayor movilidad anódica hasta los más catódicos.

En el caso de los loci polimórficos el alelo de mayor movilidad se designó como A; B al segundo más móvil y así sucesivamente, como lo sugieren Ayala y Kiger (1984).

El término zimograma se refiere a los electromorfos revelados para enzimas específicas por medio de tinciones histoquímicas (Hunter y Markert, 1957; citado por Rosa-Vélez, 1986). Las bandas teñidas o electromorfos son zonas de actividad enzimática. La variación entre alelozimas de un mismo locus se registró al considerar homocigotos a los individuos cuyo fenotipo consistía de una sola banda con determinada movilidad, y heterocigotos a aquellos que, según la estructura cuaternaria de la enzima, presentaban dos bandas para los monoméricos en el fenotipo presentado (Rosa-Vélez, 1986).

RESULTADOS

Variación genética

De los 32 loci enzimáticos que revelaron solamente 5 presentaron polimorfismo (tabla I) con el criterio del alelo más común con una frecuencia de < 0.95 (ACP-3, EST-1, EST-2, EST-3 y EST-4) lo que da un porcentaje de loci polimórficos de 15.63%. El resto resultaron monomórficos los cuales fueron ACP-1, AKP-1, AKP-2, AKP-3, EST-5, GDH-1, G3P-1, G6P-1, GOT-1, GOT-2, GPD-1, IDH-1, LAP-1, LDH-1, MDH-1, MDH-2, MEZ-1, PGM-1, PTO-1, PTO-2, PTO-3, PTO-4, PTO-5, PTO-6, SDH-1, SDH-2, XDH-1.

La heterocigosis observada y esperada bajo el equilibrio de Hardy-Weiberg de la población fue de 0.079 ± 0.035 y 0.076 ± 0.031 , respectivamente (tabla II).

La prueba de bondad de ajuste de "ji cuadrada" para los loci polimórficos (tabla III) mostró deficiencia de heterocigotos en los loci EST-2 y EST-3 y únicamente en EST-2 la deficiencia fue significativa; ACP-3, EST-1 y

EST-4 mostraron exceso de heterocigotos y sólo en ACP-3 el exceso fué altamente significativo.

Tabla 1.- Frecuencias alélicas (f), número de organismos estudiados por locus (n) y heterocigosis observada (h_o) y esperada (h_e) bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg del camarón rosado, Penaëus brevirostris del golfo de California.

Locus	alelo	f	n	h_o	h_e
ACP-3	A	0.514	35	0.857	0.507
	B	0.486			
EST-1	A	0.679	28	0.500	0.491
	B	0.214			
	C	0.107			
EST-2	C	0.528	36	0.306	0.531
	D	0.444			
	E	0.028			
EST-3	A	0.250	34	0.382	0.499
	B	0.662			
	C	0.088			
EST-4	A	0.042	36	0.389	0.331
	B	0.153			
	C	0.806			

Tabla II.- Resumen de la variación genética del camarón rosado, *Penaeus brevirostris* Kingsley, del Golfo de California.

Número de loci	Media de la muestra por locus	Media del no.de alelos por locus	% loci polimórfico *	Heterocigosis	
				Übser	Esper
36	33.3 (0.8)	1.3 (0.1)	15.63	0.079 (.035)	0.076 (.031)

* Un locus es considerado polimórfico si la frecuencia de alelo más común no excede del 95%

() Error estandar

Tabla III.- Prueba de bondad de ajuste "ji-cuadrada para los loci polimórficos y valor estadístico "D" del camarón rosado, Penaeus brevirostris del bolto de California.

locus	ji-cuadrada	significancia	valor D
ADP-3	15.169	***	+0.691
EST-1	0.028	0	+0.019
EST-2	6.203	**	-0.424
EST-3	1.997	0	-0.234
EST-4	0.875	0	+0.176

Niveles de significancia:

- 0 no significativo
- * 5% significativo
- ** 1% muy significativo
- *** .1% altamente significativo

Valor del signo:

- deficiencia de heterocigotos
- + exceso de heterocigotos

DISCUSION

Variación genética

El valor de polimorfismo obtenido en este estudio para el camarón rosado (15.63%) es muy parecido a los encontrados por otros investigadores que han trabajado con peneidos. Mulley y Latter (1979) encontraron un polimorfismo de 14% en promedio para las especies de camarones del Indo-Pacífico, Maqueda-Cornejo (1990) reporta un promedio de 20.95% para *P. stylirostris* de la parte norte del Golfo de California, Torre-Cueto (1991) de 9.38% para la especie de *P. californiensis* de la parte de la boca de dicho golfo.

Los valores más altos obtenidos para estas especies las presenta *P. japonicus* con 39% de loci polimórficos (De Matthaeis, *et al.* (1983); estos valores son aún inferiores que el promedio para los invertebrados marinos que es de 43.9% (Ayala y Kiger, 1984), lo cual sitúa a estos organismos como de baja variabilidad.

Por otra parte, la heterocigosis observada fue de 0.079 ± 0.035 y la heterocigosis esperada de 0.076 ± 0.031

(tabla II). Al comparar los valores de las diferentes especies del género *Penaeus* en el Golfo de California encontramos que existe una heterogeneidad entre ellos, para el caso del camarón café, *P. californiensis*, los valores reportados por Torre-Cueto (1991) $H_o=0.023$ y $H_e=0.030$ están muy por debajo de los encontrados para esta especie. Para *P. stylirostris*, Maqueda-Cornejo (1990) reporta valores con poca diferencia a los obtenidos para el camarón rosado, $H_o=0.054$ y $H_e=0.090$.

Esta variación de valores posiblemente sea debida a los diferentes habitats donde se desarrollan estas especies, pues generalmente el camarón rosado se encuentra en aguas profundas (± 80 m) aunque se ha reportado en proporciones bajas dentro de aguas continentales en estadio juvenil (Cobo y Loesch, 1966; citados por Rodríguez de la Cruz, 1976) y en estadios larvarios (Cabrera-Jiménez, 1983), en cambio, el camarón azul es más costero y se encuentra en aguas someras desde su estadio larval hasta su estado adulto (Rodríguez de la Cruz, 1976). Por otra parte, el camarón café es una especie que realiza su ciclo biológico en el mar aunque ocasionalmente entra en aguas interiores (Vázquez, 1976), pero se encuentra a menor profundidad que el rosado.

Entre el grupo de peneidos, el nivel de heterocigosis es extremadamente bajo, Mulley y Latter, (1980), reportan valores muy bajos para 13 especies de peneidos de Australia con valores de heterocigosis que van de 0.006 a 0.033. Lester (1979) encontró para especies de camarones comerciales del Golfo de México valores en promedio de 0.081. Posteriormente (Lester, 1983) al trabajar con especies del Pacífico oriental reportó valores de 0.02 para *P. vannamei* y 0.06 para *P. stylirostris*. Los valores más altos reportados a la fecha para alguna especie de camarones es el reportado por De Matthaeis, et al. (1983) con valores de 0.12 para la especie de *P. japonicus*.

El valor de la heterocigosis entre las poblaciones varía considerablemente. Se encuentran menores variaciones entre los vertebrados (6% en promedio) y mayores entre los invertebrados (15% en promedio, Selander y Kaufman, 1973); entre estos últimos tenemos a los invertebrados marinos para los cuales el promedio es de 12.4 % (Ayala y Kiger, 1984), sin embargo existe mucha variación en el grupo, se encuentran valores muy bajos como de $H=0.006$ para una especie de *Penaeus* en Australia (Mulley y Latter, 1979) y valores altos reportados para *Tridacna maxima* de $H=0.22$ (Hedgecock, et al., 1977).

Para tratar de explicar las diferencias en variabilidad genética existen varias teorías. La teoría del grano ambiental (Levins, 1968, citado por Valentine, 1980) sugiere que los organismos más grandes, más móviles y con mayor control homeostático tienden a experimentar el ambiente como de grano fino y, por consiguiente su estrategia óptima es más a menudo un fenotipo único especializado frente al conjunto de condiciones que se encuentren con mayor frecuencia, en cambio, los organismos más pequeños, menos móviles y con menor control homeostático experimentan el ambiente como de grano grueso, y desarrollan morfos especializados existentes en proporciones que dependen de la frecuencia de distintas zonas del ambiente. Barnes (1985) menciona que entre los grandes crustáceos marinos se encuentran los camarones, además son organismos altamente móviles por lo que puede suponerse que estas especies pueden considerarse relativamente de grano fino.

Valentine (1980) menciona que en medios donde hay una variación temporal amplia en los alimentos, los organismos son menos selectivos en la obtención del mismo, lo cual les permite aprovechar recursos que en periodos de abundancia no son utilizados; esta estrategia adaptativa podría ubicarse claramente como de grano fino. Los camarones por

su ciclo de vida de alta dispersión y por ser animales omnivoros tienen gran variación alimenticia lo que los situa como organismos generalistas, y por lo tanto presentan una baja variabilidad genética.

Otra posible causa de la variación genética se discute con base en la función de los diferentes sistemas enzimáticos. Existen dos hipótesis que conciernen el papel fisiológico del polimorfismo enzimático; la primera de Gillespie y Kojima (1968) propone que algunas clases de enzimas pueden ser más variables que otras y sugiere que los niveles de polimorfismo enzimático puede ser reflejo de variaciones ambientales en los sustratos, mencionan que hay una menor variabilidad en enzimas que metabolizan la glucosa que en las enzimas con sustratos no específicos. Esto lo atribuyen a una mayor diversidad de sustratos, muchos de ellos provenientes del medio externo.

Johnson (1974) señala también que las enzimas de amplia especificidad, con sustratos del medio externo, son mucho más variables que aquellas que utilizan sustratos específicos, la segunda hipótesis propuesta por Johnson (1974) menciona que el polimorfismo enzimático esta asociado con reacciones reguladoras del metabolismo; aquellas enzimas que ejercen un control más agudo sobre el

flujo a través de las vías metabólicas serían más sensitivas individualmente para sitios de acción de las fuerzas de selección, aquellas reacciones que críticamente afectan al flujo deberan ser los objetos más sensibles de la selección. Si los polimorfismos enzimáticos reflejan selección, entonces deberían producirse en los pasos limitadores de la velocidad, las reacciones reguladoras limitadoras de la velocidad presentan congruentemente mucho más polimorfismo que aquellas que no son reguladoras; esta hipótesis no fue apoyada por Ayala y Powell, 1972, (citados por Selander, 1980) quienes la consideran mal concebida puesto que los criterios para clasificar a las enzimas reguladoras y no reguladoras nos son claros.

En este trabajo se encontro que los loci enzimáticos con sustratos no especificos, ACP-3, EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, presentaron polimorfismo (con el criterio del 95%), lo que concuerda con la hipótesis de Gillespie y Kojima (1968) y Johnson (1974); los loci AKP-1 y AKP-3 no presentaron polimorfismo para esta especie, aunque son enzimas del mismo grupo, sin embargo para las especies de *P. californiensis* y *P. stylirostris* (Torre-Cueto, 1991 y Maqueda-Cornejo, 1990; repectivamente) estos loci sí mostraron polimorfismo.

Entre las enzimas que metabolizan glucosa se encuentran G6P, GOT, GPD, IDH, MDH, MEZ, PGM, (para este estudio); no presentaron variación al resultar todas monomórficas, esto se esperaba de acuerdo a la hipótesis de Gillespie y Kojima (1968).

Las enzimas reguladoras (ADH, G6P, GPD, MEZ, XDH, en este trabajo) y las no reguladoras (LDH, MDH, para este estudio) no presentaron variación génica alguna, esto no apoya la hipótesis propuesta por Johnson (1974) con la cual se esperaba que las enzimas reguladoras presentaran más variación que las no reguladoras.

La diferencia entre la heterocigosis promedio observada y promedio esperada fue ligeramente inclinada hacia la observada (tabla II), esto implica un exceso de heterocigotos aunque no significativo. Al observar el valor estadístico D en los loci polimórficos (tabla III) de los cuales ACP-3 presenta exceso de heterocigotos altamente significativo estadísticamente y únicamente el locus EST-2 presentó deficiencia de heterocigotos muy significativas estadísticamente .

Los terminos "exceso y deficiencia heterocigótica" se refieren a un locus polimórfico en el cual las frecuencias

heterocigóticas observadas son mayores o menores, respectivamente que las frecuencias heterocigóticas esperadas bajo el equilibrio de la ley de Hardy-Weinberg, dicha ley dice que, en ausencia de procesos modificadores; mutación, migración, deriva, y selección; la frecuencia de los genes permanecen constantes de generación en generación. Pero siempre están presentes estos procesos que cambian la frecuencia de los genes, puesto que sin ellos no habría evolución (Ayala y Kiger, 1984).

El exceso de heterocigotos en el locus ACP-3 probablemente sea debido a la selección natural, la selección facilita las combinaciones genóticas favorables y elimina aquellas que no lo son, existen casos en que la selección es a favor de los heterocigotos en algunos loci, lo que conlleva a un exceso de heterocigosis en la población (Ayala y Kiger, 1984).

Las posibles explicaciones para estas deficiencias caen en varias causas de orden biológico y de orden técnico:

Presencia de alelos nulos o carencia de actividad enzimática puede ser la causa de la deficiencia de heterocigotos (Milkman y Beaty, 1970), al no presentarse la banda teñida en el gel, entonces un heterocigoto para un

alelo nulo puede ser medido como homocigoto, esto hace aumentar la frecuencia de lo homocigotos y nos conduce a un modelo de alta tasa de mutación o coeficientes de selección a favor de los heterocigotos con alelos nulos (Zouros *et al.*, 1980). Esta posibilidad de explicación a la deficiencia es muy poco probable para los datos presentados aquí, puesto que sólo aparecen deficiencias en un locus de los 5 loci polimórficos (tabla III). Hasta la fecha no se han reportado deficiencias de heterocigotos por causa de alelos nulos en las especies de camarón.

El intracruzamiento entre organismos emparentados o endogamia, puede ser una causa de deficiencia de heterocigotos. Una característica del intracruzamientos es que afecta a todos los loci en una manera uniforme (Zouros *et al.*, 1980). Este hecho permite descartar esta hipótesis pues como se dijo anteriormente no todos los loci polimórficos presentaron deficiencias, además la estrategia reproductiva de la especie, con fecundación externa y un estadio larval planctónico hacen muy improbable este proceso.

El efecto de Wahlund, se refiere a un sesgo estadístico hacia la deficiencia de heterocigotos cuando los organismos estudiados en una población provienen de

subpoblaciones con regimenes reproductores separados y posean frecuencias alélicas diferentes en por lo menos, en algunos loci (Tracey *et al.*, 1975; citados por Rosa-Vélez, 1986), podría ser aplicado a esta población puesto que los juveniles de las especies de camarón se crían en lagunas costeras y posteriormente, en estado adulto, salen al mar a reproducirse. Para esta especie se asume que entra a los esteros pues se han encontrado postlarvas en las bocas de los ríos y esteros en el Golfo de California (Cabrera-Jiménez, 1983). Esta puede ser una posible causa debido a la gran cantidad de lagunas costeras que existen en la zona de donde se obtuvieron los organismos, para comprobar esta hipótesis es necesario estudios posteriores sobre la composición genética de las subpoblaciones de estas lagunas costeras.

Otra posibilidad que la selección natural, en este caso, pueda estar actuando en contra de ciertos genotipos (Koehn y Mitton, 1972; citados por Rosa-Vélez, 1986). En algunos casos la eficacia de los homocigotos es mayor que la de los heterocigotos (Ayala y Kiger, 1984) lo que lleva a un exceso de homocigosis en la población. Para este caso el locus EST-2 (tabla III) presentó deficiencia de heterocigotos probablemente debida a la selección.

Existe una quinta posible causa en función de la resolución electroforética pobre en las tinciones histoquímicas o en las lecturas de los zimogramas, esta causa es poco posible que nos lleve a una deficiencia pues las tinciones de los loci que no revelaron se eliminaron y no se tomaron en cuenta al momento de hacerse los cálculos de variabilidad genética; respecto a las lecturas de los grupos enzimáticos que presentaron mayor problema en la interpretación de los zimogramas en base a experiencias con las primeras lecturas al inicio del proyecto como en el caso de las esterasas se aumentó el tiempo el corrimiento electroforético, para evitar una posible mala interpretación.

CONCLUSION

El camarón rosado *Penaeus brevirostris*, de una población del extremo septentrional de su distribución en el Golfo de California se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Sólo el locus ACP-3 mostró exceso de heterocigosis, altamente significativos estadísticamente, probablemente debido a la selección natural y el locus EST-2 presentó deficiencia de heterocigotos, muy significativos estadísticamente, posiblemente a causa del efecto de Wahlund y/o a la selección natural.

El nivel de variación génica de la especie se encuentra dentro del rango de variabilidad del grupo de los Peneidos hasta ahora estudiados.

LITERATURA CITADA

- Abreu, A. (1982); Population Genetics of Artemia, Tesis Doctoral, Univ. college of Swansea, 438 pp.
- Ayala, F. J. (1980); Evolución Molecular, Ed. Omega, Barcelona, Esp. 285 pp.
- Ayala, F. J. y J. A. Kiger (1984); Genética Moderna, Ed. Omega, Barcelona, Esp., 236 pp.
- Barnes, R. D. (1985); Zoología de Invertebrados, Nueva Editorial Interamericana, México 4, D.F., 826 pp.
- Cabrera-Jiménez, Jorge A. (1983); Characters of taxonomic value of Postlarvae of the shrimp *Penaeus brevis* Kingsley (Decapoda, natantia), of the Gulf of California, Mexico; Crustaceana 44 (3): 292-300.
- De Matthaeis, E., G. Allegrucci, A. Caccone, D. Cesaroni, M. Cobollis y V. Sbondoni (1983); Genetic Differentiation between *Penaeus kerathurus* y *P.*

japonicus (Crustacea, decapoda), Mar. Ecol. Prog. Ser., 12: 191-197.

Gillespie, J. H. y K. Kojima (1968); The Degree of polymorfism in Enzymes involved in energy production compared to that in noespecific enzymes in two *Drosophila ananassae* populations, Genetics, Vol 61: 582-585.

Hedgecock, D., K. Nelson, J. Simons, R. Shleser (1977); Genetic Similarity of American and European Species of lobster *Homarus*, Biol. Bull. 152: 41-50.

Johnson, George B. (1974); Enzyme Polimorfism and Metabolism, Science, Vol. 184: 28-37.

Lester, L. J. (1979); Population genetics of penaeid shrimp from 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.

Maqueda-Cornejo, Marfa M. (1990); Variación

Genética Intrapoblacional y grado de diferenciación interpoblacional del camarón azul *Penaeus stylirostris* del Golfo de California, Tesis Lic. F.C.M., UABC 71 pp.

Milkman, Roger y L. D. Beaty (1970); Large-scale electrophoretic studies of allelic variation in *Mytilus edulis*, Biol. Bull. 139: 430.

Mulley, J. C. y B. D. H., Latter (1980); Genetics variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid prawns, Evolution, 34(5): 904-916.

Nelson, K. (1977); Genetics considerations in selecting crustacean species for aquaculture, En: 8a. Asamblea anual de la Sociedad Mundial de Maricultura, San José, Costa Rica. 19 pp.

Foulik, M. D. (1957); Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffer, Nature 180: 1477-1479.

Rodríguez de la Cruz, María C. (1976); Sinopsis

biológica de las especies del género *Penaeus* del Pacífico mexicano. En: Memorias del Simposium sobre Biología y Dinámica Poblacional de camarones en Guaymas, Son., Tomo I: 282-317.

Rosa-Vélez, Jorge de la (1986); Variabilidad genética poblacional en ostiones de la especie *Crassostrea virginica* del Golfo de México, Tesis doctoral, U.N.A.M., 124 pp.

Rosa-Vélez, Jorge de la (1989); Caracterización Genética de las Poblaciones de Feneidos Comerciales del Golfo de California, Proyecto propuesto a la Dir. Gral. de Invest. Cient. y Sup. Acad., S. E. P. 19 pp.

Rosa-Vélez, Jorge de la y F., Rodríguez -Romero(1989); Enfoque genético para el análisis de poblaciones de recursos pesqueros: El caso de la población ostrícola de la laguna de Términos, Camp., en : Temas de Oceanografía Biológica en México, (Ed. Rosa-Vélez y González-Farías) U.A.B.C., 255-284.

Schaal, B. A. y W. W. Anderson (1974); An outline of Techniques for Starch gel Electrophoresis of Enzymes from American Oyster, *Crassostrea virginica*,

Gmelin, Technical Report Series No. 74-3, Georgia Marine Science Center.

Selander, R. K. (1980); Variación genética en las poblaciones naturales, En: Evolución Molecular (Ed. Ayala, F.J.), Ed. Omega, Barcelona, Esp. 21-46.

Selander, R. K., M. H. Smith, J.Y. Yang, W. E. Johnson y J.B. Gentry (1971); Biochemical Polymorfism and systematic en the genus *Peromyscus*, Variation in the old Field Mouse (*Peromyscus polionatus*), Stud. Genet. 6: 49-90.

Selander, R. K. y D. W. Kaufman (1973); Genetic Variability and Strategies of Adaptation in Animals, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 70 (6): 1875-1877.

Shaw, C. R. y A. L. Koen (1968); Starch Gel Zone Electrophoresis of enzymes, In: Chromatographic and Electrophoreis Techniques (Ed. Smith I.), Chapter 9, Vol. II, Interscience Pub. N. Y. pp 325-364.

Shaw, C. R. y R. Prasad (1970); Starch Gel

Electrophoresis of Enzymes—A Compilation of Recipes,
Bioch. Genet. 4: 297-320.

Suárez-Vásquez, A. (1989); Genética bioquímica de los caracoles de la especie *Astraea undosa* en Bahía de Todos Santos, B.C., Tesis Licenciatura F.C.M., U.A.B.C. 66 pp.

Torre-Cueto, Javier de la (1991); Variabilidad Genética del camarón café *Penaeus californiensis* Holmes, 1900 en la población de Mazatlán, Sin., Tesis Lic. F.C.M. U.A.B.C. 44 pp.

Tracey, M. L. Nelson, D. Hedgecock, R. A. Shleser y M. L. Pressick (1975); Biochemical Genetics of Lobsters: Genetic Variation and the structure of American Lobster (*Homarus americanus*) populations, J. Fish. Res. Board Can., 32: 2091-2101.

Valentine, J. W. (1980); Estrategias genéticas de Adaptación, En: Evolución Molecular (Ed. Ayala, F. J.), Ed. Omega, Barcelona, Esp. 80-97.

Vázquez H., Mariana (1976); Distribución y

Abundancia del camarón café *Penaeus californiensis* en la temporada 1974-1975, En: Memorias del Simposium sobre Biología y Dinámica Poblacional de Camarones en Guayamas, Son., Tomo I: 379-386.

Zar, Jerrold H. (1984); Bioestatistical Analysis, Prentice-Hall, Inc. 718 pp.

Zouros, E., S.M. Singh y H. E. Miles (1980); Growth rate in oysters: an overdominant phenotype and its possible explanations, *Evolution*, 34 (5): 856-867.

Zouros, E. y D. W. Foltz (1984); Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs, *Malacologia* 25 (2): 583-591.