



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

**Estudios sobre la estructura genética del camarón blanco,
(*Litopenaeus vannamei*), del Pacífico Oriental inferidos del análisis
de microsatélites y ADN mitocondrial.**

Tesis

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

Presenta

Rubén Valles Jiménez

La Paz, B. C. S., febrero del 2005.

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las ____ horas del día ____ del Mes de _____ de 2004, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

Estudios sobre la estructura genética del camarón blanco, (*Litopenaeus vannamei*), del Pacífico Oriental inferidos del análisis de microsátélites y ADN mitocondrial.

Presentada por el alumno:

Rubén Valles Jiménez

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN
Acuicultura

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su

APROBACIÓN DE LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Ricardo Pérez Enríquez
Director de tesis

Dr. Patrick Gaffney
Co-tutor de tesis

Dra. Ana Maria Ibarra Humphries
Co-tutor de tesis

Dr. Jorge de la Rosa Vélez
Co-tutor de tesis

Dr. Humberto Villarreal Colmenares
Co-tutor de tesis

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESUMEN

El camarón blanco, (*Litopenaeus vannamei*), es una de las especies comerciales más importantes del Pacífico oriental por sus pesquerías y cultivo. En México, la pesquería de camarón en el litoral del Pacífico tiene los niveles más altos de producción. Durante el 2002 las capturas de organismos de manglares, bahías y altamar alcanzaron las 25,343 , y la producción por cultivo 42,513 ton. El camarón capturado por estas pesquerías incluye principalmente cuatro especies: camarón café, (*Farfantepenaeus californiensis*), camarón azul, (*L. stylirostris*), camarón rosado, (*F. brevivirostris*) y camarón blanco, (*L. vannamei*); esta última especie es usada principalmente en el cultivo. El camarón blanco tiene un amplio rango de distribución desde el norte de México hasta el norte del Perú y habita en lagunas costeras y mar abierto. La definición genética de stocks es esencial en la pesquería de camarón blanco para el manejo y la conservación de la biodiversidad acuática, y en la acuicultura como un recurso disponible de diversidad genética para ser usado en la domesticación y selección de reproductores. El uso de marcadores genéticos ha incrementando en gran medida nuestro entendimiento de la diversidad genética y la estructura poblacional de peneidos. Recientemente, marcadores moleculares como el ADN mitocondrial (ADNmt) y los microsatélites han revelado una mayor variabilidad que las alozimas. Aunque, el camarón blanco es una especie muy importante en la pesquería y la acuicultura, la información de la diversidad y estructura genética de poblaciones naturales a través de su rango de distribución es limitada. Para evaluar la diversidad y estructura genética de *L. vannamei*, se analizaron muestras de cuatro localidades geográficamente distintas (Sinaloa, Guerrero, Guatemala y Panamá) a lo largo de su área de distribución en el Pacífico oriental con base en cinco microsatélites (*Pvan0013*, *Pvan0040*, *Pvan1003*, *Pvan1758*, *Pvan1815*), y el análisis de RFLP del ADNmt de la región control. Usando microsatélites, la diversidad genética varió entre poblaciones indicada por el promedio en el número de alelos por locus y la heterocigosidad media, en un rango de 7.4 a 8.6 y de 0.241 a 0.388, respectivamente. En 19 de 20 pruebas posibles, se observaron desviaciones significativas del Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) en las poblaciones para cada uno de los loci con excepción de Guatemala con el microsatélite *Pvan0013*, causadas por una elevada deficiencia de heterocigotos. No puede ser descartado que las desviaciones observadas de HWE en *L. vannamei* a lo largo de la costa del Pacífico podría deberse a un efecto de lotería en el éxito reproductivo del camarón. El desequilibrio por ligamiento no fue significativo en todos los pares de loci, indicando la no asociación entre genotipos. Un valor total significativo de $F_{ST} = 0.055$ (índice de diferenciación genética de subpoblaciones) indicó substancial diferenciación genética de las localidades muestreadas de *L. vannamei*. Utilizando el análisis de ADNmt-RFLP de la región control de 150 organismos investigados con cuatro endonucleasas de restricción (*Alu I*, *Taq I*, *Spe I*, *Ssp I*), fueron obtenidos un total de 48 haplotipos compuestos, 35 de ellos fueron haplotipos únicos. Un mayor número de haplotipos fue observado en Sinaloa y Guatemala, con 22 haplotipos para cada uno, que en Guerrero con 3 y Panamá 14. Los haplotipos más frecuentes fueron ACAC y CABB con el 18% y 17.3%, respectivamente; ambos presentes en la población de Guerrero que presentó únicamente tres haplotipos compuestos. El promedio de diversidad haplotípica (h) (0.823 ± 0.008) y el promedio de la diversidad

nucleotídica (π) (5.41%) fueron altos, los valores más bajos se encontraron en Guerrero (0.543 ± 0.042 y 3.72%), respectivamente. Un análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró diferencias significativas en la variación geográfica de las frecuencias haplotípicas entre localidades ($\Phi_{ST} = 0.1382$, $P < 0.0001$). Ambos marcadores genéticos indicaron que las diferencias genéticas entre poblaciones no se explican por el aislamiento geográfico. Los resultados obtenidos de este estudio indican que las localidades analizadas de *L. vannamei* en el Pacífico oriental son diferentes genéticamente y por lo tanto deberían ser tratadas como poblaciones separadas. La diferenciación genética entre las poblaciones analizadas pueden ser el resultado de uno, o la combinación de varios factores ambientales (ej. corrientes, frentes) y biológicos (ej. comportamiento reproductivo) responsables de la fragmentación del hábitat del camarón blanco, que pueden estar actuando como barreras geográficas del flujo genético y contribuyendo a la diferenciación genética de las poblaciones. El conocimiento generado por esta investigación sobre la diversidad y estructura genética de las poblaciones silvestres de *L. vannamei* serán de una gran utilidad como base para el manejo y la administración de este recurso en las actividades pesqueras y de acuicultura.

Dr. Ricardo Pérez Enríquez
Director de tesis

Palabras clave: Estructura y genética poblacional, microsatélites, ADN mitocondrial, camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT

The white shrimp, (*Litopenaeus vannamei*), is one of the most important commercial shrimp species of the Eastern Pacific with fisheries and cultured production. In México, the shrimp fisheries of Pacific litoral have the highest levels of production. During 2002 the captures from salt marshes, bays, and open sea reached 25,343 ton, and the cultured production was 42,513 ton. The shrimp captured for those wild fisheries included principally four species: brown shrimp, (*Farfantepenaeus californiensis*), blue shrimp, (*L. stylirostris*), rose shrimp, (*F. brevirostris*) and white shrimp, (*Litopenaeus vannamei*); this last species is the main one used in culture. White shrimp has a wide range of distribution, from northern Mexico to northern Perú, and inhabits coastal lagoons and open coastal waters. The genetic definition of stocks in white shrimp is essential in fishery for resource management and conservation of aquatic biodiversity, and for aquaculture as an available resource of genetic diversity to be used in domestication and breeding selection. The use of genetic markers has greatly improved our understanding of genetic diversity and structure population in penaeids. More recently, molecular markers such as restriction fragment length polymorphism (RFLP) of mitochondrial DNA (mtDNA) and microsatellites loci have revealed more variability than allozymes. Still, in spite of the importance of white shrimp for fisheries and aquaculture activities, information of genetic diversity and population genetic structure of natural populations throughout its distributed range is limited. In order to evaluate the genetic diversity and population genetic structure of wild *L. vannamei*, samples from four geographically distant locations (Sinaloa, Guerrero, Guatemala y Panamá) along part of its area of distribution in the Eastern Pacific were analyzed based at five microsatellite loci (*Pvan0013*, *Pvan0040*, *Pvan1003*, *Pvan1758*, *Pvan1815*) and by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region. Using microsatellite loci, the genetic diversity among populations, indicated by the mean number of alleles per locus and mean observed heterozygosity, ranged from 7.4 to 8.6 and from 0.241 to 0.388, respectively. In 19 of 20 possible test, significant departures from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) were found at most locations and were caused by high heterozygote deficiencies. It can not be discarded that the observed deviation from HWE in *L. vannamei* along the Pacific coast could be due to a *sweepstakes* reproductive success effect among larval cohorts. Linkage disequilibria analyses were non-significant for all pair of loci, indicating no association between genotypes. Genetic differences between localities were detected by pairwise comparison based on allelic and genotypic frequencies, with exception of locus *Pvan1003*. An overall significant $F_{ST} = 0.055$ (index of genetic differentiation of subpopulations) indicates substantial genetic differentiation of *L. vannamei*. For mtDNA-RFLP analysis a total of 150 organisms were surveyed with four restriction endonucleases (*Alu I*, *Taq I*, *Spe I*, *Ssp I*), yielding a total of 48 composite genotypes, 35 of them were carried by single individuals. Higher number of haplotypes was observed in Sinaloa and Guatemala, both with 22 composite haplotypes, than in Guerrero with 3 and Panama 14. The most frequent haplotypes were ACAC and CABB with 18% and 17.3%, respectively, both in the Guerrero sample that had only three composite haplotypes. The average haplotype diversity (h) (0.823 ± 0.008) and average nucleotide diversity (π) (5.41%) were high, lowest values

was found in Guerrero (0.543 ± 0.042 and 3.72% respectively). An analysis of molecular variance showed significant geographic variation in the frequencies of haplotypes among localities ($\Phi_{ST} = 0.1382$, $P < 0.0001$). Both genetic markers indicated that population differentiation does not follow an isolation-by-distance model. The results of this study indicated that *L. vannamei* localities are genetically different in the Eastern Pacific and therefore should be treated as separate populations. This population differentiation may be maintained by one or the combination of environmental (e.g. currents, fronts) and biological (e.g. reproductive behavior) factors, responsible for the habitat fragmentation of white shrimp, acting as barriers to genetic flow and contributing to the genetic differentiation of the populations. The knowledge generated for this study on the genetic diversity and population genetic structure of *L. vannamei* populations will be of utility as a base for the management and administration of this resource in fisheries and aquaculture activities.

DEDICATORIA

A mi esposa, Martha Patricia y a mi hija, Sara.

A mis padres, Rubén Valles Morales y a Victoria Jiménez Ruiz.

A mis hermanos, Guadalupe, José Juan, Tomás, Miguel y Teodora.

A mis dos grandes familias, los Valles y los Jiménez.

CONFORMACIÓN DE COMITÉ

La presente tesis fue dirigida por:

Dr. Ricardo Pérez Enríquez Genética Acuícola. CIBNOR.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Ricardo Pérez Enríquez Genética Acuícola. CIBNOR.

Dra. Ana María Ibarra Humphries Genética Acuícola. CIBNOR.

Dr. Patrick Gaffney College of Marine Studies.
University of Delaware.

Dr. Humberto Villarreal Colmenares Acuicultura. CIBNOR.

Dr. Jorge de la Rosa Vélez Facultad de Ciencias Marinas. UABC.

El comité revisor de tesis estuvo integrado por:

Dr. Ricardo Pérez Enríquez Genética Acuícola. CIBNOR.

Dra. Ana María Ibarra Humphries Genética Acuícola. CIBNOR.

Dr. Patrick Gaffney College of Marine Studies.
University of Delaware.

Dr. Humberto Villarreal Colmenares Acuicultura. CIBNOR.

Dr. Jorge de la Rosa Vélez Facultad de Ciencias Marinas. UABC.

El jurado de examen de grado estuvo integrado por:

Dr. Ricardo Pérez Enríquez Genética Acuícola. CIBNOR.

Dra. Ana María Ibarra Humphries Genética Acuícola. CIBNOR.

Dr. Humberto Villarreal Colmenares Acuicultura. CIBNOR.

Dr. Jorge de la Rosa Vélez Facultad de Ciencias Marinas. UABC.

Dr. Pedro Cruz Hernández Genética Acuícola. CIBNOR.

Suplente

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega Genética Acuícola. CIBNOR.

ÍNDICE GENERAL

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS.....	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
CONFORMACIÓN DE COMITÉ.....	vii
ÍNDICE.....	viii
PREFACIO.....	xi
GLOSARIO.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABLAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Justificación.....	5
Hipótesis general.....	6
Objetivo general.....	6

CAPÍTULO 1

ADN mitocondrial del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*): secuenciado y polimorfismo de los fragmentos 16S, COI, COIII, ATP-8 y ATP-6, y Región Control.

Introducción.....	7
Materiales y métodos.....	10
<i>Diseño de iniciadores.....</i>	10
<i>Amplificación de los fragmentos de ADN mitocondrial.....</i>	11
<i>Secuenciado de los fragmentos del ADN mitocondrial.....</i>	12
<i>Análisis de las secuencias de ADN mitocondrial.....</i>	12
<i>Análisis de RFLP.....</i>	12

Resultados.....	13
Discusión.....	15

CAPÍTULO 2

Estructura genética de las poblaciones del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de México a Panamá: variación de loci Microsatélites.

Introducción.....	17
Materiales y métodos.....	19
<i>Sitios de colecta y conservación de las muestras</i>	19
<i>Extracción de ADN</i>	20
<i>Amplificación de microsatélites</i>	20
<i>Análisis de microsatélites</i>	22
<i>Variación de microsatélites y desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg</i>	22
<i>Diferenciación genética entre localidades</i>	22
Resultados.....	24
<i>Variación de microsatélites y desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg</i>	24
<i>Diferenciación genética entre localidades</i>	28
Discusión.....	31
<i>Diversidad genética</i>	31
<i>Desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg</i>	31
<i>Estructura genética y aislamiento por distancia</i>	34

CAPÍTULO 3

Análisis de RFLP del ADN mitocondrial de la región control en camarón blanco, (*Litopenaeus vannamei*), de cuatro localidades del Pacífico Oriental.

Introducción.....	35
Materiales y métodos.....	36
<i>Sitios de colecta y conservación de las muestras</i>	36
<i>Secuenciado y amplificación de ADN mitocondrial</i>	37

<i>Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos de Restricción.....</i>	37
<i>Análisis de los datos.....</i>	38
<i>Análisis poblacional.....</i>	39
Resultados.....	40
<i>Diversidad genética intra e inter poblacional.....</i>	40
<i>Análisis poblacional.....</i>	44
Discusión.....	46
DISCUSIÓN GENERAL.....	50
<i>Diversidad genética.....</i>	50
<i>Estructura genética.....</i>	51
<i>Implicaciones de los resultados en la pesquerías y la</i> <i>acuicultura.....</i>	55
CONCLUSIONES.....	57
RECOMENDACIONES.....	58
REFERENCIAS.....	59
APÉNDICES.....	67

PREFACIO

La presente tesis esta basada en los siguientes artículos

1. Valles-Jimenez, R., Cruz, P., and Perez-Enriquez, R. (2004). Population genetic structure of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology* 5: 475-484.
2. Valles-Jimenez, R., Gaffney, P. M., and Perez-Enriquez, R. (2004). RFLP analysis of the mtDNA control region in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) populations from the eastern Pacific. *Marine Biology* (sometido).

La información generada se presentó en foros nacionales e internacionales

1. Valles-Jimenez, Ruben y Perez-Enriquez, Ricardo. "Population genetic structure of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, along pacific coast from Mexico to Panama: DNA microsatellite variation". International Symposium Genetics in Aquaculture (ISGA) GENETICS IN AQUACULTURE VIII. 9-15 November, 2003.
2. Valles-Jimenez, Ruben y Perez-Enriquez, Ricardo. "Análisis de la estructura poblacional y diversidad genética del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de cuatro localidades en el Pacífico Oriental usando microsátélites y ADN mitocondrial". Tercer Foro de Camarón del Pacífico. Mazatlán, Sinaloa del 27 al 29 de septiembre de 2004.

GLOSARIO

ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
Alelo	Forma alternativa de un gen en un locus.
Alineamiento	Apareamiento de dos secuencias homólogas para localizar los sitios variables.
Alozimas	Forma alélica de una enzima.
Amplificación	Incremento en el número de copias de un gen o de una secuencia de ADN.
Deriva genética	Cambios de las frecuencias alélicas en poblaciones de tamaño efectivo pequeño a causa de fluctuaciones al azar.
Desequilibrio gamético	Asociación no azarosa de alelos de diferentes loci dentro de gametos.
Distancia genética	Medidas del grado de la magnitud de las diferencias genéticas entre individuos, poblaciones o especies. Medida del grado de sustituciones por nucleótido entre dos secuencia homólogas de ADN.
Diversidad genética	Medida de la variabilidad genética en una población.
Efecto Wahlund	Fenómeno donde el promedio de la heterocigosidad decrece cuando dos poblaciones se juntan.
Equilibrio Hardy-Weinberg	Condición bajo la cual las frecuencias genotípicas de una población diploide son iguales al producto de las frecuencias alélicas involucradas.

Flujo genético	Entrecruzamiento o mezcla genética entre poblaciones Mendelianas.
Frecuencia alélica	Proporción de un alelo relativo a todos los alelos de un locus dentro de una población.
Genotipo	Composición alélica específica de un organismo.
Haplotipo	Una secuencia de nucleótidos, sitios de restricción, marcadores genéticos heredados como una unidad ligada de un padre.
Heterocigosidad	Medida de la variación genética en una población calculada como la frecuencia media de heterocigotos entre todos los loci (heterocigosidad observada) o como la frecuencia media de heterocigotos esperados en una población en Equilibrio de Hardy-Weinberg (heterocigosidad esperada).
Heterocigoto	Un individuo diploide con diferentes alelos en un locus.
Homocigoto	Un individuo diploide con alelos idénticos en un locus.
Iniciador	Oligonucleótido de una sola hebra de alrededor de 20 bp., secuencia con la que se inicia la replicación del ADN mediante la polimerasa. También se le denomina cebador o <i>Primer</i> (en inglés)
Loci	Plural de locus
Locus	Sitio de un cromosoma donde se localiza un gen particular o segmento de ADN.
Microsatélite	Fragmentos de ADN de secuencias cortas (2 a 6 bp) repetidas en tandem.
Mutación	Cambio del ADN en un locus particular en un organismo
Nucleótido	Unidades monoméricas de ADN o ARN conformados por bases nitrogenadas (purinas o pirimidinas).

Panmixia	Apareamiento al azar en una población.
PCR	Del inglés <i>Polimerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa. Procedimiento que incluye ciclos múltiples de desnaturalización, renaturalización y síntesis de polinucleótidos que amplifica una secuencia particular de ADN.
Población	Grupo completo de organismos de un tipo; grupo de planta o animales que tienen el potencial de entrecruzarse.
Polimorfismo	La coexistencia de dos o más alelos en un locus determinado.
Secuencia consenso	Una secuencia que representa los nucleótidos comunes y polimórficos de varias secuencia homologas.
Secuenciación	Establecimiento del orden de las bases nucleotídicas de un fragmento de ADN
Stock	Anglicismo con el cual se hace referencia a una población en términos pesqueros.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Serie histórica de producción de camarón en el litoral Pacífico, y cultivo en México.....	1
Figura 2	ADN mitocondrial circular de <i>Penaeus monodon</i> (GenBank NC_002184).....	7
Figura 3	Sitios de colecta de las muestras de <i>Litopenaeus vannamei</i> en el Pacífico Oriental.....	19
Figura 4	Histogramas de las frecuencias alelicas de cada uno de los microsatélites por localidad de <i>Litopenaeus vannamei</i>	27
Figura 5	Aislamiento por distancia: regresión entre los valores pareados de F_{ST} y el logaritmo de la distancia geográfica entre localidades de <i>Litopenaeus vannamei</i>	30
Figura 6	UPGMA dendrograma de la relación entre localidades de <i>Litopenaeus vannamei</i> basadas en la divergencias nucleotídicas.....	30
Figura 7	Distribución de las diferencias pareadas entre los haplotipos del ADN mitocondrial de la región control para <i>Litopenaeus vannamei</i> . Las barras negras representan la distribución observada. La línea sólida representa la distribución esperada bajo un modelo de rápida expansión. i : número de diferencias entre haplotipos. $F(i)$: frecuencia de los haplotipos pares con i diferencias.....	43
Figura 8	Aislamiento por distancia: regresión entre los valores pareados de Φ_{ST} y el logaritmo de la distancia geográfica entre localidades de <i>Litopenaeus vannamei</i>	45
Figura 9	UPGMA dendrograma de la relación entre localidades de <i>Litopenaeus vannamei</i> basadas en la divergencias nucleotídicas.....	45
Figura 10	Sitios de colecta de muestras de <i>Litopenaeus vannamei</i> (●). Corrientes más importantes en el Pacífico Oriental (⇐), C.C.E.: Contra Corriente Ecuatorial. Vientos (↓).....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Localidades de colecta de <i>Litopenaeus vannamei</i> en el Pacífico Oriental.....	20
Tabla 2	Variabilidad genética de <i>Litopenaeus vannamei</i> de cuatro localidades con cinco microsatélites.....	25
Tabla 3	Comparación del desequilibrio genotípico por pares de locus de <i>Litopenaeus vannamei</i>	26
Tabla 4	Estadísticos F de cuatro localidades de <i>Litopenaeus vannamei</i>	28
Tabla 5	Estimaciones pareadas de F_{ST} entre localidades de <i>L. vannamei</i>	29
Tabla 6	Valores de P para las comparaciones pareadas de las frecuencias alélicas y genotípicas (en paréntesis) entre localidades de <i>Litopenaeus vannamei</i>	29
Tabla 7	Distribución geográfica de los haplotipos compuestos de ADNmt entre localidades de <i>L. vannamei</i> . Las letras denotan los patrones de los fragmentos de ADNmt producidos por la digestión de productos de PCR con las siguientes enzimas de restricción: <i>Alu</i> I, <i>Taq</i> I, <i>Spe</i> I y <i>Ssp</i> I.....	41
Tabla 8	Diversidad haplotípica y nucleotídica dentro cuatro localidades de <i>L. vannamei</i>	42
Tabla 9	Porcentajes de diversidad nucleotídica (bajo la diagonal) y divergencia nucleotídica estimadas entre pares de localidades de <i>L. vannamei</i> (arriba de diagonal).....	42
Tabla 10	Análisis molecular de varianza (AMOVA) de las distancias genéticas entre haplotipos de ADN mitocondrial de <i>L. vannamei</i>	44
Tabla 11	Comparaciones pareadas de ϕ_{ST} entre localidades de <i>L. vannamei</i>	44

LISTA DE ABREVIATURAS

π	Diversidad nucleotídica
χ^2	Estadístico Chi-cuadrada
μg	Microgramo
μl	Microlitro
A	Alelo
a_e	Alelo efectivo
D	Deficiencia o exceso de heterocigotos
F_{IS}	Medida de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg dentro de las subpoblaciones.
F_{IT}	Medida de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg en el total de la población.
F_{ST}	Medida de la diferenciación sobre las poblaciones.
HCl	Ácido clorhídrico
H_e	Heterocigosidad esperada
H_o	Heterocigosidad observada
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
kb	Kilo base
M	Molar
MA	Miliampers
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
pb	Pares de bases
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
U	Unidades
UV	Ultravioleta
μM	Micromolar

INTRODUCCIÓN GENERAL

La pesquería y el cultivo de diversas especies de camarones en el mundo han sido muy importantes económicamente en los últimos 30 años (Benzie, 2000), y en México estas actividades no han sido la excepción (Rodríguez-Romero y Gasca, 1999). La producción pesquera del camarón es muy importante en el litoral del Pacífico mexicano (Fig. 1). En el 2002 la pesquería de camarón compuesta por esteros, bahías y altamar alcanzó las 25,343 toneladas; mientras que las actividades de cultivo produjeron 42,513 (SAGARPA, 2002). Dentro de esta pesquería, las principales especies que se capturan son: camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*), camarón rosado (*F. brevisrostris*), camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) y camarón blanco (*L. vannamei*), estas especies contribuyen con más del 90% de la captura total (SAGARPA, 2004). El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), además de ocupar el segundo lugar en importancia debido a sus volúmenes de captura dentro de la pesquería, es la especie predominante en acuicultura (Fig. 1) (Martínez-Córdova y Campaña-Torres, 1999).

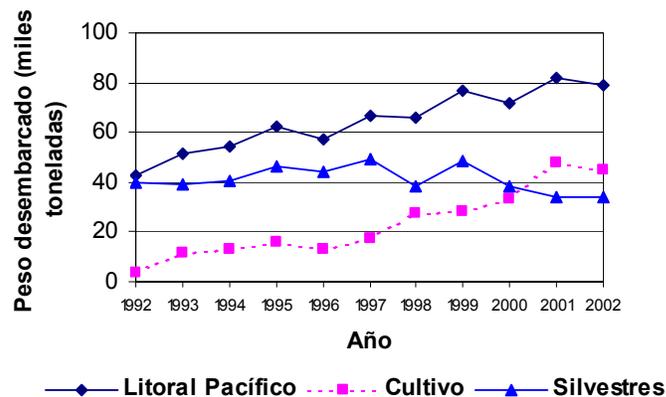


Figura 1. Serie histórica de producción de camarón en el litoral Pacífico, y cultivo en México.

Establecer la diversidad y estructura genética de los organismos marinos es uno de los aspectos de mayor interés de la genética de poblaciones (Hedgecock, 1994). En especies pesqueras la diversidad genética entre y dentro de poblaciones se ha estudiado por medio de marcadores moleculares (Carvalho y Hauser, 1994; Park y Moran, 1994). Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético (ej. genes, fragmentos de ADN), estos marcadores se consisten en aloenzimas, en secuencias de ADN (ej. genes nucleares, ADN mitocondrial), en el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de ADN (ej. minisatélites, microsátélites), y en otros métodos para detectar variaciones en la secuencia de ADN (ej. polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP), análisis rápido de mutaciones) (Féral, 2002).

Generalmente, se piensa que muchas especies marinas, incluyendo los peneidos, tienen una alta capacidad de dispersión a través de su rango de distribución geográfica durante su fase de larva planctónica, y que esto produciría una homogeneización de la población (panmixia) (Féral, 2002). Sin embargo, se sabe que el hábitat costero para algunas especies de peneidos raramente es continuo, y que una diversidad genética heterogénea podría ser generada por factores ambientales (ej. corrientes, barreras físicas) y biológicos (ej. comportamiento reproductivo) (Féral, 2002). De hecho, se ha observado estructura genética en algunas especies de peneidos y se ha propuesto que ésta es determinada por factores ambientales (Aubert y Lightner, 2000; De la Rosa et al., 2000; Garcia-Machado et al., 2001; Xu et al., 2001).

En décadas recientes por causa del aumento de las poblaciones humanas y de sus actividades, muchas especies de animales han sido extintas o puestas en peligro de

extinción (Hedrick y Miller, 1992; Beardmore et al., 1997). No solamente la conservación directa de las especies y de su hábitat es de vital importancia, sino también la conservación de las poblaciones naturales y de cautiverio (Hedrick y Miller, 1992). La definición de las unidades de manejo de las especies explotadas en actividades pesqueras basadas en el análisis genético debería ser una prioridad en la toma de decisiones de un recurso (Thorpe, et al., 2000; Ward, 2000; Féral, 2002). La comparación de diferentes stocks silvestres de camarones por medio de las evaluaciones en la variación genética servirá en los programas que pretendan conservar la diversidad genética de las poblaciones (Hedrick y Miller, 1992; Benzie, 2000).

El uso de marcadores genéticos ha permitido el entendimiento de la estructura poblacional en peneidos (Lester y Pante, 1992; Benzie, 2000). El análisis de alozimas ha sido el método más comúnmente usado para determinar los niveles de variación y el grado de subdivisión de varias especies de peneidos (Lester y Pante, 1992; De la Rosa et al., 2000; Garcia-Machado et al., 2001). Sin embargo, muchos de los trabajos iniciales con alozimas, generalmente mostraban una falta de diferenciación geográfica entre poblaciones (ej. Lester, 1979; Mulley and Latter, 1981). Los bajos niveles de variación genética observados en peneidos con alozimas es un fenómeno común observado en otros decápodos (Hedgecock et al., 1982). Los marcadores moleculares como RFLP-ADNmt (Benzie et al., 1993; Klinbunga et al., 1999, 2001; Garcia-Machado et al., 2001), RAPDs (Aubert y Lightner, 2000; Benzie, 2000), y microsatélites (ej. Wolfus et al., 1997; Brooker et al., 2000; Supungul et al., 2000), han revelado mayor variabilidad genética que las alozimas.

A pesar de la gran importancia económica que tiene el camarón blanco (*L. vannamei*), el conocimiento de la estructura y diversidad genética de las poblaciones naturales a través de su rango de distribución es escaso. Estudios con alozimas y microsatélites se han realizado en camarón blanco para conocer la diversidad genética (Garcia et al., 1994; Wolfus et al., 1997; De la Rosa-Vélez, 1999) y la estructura poblacional (Sunden y Davis, 1991). Sin embargo, estos estudios se han enfocado en poblaciones de acuicultura (Garcia et al., 1994) o en un número muy reducido de muestras de organismos silvestres (Sunden y Davis, 1991; Wolfus et al., 1997; De la Rosa-Velez, 1999). Usar marcadores genéticos variables como los microsatélites y ADN mitocondrial pueden dar una mayor información de la variación genética de las poblaciones de camarón blanco.

Dentro de este trabajo, se presentan los resultados del análisis de la diversidad y estructura genética del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en cuatro localidades del Pacífico Oriental mediante el uso de microsatélites y ADN mitocondrial. En el capítulo 1, se describe el análisis del polimorfismo de diferentes fragmentos de ADN mitocondrial. Por medio de iniciadores desarrollados a partir de secuencias de especies cercanas genéticamente al camarón blanco, se amplificaron las regiones: subunidad grande de rRNA (16S), Citocromo c oxidasa (COI y COIII), subunidad dinucleótido nicotinamida adenina (ATP-8 y ATP-6), y región control del ADNmt, con el objetivo de encontrar una región polimórfica útil para realizar estudios de genética poblacional. En el capítulo 2, se muestran los resultados del análisis de diversidad y estructura genética del camarón blanco llevados a cabo mediante cinco microsatélites. Además, en este capítulo se discuten las posibles causas de la elevada deficiencia de heterocigotos observada en las poblaciones estudiadas.

Para finalizar, en el capítulo 3 se muestran los resultados del análisis de diversidad genética determinada mediante la aplicación de la técnica del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción de la región control del ADN mitocondrial (RFLP-ADNmt) utilizando cuatro enzimas de restricción.

Justificación

Las pesquerías de organismos silvestres están lejos de ser ajenas a los efectos de la sobreexplotación, pérdida de hábitat, enfermedades, invasiones; muchos stocks de especies comerciales se han reducido en sus niveles de producción o han desaparecido. Actualmente, el uso de las tecnologías genéticas dentro del manejo de las pesquerías se ha visto como una necesidad para la definición de poblaciones, y así, mejorar la administración de las pesquerías actuales para ser utilizadas por largo tiempo, y también, para ayudar a recuperar las poblaciones agotadas (Ward, 2000). El uso de marcadores moleculares más variables que las alozimas, tales como los microsátélites y el ADN mitocondrial son una de las herramientas más útiles para determinar la variación genética de las especies.

Con el propósito de ampliar el conocimiento sobre la diversidad y estructura genética del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), se hacen necesarios los estudios genéticos mediante marcadores moleculares que permitan evaluar la diversidad genética intra-poblacional de la especie a lo largo del área de su distribución.

Hipótesis general

Considerando la amplia distribución del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en el Pacífico Oriental y que en ella se presenta una gran variación de factores ambientales (corrientes, vientos, temperatura, etc.), los organismos de localidades geográficamente distintas son diferentes genéticamente.

Objetivo general

-Determinar la diversidad y estructuración genética de cuatro localidades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en el Pacífico Oriental.

Objetivos particulares:

- Determinar la secuencia nucleotídica de los fragmentos de ADN mitocondrial: 16S, COI, COIII, ATP-8-ATP-6 y región control del camarón blanco, e identificar los sitios polimórficos.
- Determinar la diversidad y estructura genética del camarón blanco mediante el uso de microsatélites.
- Determinar la diversidad y estructura genética del camarón blanco usando la técnica del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de la región control del ADN mitocondrial.

Capítulo 1

ADN mitocondrial del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*): secuenciado y polimorfismo de los fragmentos 16S, COI, COIII, ATP-8-ATP-6, y Región Control.

Introducción

El ADN mitocondrial en la mayoría de los animales multicelulares consiste de una cadena circular de ADN, con excepción de los cnidarios donde es lineal. En general el tamaño del ADN mitocondrial varía de 14 a 17 kb. Por ejemplo, en la mosca *Drosophila subobscura* es de 15.8 kb, en humanos de 16.6 kb (Castro et al., 1998), y en el camarón *Penaeus monodon* es de aproximadamente 16 kb (Fig. 2) (Wilson et al., 2000). Aun cuando existen genomas mitocondriales más grandes, producto de duplicaciones, el contenido en su número de genes no varía. El ADN mitocondrial codifica para 37 genes, 13 genes que codifican para proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa (COI-III, ATP-6 y 8, NADH 1-6),

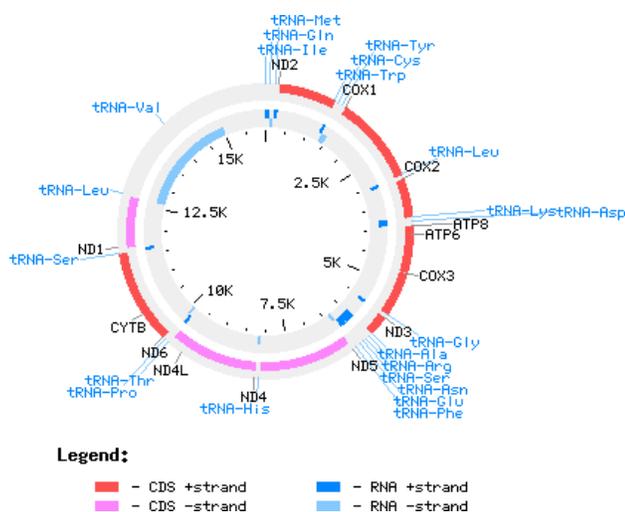


Figura 2. ADN mitocondrial circular de *Penaeus monodon* (GenBank NC_002184).

22 ARNt de transferencia y 2 ARNr ribosomales (las unidades 12S y 16S) (Harrison, 1989). Además de estos genes existe una región grande que no codifica (región control) y que se sabe contiene elementos implicados en la replicación y transcripción de la molécula; esta región es rica en su contenido de nucleótidos A y T. Es conocido que el ADN mitocondrial evoluciona de 5 a 10 veces más rápido que el genoma nuclear, siendo esta evolución en términos de sustitución de nucleótidos, pero el arreglo espacial y tamaño del genoma mantiene un alto grado de conservación entre especies de distintos niveles taxonómicos, tales como vertebrados, insectos y equinodermos. Consecuentemente, muchos de los genes mitocondriales han sido utilizados para examinar relaciones filogenéticas entre especies, géneros y familias (Hwang y Kim, 1999). Mientras que los genes 12S y 16S han sido muy utilizados para los estudios de filogenia entre familias y géneros, la región control, altamente variable entre individuos, ha sido utilizada para estudios de filogenia y de estructura de poblaciones.

En particular, en poblaciones naturales de camarones se ha estudiado la variación del ADN mitocondrial por medio del uso de enzimas de restricción mediante la técnica de RFLP (polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción) (Bouchon et al., 1994; Klinbunga et al., 2001). Para ello, se debe realizar el aislamiento de ADN mitocondrial total o la amplificación de algún fragmento de alguno de los genes. La variación genética entre fragmentos se puede identificar al utilizar enzimas que cortan el ADN en sitios específicos dentro del genoma y producir una serie de fragmentos, donde el número y tamaño de los fragmentos varía dependiendo de dónde ocurre el reconocimiento específico por parte de la enzima dentro de la secuencia. Los patrones de corte de estos fragmentos

sirven como marcadores genéticos de linajes y se pueden obtener medidas de diversidad genética de la comparación de fragmentos entre poblaciones.

Para la amplificación de algún fragmento de ADN mitocondrial mediante PCR se requiere de iniciadores. Existen iniciadores universales para diferentes regiones del ADN mitocondrial; sin embargo, no siempre funcionan en todas las especies, por lo que a veces se requiere del diseño particular de iniciadores para amplificar algunas regiones en particular.

Dentro del ADN mitocondrial existen regiones muy conservadas y regiones con variación. Los genes poco variables como 12S, 16S, ND2 y COI son útiles en los análisis de estudios filogenéticos (Hwang y Kim, 1999). La región con mayores variaciones nucleotídicas es la región control. Para los análisis de poblaciones se requiere que exista variación genética en los fragmentos dentro de la especie, pero que las regiones donde se ubican los iniciadores sean zonas conservadas para así poder amplificar un fragmento del ADN mitocondrial.

El conocimiento que se tiene del ADN mitocondrial en *L. vannamei* es muy escaso, solamente existen secuencias parciales en el GenBank de los genes, 16S y COI. Por ello, es necesario determinar la secuencia de los genes del ADN mitocondrial de *L. vannamei* que servirán como base para el diseño de marcadores genéticos útiles en la investigación de la estructura genética de las poblaciones silvestres y de poblaciones domesticadas de camarón blanco.

En este capítulo se describe la metodología seguida para la obtención de dichas secuencias y la determinación de los sitios polimórficos dentro de ellas.

Materiales y métodos

El análisis de ADN mitocondrial de camarón blanco se realizó en el laboratorio del Dr. P. Gaffney, en el Colegio de Estudios Marinos de la Universidad de Delaware. El ADN de camarón blanco fue extraído del tejido muscular en el laboratorio de Genética del CIBNOR (detalles en materiales y métodos del capítulo 2). Las muestras correspondieron a cuatro localidades: Sinaloa, Guerrero, Guatemala y Panamá, con 50 organismos de cada una de ellas (ver Fig. 3, en el capítulo 2).

Diseño de iniciadores

Debido a que no existían iniciadores específicos para *L. vannamei* que amplificaran fragmentos de ADN mitocondrial, se diseñaron varios pares de iniciadores a partir de las secuencias de especies cercanas (*Penaeus monodon*, *Farfantepenaeus notialis*) tomadas del GenBank. Estas secuencias se alinearon para buscar las regiones más conservadas y allí diseñar iniciadores, a los extremos de los fragmentos deseados. Este trabajo se realizó con el programa Oligo (Primer Analysis Software 6.65). En total se diseñaron 11 iniciadores, de los cuales sólo se reportan aquellos que tuvieron éxito en la amplificación (Apéndice I). También se utilizaron iniciadores diseñados y probados para amplificar la región control de algunos peneidos como *Penaeus merguensis* (Chu et al., 2003), *Farfantepenaeus aztecus* y *Litopenaeus setiferus* (McMillen-Jackson y Bert, 2003) (Apéndice I).

Amplificación de los fragmentos de ADN mitocondrial

Inicialmente se realizó un PCR de gradiente para la estandarización de las condiciones de amplificación de cada una de las regiones analizadas. Los fragmentos de ADN mitocondrial que se amplificó fueron: 16S, ND2, Cyt b, COI, COIII, ATP-6, ATP-8, y la Región Control. Los componentes de la reacción de PCR fueron: amortiguador para polimerasa (*Taq*) a 1X/ μ l, 2.0 mM de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), 0.2 mM de nucleótidos (dNTPs), 0.2 μ M de cada uno de los iniciadores (A y B), 5 U/ μ l de JumpStart *Taq* polimerasa (Sigma) y 50 ng de ADN de camarón en un volumen total de 20 μ l. La reacción de gradiente se realizó en un termociclador Stratagene RoboCycler gradient 96. Los parámetros del termociclador fueron los siguientes: 1 ciclo a 94 °C por 3 min; 35 ciclos con un desnaturalizado a 92 °C por 45 segundos, alineamiento a una temperatura en gradiente de 57 °C a 46 °C por 45 segundos y una extensión a 72 °C por 1 min; 1 ciclo final a 72 °C por 5 min. Se verificó la amplificación de ADN mitocondrial mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % a 80 V por 25 min. Se utilizó en un marcador de ADN de 100pb (MBI Fermentas) como estándar para determinar el tamaño del fragmentos amplificados. La tinción del gel de agarosa se realizó un volumen de 100 ml de TBE con bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ μ l durante 10 minutos y un lavado con agua por 10 minutos. El gel se visualizó en un transiluminador de luz UV y se fotodocumentó en un sistema Kodak *ds* Digital Science. Cuando no se obtenía amplificación satisfactoria del fragmento deseado se procedió a cambiar alguno o varios de los componentes de la reacción o de los parámetros utilizados en el termociclador con el objeto de lograr la amplificación.

Secuenciado de los fragmentos del ADN mitocondrial

Los fragmentos amplificados de ADN mitocondrial se purificaron utilizando dos métodos: 1) Por medio del Kit de purificación de productos de PCR (Qiagen PCR Purification kit, Cat. No. 28104) siguiendo el protocolo del proveedor; 2) Sistema de purificación magnético (AMPure PCR Purification, AGENCOURT Bioscience Corporation) siguiendo el protocolo del proveedor. Se realizó la cuantificación del producto limpio en un espectrofotómetro (Eppendorf, BioPhotometer). El secuenciado de los fragmentos se realizó siguiendo el protocolo de Big Dye Terminator v3.1 (Cycle Sequencing kit, AB Applied Biosystems) mediante SpectruMedix SCE2410 (Spectrumedix Corporation).

Análisis de las secuencias de ADN mitocondrial

Para el alineamiento y limpieza de las secuencias obtenidas se utilizó el programa MegAlign de DNASTAR v5.3. El arreglo de las secuencias consistió en una revisión visual base por base, al mismo tiempo se identificaron las variaciones entre secuencias. Cuando existieron variaciones en las secuencias, se utilizó el programa MapDraw de DNASTAR para identificar las posibles enzimas de restricción que reconocieran el sitio polimórfico para utilizarse en RFLP.

Análisis de RFLP

Para analizar mediante RFLP los fragmentos de ADN mitocondrial amplificados se realizó una incubación de 6 µl del producto amplificado de PCR y 6 µl de solución mezcla (4.5 µl de agua o sustrato para la enzima, 1.2 µl de amortiguador 10X de la enzima y 0.3 µl de la enzima correspondiente). Las muestras se colocaron en una tina de agua a 37 °C por 3

horas. Posteriormente, para observar los fragmentos de ADN mitocondrial producidos por los cortes de la enzima, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y se siguió el método de tinción con bromuro de etidio.

Resultados

Se secuenciaron cinco regiones de ADN mitocondrial de camarón blanco: 16S, ATP-8-ATP-6, COI, COIII y la Región control. Para el gen 16S se obtuvieron un total de 7 secuencias de aproximadamente 561pb. Estas secuencias correspondieron a dos organismos de Sinaloa, dos de Guerrero, dos de Guatemala y uno de Panamá. Las secuencias de los organismos de Sinaloa y Guerrero se secuenciaron en sentido 5'- 3' y las secuencias de Guatemala y Panamá en el sentido contrario. Este gene no presentó variación en sus secuencias entre los diferentes individuos de las diferentes muestras. La secuencia consenso se muestra en el apéndice II.

Para el gene ATP-8-ATP-6 se obtuvieron dos secuencias, correspondiendo a un individuo de Sinaloa y otro de Panamá, sus secuencias fueron en ambos sentidos. El tamaño de este fragmento fue de 1187 pb (Apéndice III) y solamente presentó una variación en la posición 923 siendo *G* en Sinaloa y *A* en para Panamá. Aunque no se encontró alguna enzima que reconociera la región variable, se realizaron pruebas de RFLP con tres enzimas: *HpyI88 I*, *Sau3A I* y *Alu I*. Se utilizaron 5 individuos de Sinaloa y 5 de Panamá, observándose el mismo patrón de corte de las enzimas en ambas poblaciones, confirmando que el contenido de sus secuencias es el mismo y que no existe variación.

Para el gen COI se obtuvieron dos secuencias, una de un individuo de Sinaloa y otra de Panamá. El tamaño del fragmento fue de 431 pb (Apéndice IV) y presentando dos sitios de variación, uno en la posición 204 donde Sinaloa presenta *A* y Panamá *G*, en la posición 241 donde Sinaloa presenta *T* y Panamá *C*. Para este fragmento, sólo en el primer sitio se encontró una enzima que pudieran cortar, sin embargo el análisis de RFLP no se realizó para este gen debido a la baja variabilidad encontrada en este fragmento.

Para el gen COIII se obtuvieron tres secuencias de individuos diferentes de la localidad de Sinaloa. El tamaño del fragmento secuenciado fue de 515 pb (Apéndice V) y solamente se observó una variación en la posición 361. No se encontró enzima que reconociera el sitio.

Para la región control se obtuvieron 6 secuencias, un organismo de Sinaloa, dos de Guerrero, uno de Guatemala y dos de Panamá. El tamaño aproximado del fragmento fue de 923 pb (Apéndice VI) y se encontraron 59 sitios de variación.

También se logró secuenciar parte del gen ND2 pero debido a la mala calidad de los fenogramas no se reportan las secuencias. No se logró amplificar el gen Cyt b debido a la baja especificidad de los iniciadores universales que se utilizaron.

Discusión

La comparación de las secuencias obtenidas en este trabajo del gen 16S de *L. vannamei* con 11 secuencias existentes en el GenBank no mostraron diferencias. La secuencia obtenida de este gen posee un fragmento de 28 bases no secuenciado anteriormente en la terminación 5'. El gen 16S es uno de los más utilizados para el análisis filogenético a nivel de especie, género y familia, y que se ha usado en diferentes especies de camarones (Baldwin et al., 1998; Lavery et al., 2003). El gen 16S es uno de los genes mitocondriales más conservados, aún entre especies, por lo que se esperaba que no existiera variación dentro de la especie, como lo observado en este trabajo.

Para el gen COI de camarón blanco existen 25 secuencias dentro del GenBank. La comparación de las secuencias obtenida en este trabajo no se pudo realizar debido a que son regiones distintas del gen COI. Este gen es también uno de los más utilizados para el análisis filogenético, mostrando altas variaciones a nivel de especie. Aun cuando a nivel de poblaciones se han observado altos niveles de variación de COI en algunos artrópodos (Meyran et al., 1997; Navajas et al., 1998; 1999), en el camarón *Penaeus chinensis* se observó una baja variación interpoblacional de este gen (Quan et al., 2001). Las secuencias encontradas en este trabajo de *L. vannamei*, también mostraron una baja variación intra-específica en solamente dos bases en COI.

No se compararon las regiones COIII, ATP-6-8 y región control obtenidas en este trabajo debido a que no existen secuencias previamente reportadas para estas regiones del ADN mitocondrial del camarón blanco.

En general se observó una baja variación intraespecífica en los genes mitocondriales de *L. vannamei* secuenciados en este estudio. Si bien son pocas las muestras secuenciadas por población, éstas correspondieron principalmente a individuos de las regiones más extremas (Sinaloa y Panamá), además de no presentar variación con las pruebas de RFLP, y así como a los antecedentes de la existencia de poca variación en los genes de COI en *Penaeus chinensis* (Quan et al., 2001). Por lo que, puede ser posible que en camarón blanco se mantenga esta baja variabilidad genética del COI a lo largo de las diferentes localidades estudiadas.

La gran variación observada en la región control del camarón blanco en este estudio es similar a lo reportado en otras especies de camarones como *P. merguensis* (Chu et al. 2003) y *F. aztecus* y *L. setiferus* (McMillen-Jackson, 2003). Esto confirma el gran polimorfismo de la región control del ADN mitocondrial, lo cual será útil para el análisis de RFLP.

Aunque algunos fragmentos de ADN mitocondrial de camarón blanco tienen un bajo número de sitios polimórficos y que además no fueron reconocidos por enzimas de restricción; es posible detectar estas variaciones por la técnica de análisis rápido de mutaciones (polimorfismo conformacional de una sola hebra (SSCP), electroforesis en gel desnaturalizante en temperatura de gradiente (TGGE)) (Féral, 2002).

Capítulo 2

Estructura genética de las poblaciones del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de México a Panamá: variación de loci Microsatélites.

Introducción

La definición de stocks ha sido uno de los puntos de mayor interés para entender los recursos naturales y asegurar la sustentabilidad del recurso (Thorpe et al, 2000; Ward, 2000; Féral, 2002). Debido a que la producción pesquera de diversas especies de peneidos en el mundo son muy importantes, la determinación de la estructura de los stocks para estas especies es necesaria para la formulación de medidas de manejo efectivas del recurso en actividades de pesquerías y de acuicultura (Benzie, 2000; Klinbunga et al., 2001), porque diferentes stocks podrían diferir en tasas de crecimiento, o resistencia a enfermedades (Lester y Pante, 1992; Klinbunga et al., 2001). A través del conocimiento de la diversidad genética será posible desarrollar estrategias de manejo adecuadas que permitan una producción sostenible y productiva del camarón blanco (Rodríguez-Romero y Gasca, 1999).

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es una especie que se encuentra en un hábitat de mar abierto de hasta 70 m de profundidad y dentro de lagunas costeras. Su ciclo de vida inicia con una etapa larval planctónica oceánica, después penetra en los estuarios como postlarva hasta ser juvenil; posteriormente, regresa al ambiente marino como adulto para madurar y desovar.

Gran parte de la investigación genética de crustáceos se ha centrado principalmente en los Peneidos (Benzie 1992, 2000). Benzie (2000) en una revisión del género *Penaeus* reporta 27 especies que han sido objeto de estudios genéticos en poblaciones silvestres y de cultivo. Particularmente, el análisis genético en las pesquerías se ha enfocado a la identificación de stocks y de especies (Carvalho y Hauser, 1994; Park y Moran, 1994). Los estudios de la estructura genética a través de los microsatélites en camarones se ha realizado principalmente en poblaciones de *Penaeus monodon* en diferentes regiones de Asia (Brooker et al., 2000; Supungul et al., 2000; Xu et al., 2001). Los microsatélites se han convertido en los marcadores preferidos en muchos estudios de diversidad genética debido a sus características particulares, como alta variabilidad y herencia codominante (Jarne et al., 1996; Luikart y England, 1999). Los microsatélites son comúnmente usados como marcadores genéticos en muchas especies de pesquerías y de acuicultura (ej. O'Really y Wright, 1995). Los microsatélites son aceptados como marcadores neutrales más que marcadores funcionales como las alozimas. Los microsatélites son secuencias cortas de ADN que se repiten varias veces, los cuales pueden variar desde dinucleótidos (CA/TG) hasta pentanucleótidos (Schlötterer y Pemberton, 1994; Goldstein y Schlötterer, 1999).

A pesar de la gran importancia que tiene el camarón blanco, hay poca información acerca de su estructura poblacional. Para determinar la diversidad y la estructura genética del camarón blanco, se analizaron cuatro localidades ubicadas a lo largo de su distribución separadas por importantes barreras físicas y oceanográficas, con cinco microsatélites.

Materiales y métodos

Sitios de colecta y conservación de las muestras

Se colectó muestras de camarón blanco (*L. vannamei*) de 4 localidades en el Pacífico Oriental. Dos sitios en México: Sinaloa y Guerrero, y Guatemala y Panamá (Fig. 3). Todas las muestras fueron colectadas dentro de lagunas costeras. De cada organismo se midió la longitud del rostro (Tabla 1). Se tomó muestra de tejido muscular, de al menos 50 organismos de cada localidad y se fijó en alcohol etílico al 95%. La muestra de Panamá incluyó postlarvas y juveniles de camarón blanco, y debido a que un análisis *a priori* no indicó diferencias genéticas entre los dos grupos de edad, se trataron como una sola población.

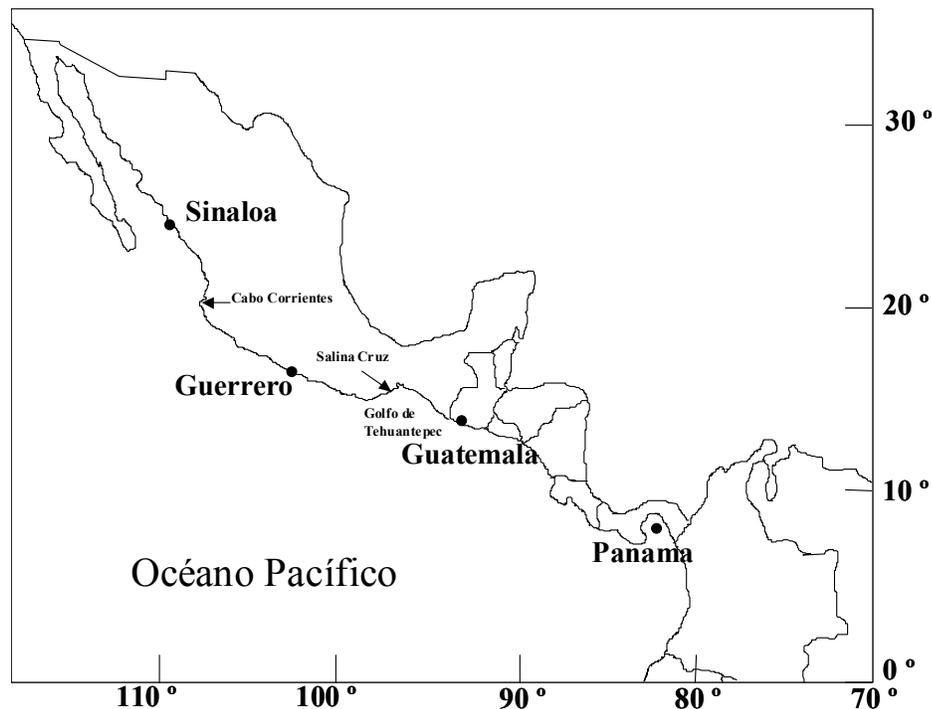


Figura 3. Sitios de colecta de las muestras de *Litopenaeus vannamei* en el Pacífico Oriental.

Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN total de cada organismo usando 700 µl de amortiguador TNES-Urea (10 mM Tris/HCL pH 7.5, 1.5 M NaCL, 10 mM EDTA, 0.5% SDS , 4 M Urea) y 5 µl de proteinasa-K (50 µg/µl concentración final). La mezcla se incubó durante 16 horas a 37 °C. Se realizó una purificación orgánica del ADN en dos pasos sucesivos de lavado con Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamilico (25:24:1) y Cloroformo:Alcohol isoamilico (24:1), y se precipitó el ADN con un volumen doble de etanol frío al 99% y 50 µl 3M acetato de sodio trihidratado. El pelet obtenido fue lavado con alcohol etílico al 70%, secado por 20 minutos a temperatura ambiente, resuspendido en 100 µl de amortiguador TE (10 mM Tris/HCL, 1mM EDTA pH 7.2) y conservado a 4 °C.

Tabla 1. Localidades de colecta de *Litopenaeus vannamei* en el Pacífico Oriental.

Localidad	Fecha	No. individuos	Media (L.C.) (mm) ^a	Desviación estándar
Sinaloa	Mar 2002	57	51.6 ^a	4.8
Guerrero	Abr 2002	50	28.8 ^a	1.9
Guatemala	Dic 2001	50	n.d.	
Panamá	Jun 2001	20 (Juveniles)	n.d.	
Panamá	Jun 2001	30 (Postlarva)	8.0 ^b	0.07

^a Longitud de cefalotórax (L.C.), mm = milímetros.

^b Longitud total

n.d. = no disponible

Amplificación de Microsatélites

Los microsatélites de camarón blanco fueron amplificados por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando 5 loci microsatélites específicos para camarón blanco: *Pvan0013*, *Pvan0040*, *Pvan1003*, *Pvan1758* y *Pvan1815* (Cruz et al., 2002). Los

iniciadores fueron ordenados de Sigma-Genosys, con el iniciador de reverso biotilado en posición 5'. La amplificación se realizó en un volumen de 25 µl, conteniendo 50 ng de DNA, 10 pmol de cada iniciador, 2.1 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂), 0.2 mM de cada uno de los nucleótidos (dNTPs), y 0.25 U de *Taq* polimerasa (Roche). El PCR se realizó en un termociclador *Genius (Techne)* con el siguiente programa: 4 min a 95 °C, 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a la temperatura de alineamiento según el iniciador, 1 min a 72 °C, y a 72 °C por 4 min (Cruz et al., 2002).

Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (6%) en 8 M Urea. La electroforesis se corrió a 2800 Volts, 80 MA y 60 Watts. El gel se desprendía de los vidrios de electroforesis por medio de papel 3MMCHR Whatman. El ADN del gel se transfirió a una membrana Hybond por capilaridad por 50 minutos. Al terminar la transferencia, la membrana se horneó a 75 ° C por una hora, y se expuso por un minuto a luz UV. Los microsatélites se detectaron en la membrana por quimioluminiscencia mediante lavados sucesivos con soluciones conteniendo estreptavidina, fosfatasa alcalina y sustrato quimioluminisente en un tubo de hibridación siguiendo el protocolo de PhototopeTM-Star Detection Kit (Cat. N7020S; New England Biolabs) (Perez-Enriquez et al., 2001). La luz emitida de los microsatélites fue detectada por la exposición de la membrana a una película de rayos-X (Kodak X-Omat). Una reacción de secuenciado de M13 fue usada como estándar de DNA para estimar el tamaño de los microsatélites usando 'SequiTherm Cycle Sequencing Kit' (Epicentre Tech).

Análisis de microsatélites

Variación de microsatélites y desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg

La diversidad genética para cada localidad se determinó mediante el número de alelos por locus (A), y la heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e). Se calculó el número efectivo de alelos por locus (a) como $a_e = 1 / \sum x_i^2$, donde x_i es la frecuencia del alelo i -ésimo para cada locus (Crow y Kimura, 1965). El déficit o exceso de heterocigotos para cada locus fue calculado por: $D = (H_o - H_e) / H_e$. Las frecuencias alélicas y los parámetros de diversidad genética de cada locus para cada población se calculó mediante el programa FSTAT (versión versión 2.9.3.2., Goudet, 1995). Las desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada locus de cada población fueron probadas mediante una prueba exacta de Fisher, y una prueba global de heterocigosidad implementadas en GENEPOP versión 3.3 (Raymond y Rousset, 1995). Mediante el método de la cadena de Markov se estimó la significancia de la desviación de EHW, también en GENEPOP. Los criterios de significancia fueron ajustados mediante la técnica secuencial de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice, 1989). Para cada par de locus en todas las localidades se probó el ligamiento por desequilibrio bajo la hipótesis nula de no asociación entre los genotipos usando GENEPOP.

Diferenciación genética entre localidades

Mediante el programa FSTAT versión 2.9.3.2. se calcularon los valores θ_{ST} (Weir y Cockerham, 1984) que es análogo al estadístico de Wright. Los valores de F_{ST} , estiman la reducción de genotipos heterocigotos en proporción a la media dentro de las poblaciones

causada por una diferencia poblacional. El cálculo de la significancia se realizó por un proceso de permutación al azar de los alelos ($n= 1000$, los alelos fueron permutados no asumiendo EHW dentro de las muestras) dentro de las muestras para probar si los valores son diferentes de cero o no (Goudet, 1995). También se realizó una prueba de comparaciones pareadas de F_{ST} entre las localidades mediante GENEPOP. Las diferencias en el número de alelos y genotipos entre las localidades para cada locus fueron probadas por medio de una prueba no-paramétrica rango por signos de Wilcoxon. Los criterios de significancia para ambas pruebas fueron ajustados usando la aproximación secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

Mediante una prueba exacta de probabilidad logarítmica G usando GENEPOP, se estimaron las probabilidades de que las distribuciones alélicas y genotípicas fueran idénticas entre todos los pares de poblaciones. Se realizó un análisis de regresión de los valores de F_{ST} vs. el logaritmo de la distancia geográfica entre todos los pares de localidades para probar el aislamiento por distancia usando GENEPOP. Se utilizó una prueba de Mantel con 1000 permutaciones para probar la significancia de la relación. Mediante el método de agrupamiento pareado no ponderado usando las medias aritméticas (UPGMA) se generó el dendrograma de las localidades usando los programas Phylip 3.5 (Felsenstein, 1993) y TreeView (Page, 1996).

Resultados

Variación de microsatélites y desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg

La variabilidad genética de las cuatro localidades estudiadas de *L. vannamei* con cinco microsatélites se muestran en la Tabla 2. El número de alelos por locus (A) varió de 2 a 16, la heterocigosidad observada (H_o) varió de 0.045 a 0.614, y la heterocigosidad esperada (H_e) varió de 0.354 a 0.895. La media en el número de alelos por locus y la heterocigosidad media observada fueron similares entre todas las poblaciones, y el rango varió de 7.4 a 8.6 y de 0.241 a 0.388, respectivamente. Se observaron dos grupos de microsatélites, un grupo con un bajo número de alelos (menos de 5) (*Pvan0013*, *Pvan1003*) y otro grupo con un número mayor de alelos (más de 7) (*Pvan0040*, *Pvan1758*, *Pvan1815*). (Tabla 2).

Se detectaron desviaciones significativas de EHW en 19 de 20 posibles pruebas después del ajuste secuencial de Bonferroni para las significancias (Tabla 2). La mayoría de las poblaciones para cada locus mostraron deficiencia de heterocigotos, excepto Guatemala con *Pvan0013* que se mostró en EHW. En ambas pruebas, global y para cada locus dentro de cada población se observaron desviaciones del EHW ($P < 0.05$). Se realizó una prueba de EHW para alelos nulos usando el algoritmo EM en GENEPOP. Primero, fue estimada la frecuencia de un alelo nulo sospechoso para cada locus, entonces el conjunto de datos de las frecuencias de los genotipos fueron corregidos y se probó nuevamente el EHW.

Tabla 3. Variabilidad genética de *Litopenaeus vannamei* de cuatro localidades con cinco microsatélites.

Localidad		Locus					Mean
		<i>Pvan0013</i>	<i>Pvan0040</i>	<i>Pvan1003</i>	<i>Pvan1758</i>	<i>Pvan1815</i>	
Sinaloa	Tamaño de muestra	39	44	44	41	40	41.6
	No. de alelos (A)	4	11	3	13	12	8.6
	No. efectivo de alelos (a_e)	3.1	3.1	1.5	9.4	8.7	5.2
	Heterocigosi (H_o)	0.179	0.250	0.136	0.415	0.475	0.291
	(H_e)	0.678	0.675	0.354	0.894	0.885	0.697
	D	-0.735	-0.630	-0.615	-0.536	-0.463	-0.596
	P^a	< 0.001 (0.001)	< 0.001				
Guerrero	Tamaño de muestra	38	31	40	35	44	37.6
	No. de alelos (A)	2	7	3	10	16	7.6
	No. efectivo de alelos (a_e)	2.0	2.6	1.8	5.3	5.3	3.4
	Heterocigosi (H_o)	0.263	0.161	0.300	0.600	0.614	0.388
	(H_e)	0.499	0.621	0.454	0.811	0.811	0.639
	D	-0.472	-0.740	-0.339	-0.260	-0.244	-0.411
	P^a	0.0037 (0.001)	< 0.001 (0.001)	0.0334 (0.001)	0.0003 (0.001)	< 0.001 (0.001)	< 0.001
Guatemala	Tamaño de muestra	26	20	42	39	48	35.0
	No. de alelos (A)	3	5	3	13	16	8.0
	No. efectivo de alelos (a_e)	2.2	2.7	1.6	9.5	10.5	5.300
	Heterocigosi (H_o)	0.500	0.200	0.238	0.282	0.583	0.361
	(H_e)	0.548	0.631	0.357	0.895	0.905	0.667
	D	-0.088	-0.683	-0.333	-0.685	-0.356	-0.429
	P^a	0.4524 (0.1582)	< 0.001 (0.001)	0.0031 (0.001)	< 0.001 (0.001)	< 0.001 (0.001)	< 0.001
Panamá	Tamaño de muestra	34	22	44	29	32	32.2
	No. de alelos (A)	5	7	3	13	9	7.4
	No. efectivo de alelos (a_e)	3.2	5.5	1.6	5.8	4.7	4.2
	Heterocigosi (H_o)	0.324	0.045	0.227	0.138	0.469	0.241
	(H_e)	0.684	0.819	0.373	0.828	0.786	0.698
	D	-0.527	-0.945	-0.391	-0.833	-0.404	-0.620
	P^a	< 0.001 (0.001)	< 0.001 (0.001)	0.0009 (0.001)	< 0.001 (0.001)	< 0.001 (0.001)	< 0.001
Total Localidades	Tamaño de muestra	137	117	170	144	164	732
	Promedio de No. de alelos	3.5	7.5	3	12.25	13.25	7.9
	Heterocigosi (H_o)	0.317	0.164	0.225	0.359	0.535	0.320
	(H_e)	0.602	0.687	0.385	0.857	0.847	0.675
	D	-0.456	-0.750	-0.420	-0.579	-0.367	-0.514
	P^a	< 0.001	< 0.001				

D = Deficit o exceso de heterocigotos ($H_o - H_e$)/(H_e).

P = Probabilidad de la desviación significativa del Equilibrio de Hardy-Weinberg (Procedimiento de Cadena de Markov, $P < 0.05$).

^aNúmero en paréntesis indica la probabilidad (P) de la deficiencia significativa de heterocigosis.

Los criterios de significancia fueron ajustado usando la técnica secuencial de Bonferroni (Rice, 1989) y los valores significativos de P están en negritas.

Los resultados basados en los datos de los ‘alelos nulos’ mostraron que la deficiencia de heterocigotos no ocurre en cualquiera de las poblaciones con cualquier locus. Sin embargo, los loci *Pvan0013* y *Pvan1815*, mostraron un exceso significativo de heterocigotos, sugiriendo que la presencia de alelos nulos no se puede descartar. El análisis del desequilibrio de ligamiento no fue significativo para todos los pares de loci, indicando la no asociación entre los genotipos; por lo tanto, se puede considerar a cada locus como independiente (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación del desequilibrio genotípico por pares de locus de *Litopenaeus vannamei*.

Par de locus		<i>P</i>
Pvan1003	Pvan0040	>0.540 ^{NS}
Pvan1003	Pvan1815	>0.647 ^{NS}
Pvan0040	Pvan1815	>0.501 ^{NS}
Pvan1003	Pvan0013	>0.187 ^{NS}
Pvan0040	Pvan0013	>0.314 ^{NS}
Pvan1815	Pvan0013	>0.736 ^{NS}
Pvan1003	Pvan1758	>0.880 ^{NS}
Pvan0040	Pvan1758	>0.448 ^{NS}
Pvan1815	Pvan1758	>0.998 ^{NS}
Pvan0013	Pvan1758	>0.881 ^{NS}

^{NS} No significativa

La distribución de la frecuencia en el tamaño de los microsatélites varió entre las cuatro localidades estudiadas (Fig. 4). Sin embargo, en tres loci, *Pvan0013*, *Pvan0040*, y *Pvan1003*, el alelo más común fue el mismo en todas las poblaciones. Los loci *Pvan1758* y *Pvan1815* mostraron la variación más alta en el tamaño de los alelos y varios alelos únicos se presentaron en cada población (Fig. 4).

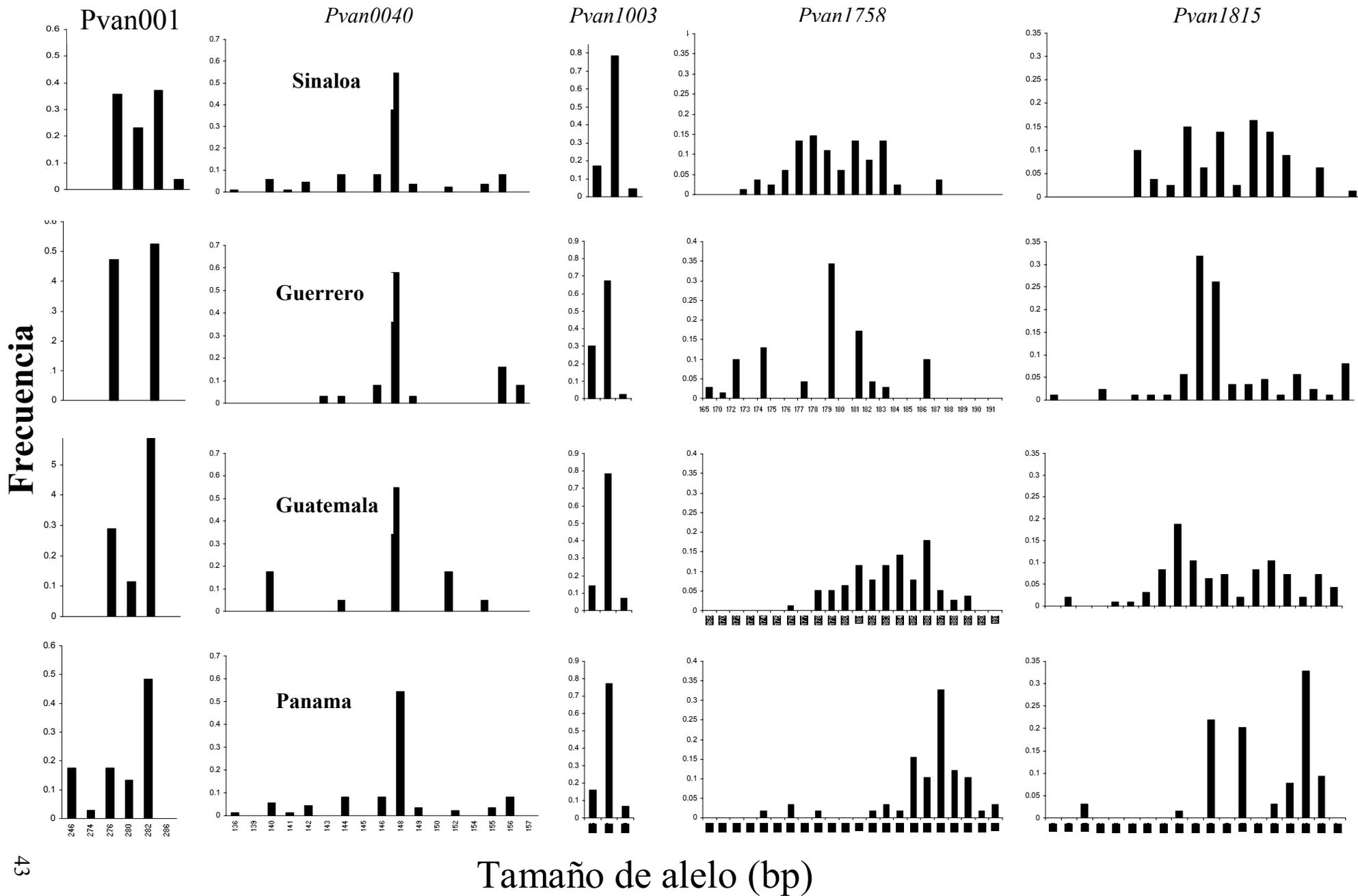


Figura. 4. Histogramas de las frecuencias alelicas de cada uno de los microsatélites por localidad de *Litopenaeus vannamei*.

Los valores positivos de F_{IS} indican una reducción significativa en la proporción promedio de genotipos heterocigotos dentro de las poblaciones en todos los loci, debido a la deficiencia de heterocigotos en las poblaciones (Tabla 4). Los valores de F_{IS} fueron significativamente mayores que cero tanto globalmente como para cada locus (Tabla 4).

Tabla 4. Estadísticos F de cuatro localidades de *Litopenaeus vannamei*^a.

Locus	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
<i>Pvan0013</i>	0.516**	0.046**	0.539**
<i>Pvan0040</i>	0.744**	0.053**	0.758**
<i>Pvan1003</i>	0.426**	0.004	0.429**
<i>Pvan1758</i>	0.582**	0.072**	0.612**
<i>Pvan1815</i>	0.374**	0.065**	0.415**
Total	0.533**	0.055**	0.559**

^a Usando el programa FSTAT (Goudet, 2001).

** $P < 0.01$. Probabilidad de que la estimación no es diferente de cero basada en un proceso de permutación por el programa FSTAT (Goudet, 1995).

Diferenciación genética entre localidades

Un valor general de $F_{ST} = 0.055$ significativo indicó diferencias genéticas sustanciales entre las localidades de *L. vannamei* para todos los loci, de la misma forma que con cada una de los microsatélites excepto para *Pvan1003* (Tabla 4). Los valores pareados de F_{ST} mostraron diferencias genéticas significativas entre todos los pares de poblaciones (Tabla 5). De acuerdo a la prueba no-paramétrica de rangos por signos de Wilcoxon, el número de alelos y de genotipos de los cinco microsatélites fueron no significativamente diferentes entre pares de localidades.

Similar a los valores F_{ST} , la mayoría de las pruebas de las comparaciones pareadas de las frecuencias alélicas y genotípicas mostraron una diferenciación genética entre las localidades de la mayoría de los loci con excepción de *Pvan1013* (Tabla 6).

Adicionalmente, Sinaloa no mostró diferencias en las frecuencias genotípicas con Guerrero en *Pvan0040*, y con Guatemala en *Pvan0013* y *Pvan0040*.

Tabla 5. Estimaciones pareadas de F_{ST} entre localidades de *L. vannamei*^a.

Localidad	Sinaloa	Guerrero	Guatemala	Panamá
Sinaloa				
Guerrero	0.0415**			
Guatemala	0.0171**	0.0511**		
Panamá	0.0625**	0.1043**	0.0614**	

^aUsando el programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995)

**($P < 0.008$) Indica elevada significancia de diferenciación genética probada por la técnica de Fisher.

El análisis del aislamiento por distancia no mostró resultados significativos con la prueba de Mantel ($P = 0.121$), indicando que las diferencias genéticas no son explicadas por las distancias geográficas entre las localidades (Fig. 5). Por lo anterior la agrupación de localidades con base a la distancia genética no muestra un patrón geográficamente congruente (Fig. 6).

Tabla 6. Valores de P para las comparaciones pareadas de las frecuencias alélicas y genotípicas (en paréntesis) entre localidades de *Litopenaeus vannamei*^{a,b}.

Comparación			Locus				
			<i>Pvan0013</i>	<i>Pvan0040</i>	<i>Pvan1003</i>	<i>Pvan1758</i>	<i>Pvan1815</i>
Sinaloa	vs	Guerrero	0.000 (0.000)	0.010 (0.131)	0.119 (0.198)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)
Sinaloa	vs	Guatemala	0.042 (0.131)	0.002 (0.071)	0.711 (0.742)	0.000 (0.000)	0.000 (0.002)
Sinaloa	vs	Panamá	0.000 (0.003)	0.000 (0.000)	0.848 (0.055)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)
Guerrero	vs	Guatemala	0.001 (0.000)	0.000 (0.000)	0.026 (0.877)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)
Guerrero	vs	Panamá	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.055 (0.096)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)
Guatemala	vs	Panamá	0.004 (0.022)	0.000 (0.000)	0.961 (0.967)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)

^a Usando el programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995).

^b Los criterios de significancia fueron ajustados por la técnica secuencial de Bonferroni y los valores significativos están en negritas.

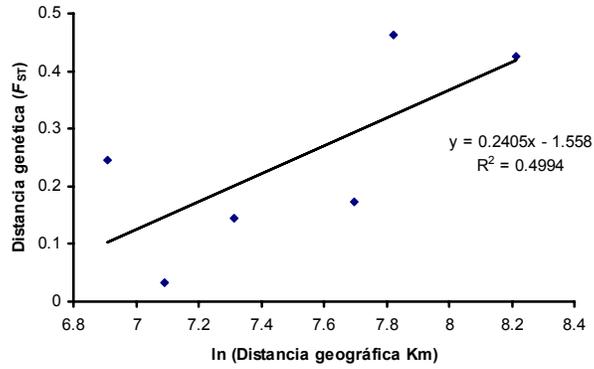


Figura 5. Aislamiento por distancia: regresión entre los valores pareados de F_{ST} y el logaritmo de la distancia geográfica de *Litopenaeus vannamei*.

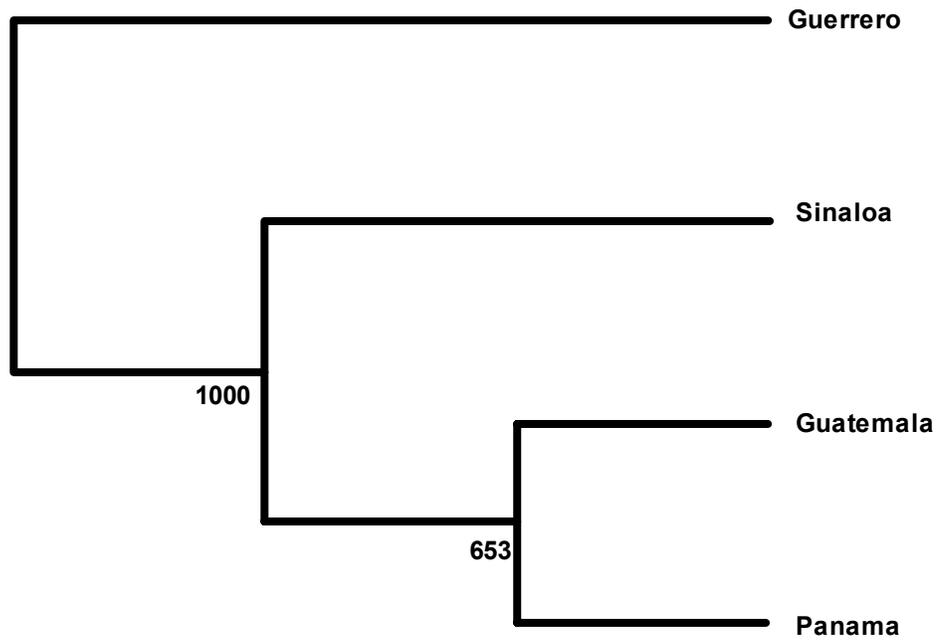


Figura 6. UPGMA dendrograma de la relación entre localidades de *Litopenaeus vannamei* basadas en la divergencias nucleotídicas.

Discusión

Diversidad genética

El número de alelos por locus en este estudio (2 a 13) fue menor que el reportado en otras especies de peneidos (Benzie, 2000; Xu et al., 2001). En *Penaeus monodon*, estudios con microsatélites revelaron entre 14-28 alelos de dos loci (Supungul et al., 2000), y de 19-30 alelos en cinco loci de Tailandia (Tassanakajon et al., 1998), de 34-84 alelos en tres loci de Australia (Brooker et al., 2000), y de 6-54 en seis loci de Filipinas (Xu et al., 2001). El único trabajo previo para *L. vannamei* con microsatélites (Wolfus et al., 1997) reportó de 4 a 23 alelos para un locus. No obstante, estas estimaciones de diversidad alelica son mayores que las reportadas para alozimas (Benzie, 2000). Como se esperaba, el número de alelos en este estudio fue también ligeramente mayor que el de una muestra de granja usando los mismos cinco microsatélites (Cruz et al., 2002). La moderada variación observada en los microsatélites en este estudio mostró suficiente resolución para permitir diferenciación poblacional. Esta es una ventaja comparada con loci que tienen un número elevado de alelos, los cuales requieren de un mayor tamaño de muestra (Hedrick, 1999). Los resultados con relación a la heterocigosidad también indican que otros peneidos han mostrado más variación con microsatélites que *L. vannamei*, con valores entre 0.425 a 0.964 (Benzie, 2000) comparado con el rango reportado en este estudio de 0.164 a 0.535.

Desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg

Se detectaron desviaciones significativas del Equilibrio de Hardy-Weinberg para la mayoría de las pruebas para cada locus en cada población (19 de 20) debido a un exceso de homocigotos. Este fenómeno ha sido reportado para otras especies de peneidos como

P. monodon (Supungul et al., 2000; Xu et al., 2001). Supungul et al., (2000) encontró desviaciones significativas del EHW en 19 de 25 posible pruebas. Xu et al. (2001) reportó desviaciones en 8 de 24 pruebas. La elevada deficiencia de heterocigotos ha sido comúnmente observado en otros organismos acuáticos usando alozimas (Zouros y Foltz, 1984; Gaffney et al., 1990) y microsatélites (Pemberton et al. 1995; Ruzzante et al., 1996). Además, la deficiencia de heterocigotos en alozimas en algunas especies de camarones ha sido encontrada en algunos loci de *Farfantepenaeus californiensis* y *Litopenaeus stylirostris* (De la Rosa et al., 2000), y *Farfantepenaeus notialis* (Garcia-Machado et al., 2001). Xu et al. (2001) encontró para *P. monodon* cinco casos con deficiencia de heterocigotos para tres microsatélites en cuatro poblaciones.

Varias de las causas propuestas para explicar la deficiencia de heterocigotos son: la reproducción entre parientes cercanos (endogamia), alelos nulos, artefactos técnicos, mezcla de poblaciones (efecto Wahlund), y otros (Gaffney et al., 1990; Castric et al., 2002). Cuando la endogamia esta presente en una población, se esperaría que todos los loci estuvieran correlacionados (desequilibrio por ligamiento) (Castric et al., 2002). Sin embargo, debido a que no se observó desequilibrio por ligamiento entre cada par de loci, la endogamia no podría explicar la deficiencia de heterocigotos. Otra explicación para la deficiencia de heterocigotos podría ser la presencia de alelos nulos, por ejemplo, la falla de amplificación de uno de los alelos en un individuo. Errores en la lectura del tamaño del microsatélite debido a la presencia de bandas fantasma (Apéndice VII) (Pemberton et al., 1995). La presencia de alelos nulos ha sido sugerida para *P. monodon* (Xu et al., 2001) y *Litopenaeus setiferus* (Ball et al., 1998). En un estudio mediante pruebas de

herencia Mendeliana con dos de los loci más variables, *Pvan1758* y *Pvan1815*, se mostró que en el locus *Pvan1815* no se puede descartar que existan alelos nulos, si las condiciones de PCR no son óptimas (Cruz 2003). Sin embargo, es común que los alelos nulos sean esperados en un locus en todas las poblaciones, lo cual se presentó no solo en un locus, sino en todos los loci. Considerando que el análisis de datos con ‘alelos nulos’ (Xu et al., 2001) decrece el número de desviaciones de EHW, no se puede descartar la posibilidad de alelos nulos, especialmente en tres loci *Pvan0040*, *Pvan1003*, y *Pvan1758*. La presencia de artefactos técnicos (sombras o bandas fantasma) más que una simple banda de microsatélite podría ser causa de una mal clasificación de los heterocigotos por alelos de tamaños cercanos y considerarlos como homocigotos. Este efecto está normalmente presente en loci con repeticiones dinucleotídicas debido al deslizamiento de una de las cadenas de ADN sobre sí durante el proceso de PCR. Los microsatélites usados en este estudio fueron de repeticiones de dinucleótidos y dos microsatélites incluyeron repeticiones de tetranucleótidos (Cruz et al., 2002). Encontramos que la cantidad de bandas fantasma fueron variables dentro de los loci y aún entre individuos, pero el patrón normal fue una simple banda (banda muy marcada) en todos los loci con bandas fantasmas débiles (normalmente no más de dos). Así, se registraron los alelos con banda fuerte siguiendo las recomendaciones de Xu et al. (2001). Se piensa, por lo tanto, que un mal registro debido a bandas fantasmas en este estudio no fue la causa principal del exceso de homocigotos.

No se puede descartar que las desviaciones de EHW en *L. vannamei* a lo largo del Pacífico probablemente se deban a un proceso de azar en el éxito reproductivo

(“sweepstakes reproductive success”) que afecta entre las cohortes de larvas. Este proceso se ha propuesto en el pez *Clupea pallasii* (O’Connell et al., 1998) y también para camarón *P. monodon*, (Supungul et al., 2000).

Estructura genética y aislamiento por distancia

Los microsatélites han revelado una mayor estructura poblacional que alozimas en algunas especies de camarones (Brooker et al., 2000; Supungul et al., 2000; Xu et al., 2001). En este estudio se observaron valores significativos de la existencia de estructura genética (F_{ST}) para *L. vannamei* en el Pacífico Oriental usando microsatélites, comparado con los niveles extremadamente bajos de subdivisión poblacional usando alozimas para la misma región reportada por Sunden y Davis (1991).

Por el análisis anterior, que demuestra la presencia de estructura genética en el camarón blanco, se sugiere que las localidades estudiadas deben ser consideradas como poblaciones separadas.

Capítulo 3

Análisis de RFLP del ADN mitocondrial de la región control en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) del Pacífico Oriental.

Introducción

En el capítulo 2, se detectó la existencia de estructura genético-poblacional en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) usando 5 microsátélites y 4 localidades. Sin embargo, debido a que los marcadores de ADN tienen sus propias limitaciones (Lunt et al., 1998; Zhang y Hewit, 2003) es recomendable que los análisis genéticos incluyan más de un marcador, para obtener un mejor entendimiento de la variación genética y los procesos evolucionarios que ocurren en las poblaciones. Particularmente en camarón blanco (*L. vannamei*) no existe información de su diversidad genética a nivel del ADN mitocondrial.

El ADN mitocondrial (ADNmt) ha sido usado como marcador genético en varias especies de camarones (ej. Klinbunga et al., 1999; 2001; García-Machado et al., 2001; McMillen-Jackson y Bert 2003, 2004) debido a que presenta variación entre individuos de una localidad y entre localidades, y debido a su rápida velocidad de mutación comparada con el ADN nuclear. Su herencia materna y ausencia de recombinación, hace del ADN mitocondrial un marcador apropiado para trazar la historia evolutiva de las especies (ej. evento fundador, introducciones, y cuellos de botella) (Harrison, 1989; Castro et al., 1998; Meyer, 1994).

Mediante el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (ADNmt-RFLP) se han determinado los niveles de diversidad genética y

estructura poblacional de algunas especies de camarón como *P. monodon* (Klinbunga, 1998, 1999, 2000), y *F. notialis* (Garcia-Machado, 2001). Klinbunga et al. (1998) en un análisis de ADNmt-RFLP usando el ADN mitocondrial total y cortado con 5 enzimas de restricción en diez poblaciones de *P. monodon* determinó estructura genética, definiendo la existencia de tres stocks. Klinbunga et al. (1999) en un análisis de RFLP del ADN mitocondrial total con 11 enzimas encuentra estructura poblacional en tres poblaciones de *P. monodon*. En otro estudio, Klinbunga et al. (2001) observaron estructura poblacional en cinco poblaciones de *P. monodon* utilizando la región COI-COII (1700 pb) y 5 enzimas de restricción. García-Machado et al. (2001) determinó estructura genética utilizando el gen COI-COIII (2027 pb) en *F. notialis*.

Recientemente, la región control del ADN mitocondrial ha sido usada para detectar la estructura genética intraespecífica poblacional en algunas especies de camarones usando el secuenciado de esta región (Chu et al., 2003; McMillen-Jackson y Bert 2003, 2004). Chu et al. (2003) mediante un estudio preliminar de ADNmt-RFLP de un fragmento de la región control (610 pb) en *Penaeus (Fenneropenaeus) merguensis* determinó que esta región es de utilidad para evaluar la estructura poblacional debido a la presencia de un gran número de sitios variables.

Materiales y métodos

Sitios de colecta y conservación de las muestras

Las muestras que se utilizaron en el análisis de ADN mitocondrial de camarón blanco fueron las mismas que se utilizaron para el análisis de microsatélites: Sinaloa, Guerrero, Guatemala y Panamá (Fig. 3, en capítulo 2).

Secuenciado y amplificación de ADN mitocondrial

Una región de aproximadamente 1.1 kb de pares conteniendo toda la región control de ADN mitocondrial de *L. vannamei* fue amplificada usando la reacción en cadena de la polimerasa. La secuencia de los iniciadores fueron las reportadas por Chu et al. (2003), 5'-AAGAACCAGCTAGGATAAACTTT y McMillen-Jackson y Bert (2003), 5'-GCTTACATGTTCTACCCTATCAAG. Las amplificaciones fueron hechas en un volumen de reacción de 50 μ L conteniendo un total de 50 ng de ADN total, 10 pmol de cada iniciador, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, y 1 U de *Taq* Platinum (Invitrogen). El programa de amplificación fue: 3 min a 95 °C, 35 ciclos de 30 sec a 95 °C, 1 min a 49 °C, y 1.30 min a 72 °C, y una extensión final a 72 °C por 4 min. Los productos de las amplificaciones fueron verificados en geles de agarosa 1% usando un marcador como estándar (100 pb ADN ladder) (Invitrogen). A partir de las 6 secuencias obtenidas de la región control (ver capítulo 1, materiales y métodos) se seleccionaron las enzimas de restricción que detectaban sitios polimórficos mediante el programa Webcutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.thml>). Estas enzimas fueron: *Alu* I, *Taq* I, *Spe* I y *Ssp* I. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el GenBank con los números de acceso (AY845710 a AY845715).

Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

Seis μ L del producto amplificado de la región control fueron individualmente digeridos con cada una de las enzimas de restricción elegidas siguiendo las condiciones recomendadas del fabricante (Invitrogen). Los volúmenes totales de las digestiones fueron inyectadas en geles de agarosa al 1.5% y se separaron los diferentes fragmentos

mediante una electroforesis. El patrón de los fragmentos producidos por la digestión con enzimas se visualizó por la tinción del gel con bromuro de etidio.

Análisis de los datos

Cada uno de los diferentes patrones producidos por los fragmentos de ADN mitocondrial resultado del corte con cada una de las enzimas de restricción se consideró como un haplotipo, el cual fue registrado con una letra del alfabeto en orden de aparición. Por lo tanto, a cada individuo se le asignó con un código de 4 letras para describir su haplotipo compuesto. Se estimaron las distancias genéticas entre los haplotipos compuestos de ADN mitocondrial, la diversidad de haplotipos (h) y la diversidad nucleotídica dentro de las localidades (π), la diversidad y la divergencia nucleotídicas entre localidades (Nei y Tajima, 1981; Nei, 1987). Todos los parámetros descritos arriba fueron calculados usando el programa REAP (McElroy et al., 1991).

Se probó la hipótesis nula de neutralidad en los procesos de mutación para los haplotipos, usando el estadístico de D de Tajima (1989), para tener evidencia de una expansión poblacional. Una prueba de amalgamación de Chakraborty fue usada para calcular evidencias de una mezcla de poblaciones (Chakraborty, 1990). Las pruebas antes mencionadas fueron realizadas usando el programa Arlequin ver. 2.000 (Schneider et al., 2000).

Análisis poblacional

La estructura genética entre las localidades se examinó con un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA; Excoffier et al., 1992) para conocer la partición de la varianza genética dentro y entre localidades, y sus componentes, mediante los valores del estadístico Φ_{ST} . La estimación de Φ_{ST} es análoga al estadístico F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984). La significancia del estadístico Φ_{ST} fue evaluada de la estimación de 10,100 permutaciones. El AMOVA se analizó en Arlequin ver. 2.000 (Schneider et al., 2000). También, se estimaron los valores pareados de Φ_{ST} entre localidades mediante Arlequin. Los niveles de significancia fueron ajustados para múltiples pruebas usando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

Para probar la heterogeneidad en la distribución de frecuencias de los haplotipos compuestos de ADN mitocondrial entre localidades geográficas, se realizó una prueba de χ^2 basada en una simulación de Monte Carlo con 10,000 remuestreos de los datos al azar usando la rutina de MONTE del programa REAP. Para determinar la relación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas entre localidades, se usó la prueba de Mantel de las matrices estandarizadas de los valores pareados de Φ_{ST} ($\Phi_{ST}/[1-\Phi_{ST}]$) y las distancias geográficas entre localidades. Se utilizó el programa de GENEPOP (ver. 3.1c) (Raymond y Rousset, 1995) para probar el aislamiento por distancia, con los valores del estadístico Φ_{ST} calculado de ARLEQUIN y la correspondiente distancia geográfica, los datos se analizaron con la subopción 5 y opción 6 de GENEPOP con 10,000 permutaciones.

Se construyó un dendrograma por el método de agrupamiento pareado no ponderado usando las medias aritméticas (UPGMA) basado en la matriz de carácter de estado de la presencia o ausencia de los presuntos sitios de restricción mediante el programa Arlequin (Schneider et al., 2000) entre pares de los haplotipos compuestos y de la divergencia interpoblacional, construidos con NEIGHBOR del programa Phylip (Felsenstein, 1993).

Resultados

Diversidad genética intra e inter poblacional

El fragmento amplificado de ADN mitocondrial de la región control presentó una longitud aproximada de 1.1 kb y no se detectó heteroplasmia en su longitud. El análisis de RFLP reveló un total de 42 presuntos patrones de restricción con cuatro enzimas. *Alu* I fue la enzima con mayor número de fragmentos (16), seguido por *Taq* I y *Spe* I (9), y *Ssp* I (8). De 150 individuos analizados, no se detectó ningún haplotipo compuesto común para las cuatro poblaciones; sin embargo, entre localidades se observaron entre 1 y 4 haplotipos compuestos compartidos. Se identificaron en total de 48 haplotipos compuestos de ADN mitocondrial, 39 de los cuales fueron haplotipos únicos (Tabla 8). El mayor número de haplotipos observado por localidad fue en Sinaloa y Guatemala, ambas con 22 haplotipos compuestos, mientras que en Guerrero únicamente se observaron 3 y en Panamá 14. Los haplotipos más frecuentes fueron #5 (ACAC) y #17 (CABB) que representan el 18% y 17.3%, respectivamente, del total de haplotipos compuestos. La principal contribución en ambos haplotipos compuestos fue la localidad de Guerrero (Tabla 7) con 23 y 16 organismos, respectivamente. A nivel poblacional, en número de haplotipos privados por localidad varió, en Sinaloa fue de 14 (33%), en Guerrero 0 (0%), en Guatemala 15 (38%) y en Panamá 10 (26%) (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución geográfica de los haplotipos compuestos de ADNmt entre localidades de *Litopenaeus vannamei*. Las letras denotan los patrones de los fragmentos de ADNmt producidos por la digestión de los productos de PCR con las siguientes enzimas de restricción: *Alu I*, *Taq I*, *Spe I*, *Ssp I*.

	Haplotipo compuesto	Frecuencia haplotípica				Total
		Sinaloa	Guerrero	Guatemala	Panamá	
1	AAAA	1				1
2	AAAB			1		1
3	AAAC				5	5
4	AABC	1				1
5	ACAC	4	23			27
6	AEAC			1		1
7	BAAC	1				1
8	BAAB				9	9
9	BABB	8		5	6	19
10	BABC				1	1
11	BACC	1	2			3
12	BADB			1		1
13	BAEB			2	1	3
14	BAFC	1				1
15	CAAA	1				1
16	CAAG				1	1
17	CABB	2	16	8		26
18	CABC	1		1		2
19	CABD				1	1
20	CABF			1		1
21	CACB			2		2
22	CACC	1		2	1	4
23	CADC			3		3
24	CFCC			1		1
25	CFAE			1		1
26	CBAC	1				1
27	DBCC			1		1
28	DBDC	1				1
29	EDAD	1				1
30	EBAD			1		1
31	EBAE			2		2
32	FAAE	3		2		5
33	FABC			1		1
34	GDAH	1				1
35	HAAC	1				1
36	HADC	1				1
37	HBAC				1	1
38	IAAG				1	1
39	IABB	1		3	2	6
40	IABC			1		1
41	ICBB				1	1
42	JAAC	1				1
43	KACC	1				1
44	KABB				1	1
45	LBAC			1		1
46	MBEE	1				1
47	NAAC			1		1
48	NBAC				1	1
	Total (N)	35	41	42	32	150

Los valores promedio de la diversidad haplotípica ($h = 0.823 \pm 0.008$) y la diversidad nucleotídica ($\pi = 5.41\%$) fueron altos en todas las localidades con la excepción de Guerrero, en la cual los valores fueron de 0.543 ± 0.042 y 3.72% , respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Diversidad haplotípica y nucleotídica dentro de cuatro localidades de *Litopenaeus vannamei*.

Localidad	Diversidad Haplotipos (h)			Diversidad Nucleotídica x 100 (d)
		\pm	E.E.	
Sinaloa	0.932	\pm	0.030	5.75
Guerrero	0.543	\pm	0.042	3.72
Guatemala	0.943	\pm	0.020	7.25
Panamá	0.875	\pm	0.038	4.90
Promedio	0.823	\pm	0.008	5.41

E.E. = Error estándar

También, se observaron valores promedio altos para la diversidad nucleotídica y la divergencia nucleotídica entre pares de localidades, 6.14% y 0.73% , respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentajes de diversidad nucleotídica (bajo la diagonal)* y divergencia nucleotídica estimadas entre pares de localidades de *Litopenaeus vannamei* (arriba de diagonal).

Localidad	Sinaloa	Guerrero	Guatemala	Panamá
Sinaloa	—	0.32	0.68	0.14
Guerrero	5.06	—	0.81	1.18
Guatemala	7.18	6.30	—	1.25
Panamá	5.47	5.50	7.33	—

*Diversidad nucleotídica media entre pares de localidades = 6.14%
 Divergencia nucleotídica media entre pares de localidades = 0.73%

La hipótesis de neutralidad selectiva para las mutaciones del ADN mitocondrial de la región control no fue rechazada en todos los casos, ya que las localidades individuales o todas juntas tuvieron un valor negativo no significativo para la D de Tajima ($D = 0.0096$, $P > 0.473$), sugiriendo que la selección no está afectando la región control del camarón blanco.

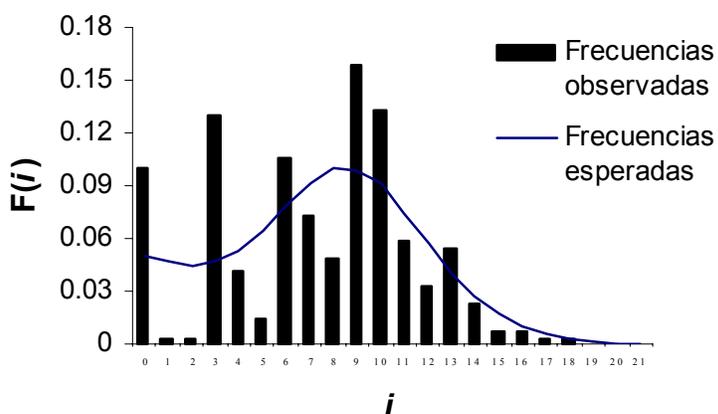


Figura 7. Distribución de las diferencias pareadas entre los haplotipos del ADN mitocondrial de la región control para *Litopenaeus vannamei*. Las barras negras representan la distribución observada. La línea sólida representa la distribución esperada bajo un modelo de rápida expansión. i : número de diferencias entre haplotipos. $F(i)$: frecuencia de los haplotipos pares con i diferencias.

No se observaron valores significativos para la prueba de Chakraborty, indicando que no existe mezcla de poblaciones. La comparación de la distribución de las diferencias entre haplotipos de camarón blanco no mostró una curva unimodal suave (media = 7.3, varianza = 16.3) (Fig. 7), como se esperaría en un modelo de una población en expansión (Roger y Harpending, 1992).

Análisis poblacional

El análisis de la variación genética basado en una AMOVA indicó que el 86.18% de la variancia total molecular ocurre dentro de las localidades (Tabla 10). Una porción significativa de 13.82% fue atribuida a las diferencias entre localidades ($P < 0.0001$). La mayoría de los valores pareados de diferenciación de Φ_{ST} fueron estadísticamente significativos, con la excepción de Sinaloa-Guatemala (Tabla 11). El análisis de heterogeneidad geográfica reveló diferencias significativas en la distribución de las frecuencias de los haplotipos compuestos de *L. vannamei* entre las localidades ($\chi^2 = 267.3$, $p < 0.0001$) indicando que existe estructura poblacional entre las cuatro localidades. La prueba de Mantel no mostró relación entre los valores estandarizados de distancias genéticas (Φ_{ST}) y el logaritmo de las distancias geográficas ($r = 0.218$, $P > 0.75$) (Fig. 8).

Tabla 10. Análisis molecular de varianza (AMOVA) de las distancias genéticas entre haplotipos de DNA mitocondrial de *L. vannamei*.

Componente de varianza	Varianza	% Total	Estatístico	P
Entre localidades	0.065	13.82	$\Phi_{ST} = 0.1382$	<0.0001
Dentro localidades	0.408	86.18		

P = Probabilidad

Tabla 11. Comparaciones pareadas de F_{ST} entre localidades de *Litopenaeus vannamei*.

Localidad	Sinaloa	Guerrero	Guatemala	Panamá
Sinaloa				
Guerrero	0.1928*			
Guatemala	0.0147	0.1961*		
Panamá	0.051*	0.2976*	0.0625*	

* $P < 0.05$, ajustado por la técnica secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

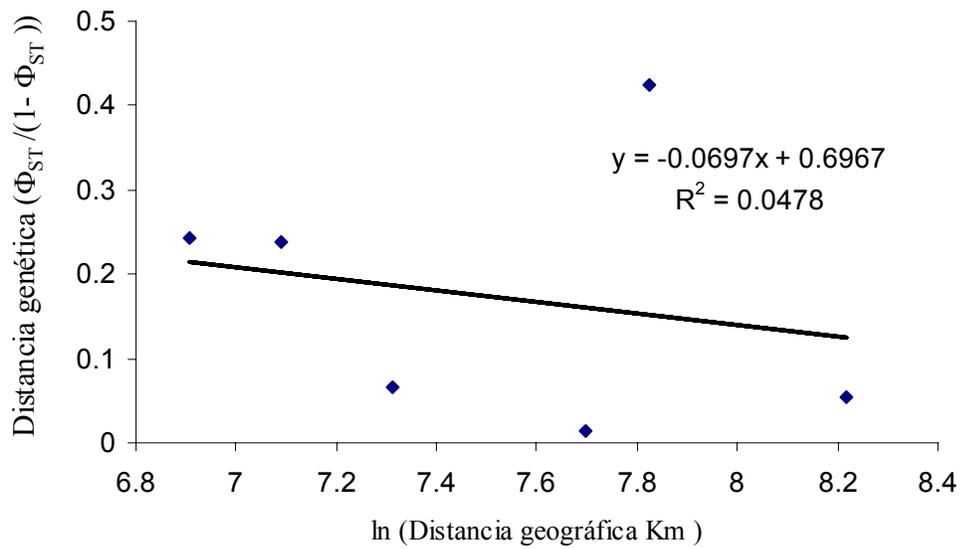


Figura 8. Aislamiento por distancia: regresión entre los valores pareados de Φ_{ST} y el logaritmo de la distancia geográfica entre localidades de *Litopenaeus vannamei*.

El resultado del dendrograma para *L. vannamei* de los haplotipos compuestos no mostró ninguna información sobre la existencia de algún clado o relación filogenética entre grupos (Ápndice VII). El dendrograma de las divergencias inter poblacionales no coincidió con la posición geográfica de las localidades (Fig. 9).

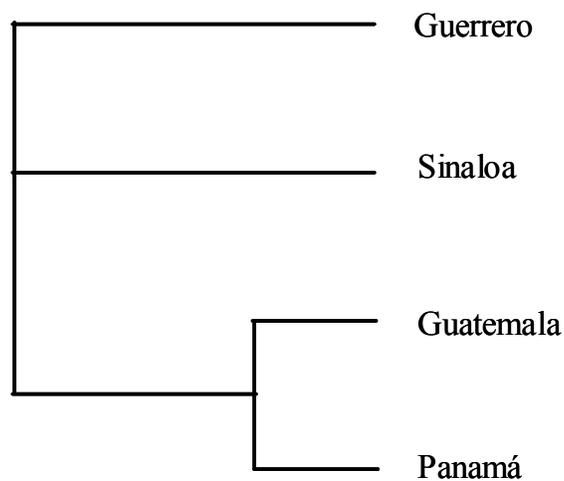


Figura 9. UPGMA dendrograma de la relación entre localidades de *Litopenaeus vannamei* basadas en la divergencias nucleotídicas.

Discusión

El número de haplotipos revelado por RFLP de la región control del ADN mitocondrial, mostró el elevado polimorfismo de esta región del ADN mitocondrial de camarón blanco. En este estudio, se encontró un mayor número de haplotipos (48) usando cuatro enzimas de restricción en comparación a lo reportado en *Penaeus (Fennropenaeus) merguensis* donde se observaron 15 haplotipos de un fragmento de 610 pb de la región control utilizando tres enzimas (Chu et al., 2003).

La diversidad haplotípica media analizada por ADNmt-RFLP en peneidos ha variado (0.537 a 0.864) dependiendo de la región analizada del ADN mitocondrial y del número de enzimas de restricción (Klinbunga et al., 1998, 1999, 2001). Klinbunga et al. (1998) reportó una diversidad haplotípica media de 0.537 utilizando el ADN mitocondrial total y 5 enzimas. Incrementando el número de enzimas a 11, Klinbunga et al. (1999) reportó un valor de diversidad haplotípica de 0.864. Un análisis de un fragmento de 1700 pb, que incluye las regiones COI-COII del ADNmt de *P. monodon*, reveló una diversidad media de 0.855 utilizando 5 enzimas (Klinbunga et al., 2001). La diversidad haplotípica media de la región control utilizando 4 enzimas de restricción en *L. vannamei* mostró una alta diversidad (0.823) comparada con lo reportado para *Penaeus monodon*. La diversidad haplotípica es sensible al número de enzimas de restricción usadas (Graves y McDowell, 1994) y al polimorfismo de los fragmentos analizados. Aún cuando en este estudio se utilizó un menor número de enzimas de restricción, la gran diversidad haplotípica puede deberse a que el fragmento de ADN mitocondrial analizado fue la región control, una región hipervariable del ADN mitocondrial. La localidad de Guerrero presentó la

diversidad más baja en haplotipos y nucleotídica; esta misma localidad en el estudio con microsatélites presentó un menor número de alelos en tres de los cinco microsatélites (ver capítulo 2). Esta pérdida de diversidad genética podría estar indicando un efecto de cuello de botella en Guerrero, debido posiblemente a una reducción en el tamaño efectivo de la población.

El porcentaje promedio de la diversidad nucleotídica por localidad (5.41%) en *L. vannamei* fue más alta que las reportadas previamente en *Penaeus monodon* (3.32% y 2.21%) (Klinbunga et al., 1999, 2001). Comúnmente, en organismos marinos la diversidad nucleotídica es usualmente menor del 1% (revisado en Klinbunga et al., 1999, 2001). La media de la diversidad nucleotídica entre pares de localidades fue 6.14%, la cual es mayor que el observado por localidad (5.41%). Esto implica estructura genética en *L. vannamei*, debido a que la divergencia del genoma mitocondrial entre localidades fue más grande que dentro de las localidades. La divergencia nucleotídica media en *L. vannamei* (0.73%) fue mayor que la reportada en *Penaeus monodon* (0.26%) (Klinbunga et al., 1999), indicando mayor diferenciación poblacional en *L. vannamei* versus *P. monodon*.

Un patrón unimodal de la distribución de las diferencias entre secuencias ADNmt ha sido descrito para animales terrestres y marinos (ej. Lavery et al., 1996; Van Hooft et al., 2002; Hoolihan et al., 2004). Este patrón también ha sido observado en algunas especies de camarones, *Farfantepenaeus aztecus*, *Litopenaeus setiferus*, *F. duorarum* (McMillen-Jackson y Bert, 2003, 2004), como una huella histórica de una rápida expansión

poblacional (un rápido crecimiento poblacional) (Rogers y Harpending, 1992) que ocurrió durante el período más reciente de glaciación en la era del pleistoceno. Durante este tiempo las fluctuaciones ambientales (i.e. nivel del mar, condiciones climáticas) produjeron cambios en el rango geográfico y en los tamaños poblacionales de las especies (Hewitt, 1996; Chappell, 2002). El análisis de la distribución de las diferencias genéticas en *L. vannamei* no mostró correspondencia con el modelo de rápido crecimiento poblacional (Fig. 7). La huella histórica de un rápido crecimiento poblacional puede ser borrada por las fluctuaciones en el tamaño de la población (Rogers, 1995) como mostró el camarón blanco en este estudio.

Se ha sugerido que la alta diversidad genética observada en la región control del ADN mitocondrial de varias especies de camarones (*F. aztecus*, *L. setiferus*, *F. duorarum*) se debe a la alta tasa de mutación de esta región del ADN mitocondrial y a un tamaño de población grande (McMillen-Jackson y Bert, 2003, 2004); estos dos factores tienen influencia en el desarrollo y mantenimiento del número neutral de alelos que pueden ser mantenidos en una población (Kimura y Crow, 1964). Por ello el patrón de alta diversidad de la región control de *L. vannamei* que se observó en este estudio estaría en congruencia con lo observado en otros peneidos (McMillen-Jackson y Bert, 2003, 2004), debido a la cercanía filogenética entre especies del género.

Debido a la alta variabilidad de la región control de *L. vannamei*, esta región mitocondrial podría tener un gran potencial como un marcador genético en actividades de acuicultura (ej. selección de larvas, mantenimiento de la diversidad en poblaciones) y para un mejor

manejo de las actividades pesqueras a través de la valoración de monitoreo de la diversidad genética de poblacionales, las cuales podrían tener diferencias en parámetros relevantes en la pesquería (ej. tasa de crecimiento, supervivencia, tamaño poblacional).

En este estudio se demostró mediante el análisis de RFLP de la región control del ADN mitocondrial que existe estructura intra específica de *L. vannamei* en el Pacífico Oriental. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo 2 del análisis de microsatélites para las mismas localidades.

DISCUSIÓN GENERAL

Diversidad genética

La información sobre la diversidad genética en peneidos es muy variable con respecto a las medidas de diversidad genéticas reportadas, debido al tipo de marcador, al número de loci y de individuos utilizados (Benzie, 2000). Los niveles de diversidad genética observados con alozimas dentro y entre especies de peneidos, al igual que en otros decapodos, es bajo en comparación a lo esperado en otros invertebrados marinos (Hedgecock et al., 1982). Lester (1979) usando alozimas no encontró diferenciación geográfica en tres especies de peneidos del Golfo de México debido a los bajos niveles de variación genética. Los bajos niveles de diversidad genética observados en peneidos con alozimas se confirman en estudios posteriores en *P. merguensis*, y siete especies de *Penaeus* y seis de *Metapenaeus* (Redfield et al., 1980; Mulley y Latter, 1980). El uso de marcadores más variables como el ADN mitocondrial revelaron niveles más altos de diversidad genética que los de alozimas en *P. monodon*, *P. notialis* y *P. schmitti* (Sodsuk et al., 1992, 1996; Machado et al., 1993). Los mayores niveles de diversidad genética poblacional se han observado con el uso de microsatélites en *P. monodon* (Brooker et al., 2000; Supungul et al., 2000; Xu et al., 2001). La alta diversidad genética observada entre las poblaciones de *L. vannamei* en el Pacífico Oriental mediante microsatélites y ADN mitocondrial contrasta con la baja diversidad observada con alozimas (Sunden y Davis, 1991). Ambos marcadores demostraron una congruencia con respecto a los niveles de diversidad genética y del poder de diferenciación en este estudio. En particular, la alta diversidad observada con ADN mitocondrial se debe a que se utilizó la región control, que es una región hipervariable. Mediante el secuenciado de la región control se ha

confirmado su elevado número de sitios polimórficos dentro de especies como *Penaeus merguensis* (Chu et al., 2003), *Farfantepenaeus aztecus*, *Litopenaeus setiferus*, y *F. duorarum* (McMillan-Jackson y Bert, 2003, 2004). Donde el número de sitios polimórficos ha variado de 77 a 140, dentro de un fragmento de la región control de un rango de 499 a 563 bp y un número de secuencias analizadas de entre 5 y 90. En este estudio se secuenció la región control de 6 individuos. El tamaño de fragmento varió de entre 446 y 891 bp con 59 sitios variables.

Estructura genética

En los peneidos se ha observado un amplio rango de patrones intra-específicos de la estructura genético-geográfica de sus poblaciones (Benzie, 2000). Los primeros estudios con alozimas no lograron detectar estructura genética entre poblaciones de camarones (Lester, 1979, Mulley y Latter, 1980). Sin embargo, cuando las distancias entre las poblaciones estudiadas se incrementaban grandemente en miles de kilómetros, los niveles de variación se convertían significativos como en los estudios realizados en *P. monodon* de Australia e Indonesia (Benzei et al., 1992; Sugama y Haryanti, 1997). El uso de marcadores más variables, como los microsatélites y ADN mitocondrial, han mostrado que las poblaciones de camarones pueden tener una estructura genética considerable (Klinbunga et al, 1999, 2001; Xu et al., 2001). El supuesto de la existencia de panmixia en especies de camarones, debido a que desovan miles de huevos y tienen estadios larvarios plantónicos que potencialmente pueden dispersarse a través de grandes distancias por corrientes (70-100 km en 14 días) (Rothlisberg, 1982), permitiendo el flujo genético entre poblaciones, contrasta con la estructura genética observada en

algunas especie de camarones. Sin embargo, existe evidencia que un gran número de especies marinas no necesariamente alcanzan su potencial de dispersión (Knowlton y Keller, 1986; Benzie, 1998).

Sunden y Davis (1991) observaron niveles extremadamente bajos de división poblacional con alozimas en tres poblaciones de camarón blanco en contraste a los claros niveles de diferenciación poblacional de *L. vannamei* observados en este estudio. Cuando se presentan patrones de diferenciación geográfica en las poblaciones de camarones, estas diferencias parecen estar asociadas a un fuerte patrón de elementos biogeográficos (ej. corrientes, vientos, etc.) (Duda y Palumbie, 1999; Aubert y Lightner, 2000; Garcia-Machado, 2001; McMillan-Jackson y Bert, 2003, 2004). Las preferencias de hábitat y capacidades fisiológicas son otro componente que ayuda a entender los patrones de distribución geográfica de las especies. McMillan-Jackson y Bert (2003) observaron diferentes patrones de estructura genético-poblacional para dos especies simpátricas de peneidos (*F. aztecus* y *L. setiferus*) debido probablemente a sus diferencias en tolerancias fisiológicas y preferencias de hábitat. Las diferencias geográficas observadas en este estudio para las poblaciones de *L. vannamei* podrían deberse a las barreras biogeográficas que se presentan a lo largo de la región de distribución de la especie. Los bordes biogeográficos marinos frecuentemente ocurren como cambios en los patrones de circulación y condiciones ambientales, que podrían estar limitando el flujo de genes entre localidades (Avice, 1994). También pueden contribuir a la diferenciación genética factores como la preferencia de hábitat, debido a que camarones costeros pueden estar sujetos a los efectos de cuello de botella propiciados por las sequías, asolvamientos, y

sobre pesca que se pueden presentar con frecuencia en las lagunas costeras. El camarón blanco habita preferentemente en aguas poco profundas y lagunas costeras durante sus estadios larvarios y juvenil, los cuales pueden ser más afectados por los cambios en las condiciones hidrológicas costeras, resultando en severas mortalidades; que podrían producir una diferenciación genética a través del tiempo si se presenta una retención local de organismos por generaciones.

La falta de correlación entre los valores de F_{ST} y las distancias geográficas indica que la diferenciación genética las poblaciones de *L. vannamei* no está determinada por la distancia. *L. vannamei* tiene un periodo larval de 2 semanas antes de que penetre a las lagunas costeras, pudiendo potencialmente dispersarse grandes distancias por medio de corrientes oceánicas resultando en una población panmítica. Sin embargo, factores físicos (ej. barreras geográficas), oceanográficos (ej. corrientes, frentes) y biológicos (ej. comportamiento reproducción) que se presentan a lo largo del área de distribución del camarón blanco podrían estar limitando el flujo genético entre poblaciones al estar actuando solos o en combinación como barreras. El área de estudio (Fig. 10) se puede dividir en tres regiones: la parte baja del Golfo de California, donde la plataforma continental es amplia (85 km) con sedimentos aluviales de los sistemas de ríos y una gran cantidad de sistemas estuarinos, ideales para el desarrollo de *L. vannamei*. Los patrones de corrientes oceánicas están determinados por fuertes vientos en invierno que soplan del noroeste paralelos a la costa, produciendo giros y surgencias costeras, que empujan el agua fuera de la costa, y vientos que soplan del suroeste en el verano que podrían empujar aguas hacia la costa (De la Lanza, 1991). En la parte media de México, entre Cabo

Corrientes y Salina Cruz, la plataforma continental es corta (10-15 km) con menos sistemas estuarinos, y una zona llamada “Alberca de Agua Calida” frente a Guerrero y Michoacán, en la cual las aguas superficiales muestran poco movimiento y mantienen temperatura arriba de los 28 °C a través del año (Trasviña et al., 1999). Al sur de Salina Cruz (México) hasta Panamá, la plataforma continental es amplia, y las aguas costeras son principalmente afectadas por el viento; durante el invierno, fuertes vientos soplan perpendicularmente a la costa en el Golfo de Tehuantepec en México, en el Golfo de Fonseca en Honduras, y en el Golfo de Panamá, produciendo remolinos calientes y grandes, e intensas corrientes fuera de la costa (Trasviña et al., 1999; Brenes et al., 2003;

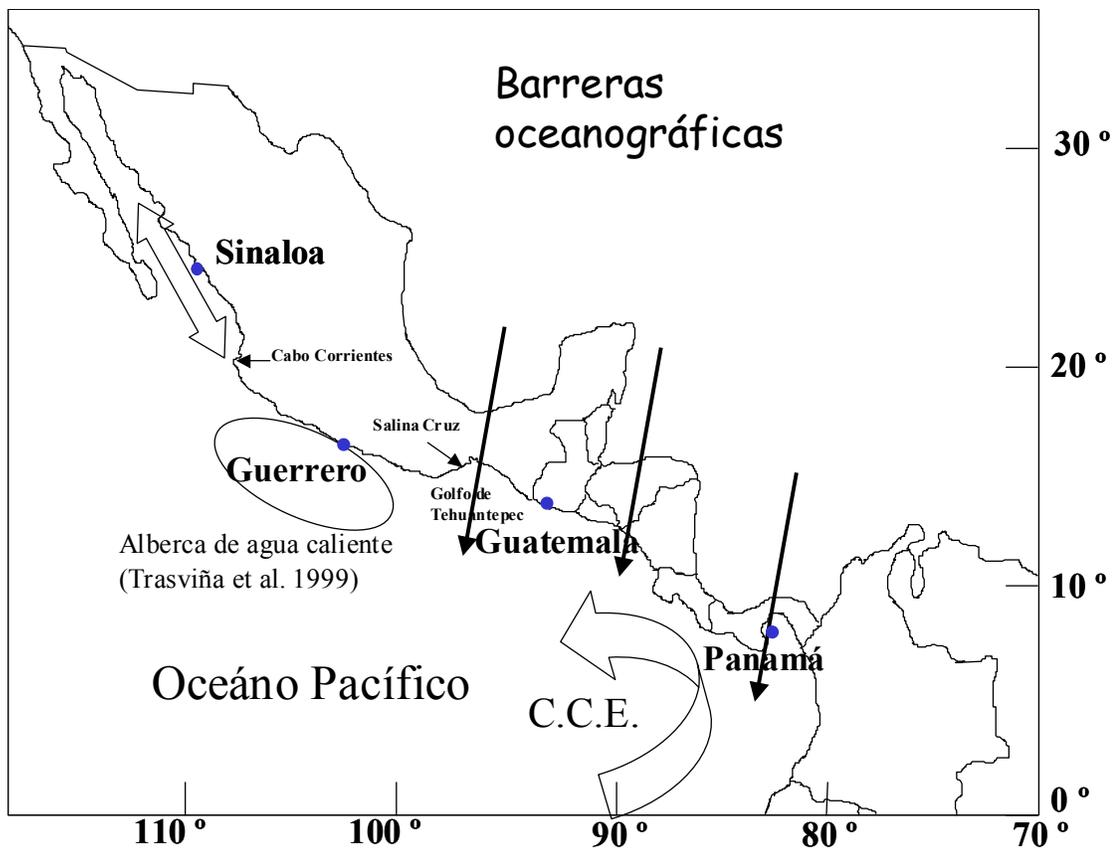


Figura 10. Sitios de colecta de muestras de *Litopenaeus vannamei* (•). Corrientes más importantes en el Pacífico Oriental (⇌), C.C.: Corriente de California; C.C.E.: Contra Corriente Ecuatorial. Vientos (↓).

Rodríguez-Rubio et al., 2003), que podrían estar transportando larvas fuera de la costa y previniendo la mezcla de poblaciones (Fig. 10). Con relación a la biología reproductiva, un descenso en el número de desoves ha sido observado con relación a la latitud en *L. vannamei* a lo largo de la costa del Pacífico Mexicano (Sepúlveda-Medina, 1997 en Cabrera-Jimenez), y muy relacionado a la temperatura del agua (Cabrera-Jimenez, 1997), que con el tiempo puede actuar como una barrera biológica.

Implicaciones de los resultados en Pesquerías y la acuicultura.

El conocimiento generado por esta investigación sobre la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *L. vannamei* en el Pacífico oriental será de una gran utilidad como base para el manejo y la administración de este recurso en actividades como pesquerías y de acuicultura. Dentro de la administración pesquera, una de las principales actividades es delimitar los volúmenes de captura del stock que es explotado. Así que la definición del stock es una de las primeras necesidades que se debe resolver. El conocimiento de la estructura poblacional de *L.vannamei* es de gran importancia en la delimitación de poblaciones y la definición de stocks. También, el monitoreo de la diversidad genética dentro de las poblaciones es importante como una medida de la salud genética de la población debido a que severas bajas poblacionales pueden ser producidas por el decremento en la diversidad genética de una población. Esto es, las poblaciones de camarones que posean una diversidad genética baja y que están sujetas a pérdida de hábitat y sobrepesca, serán más susceptibles a una depleción poblacional o extinción. Por

lo tanto, la administración de los stocks pesqueros deben considerar la estructura poblacional del camarón blanco, delimitando el esfuerzo de capturas según el tamaño del stock y su diversidad genética. Este conocimiento permitirá proteger aquellas poblaciones que posean una mayor diversidad genética como una fuente de diversidad futura, y aquellas que poseen la menor diversidad con controles de esfuerzo pesquero. Así mismo, a partir de estos resultados se puede determinar la ubicación de áreas futuras para el estudio de la estructura poblacional a una escala geográfica menor dentro del área de capturas del camarón blanco. Dentro de las actividades de la acuicultura, la definición de poblaciones y el monitoreo de la diversidad genética también son importantes. Uno de los problemas más comunes a los que se puede enfrenta el cultivo de organismos acuáticos es la endogamia, causada por la reproducción entre organismos emparentados y cuyas consecuencias económicas pueden ser muy importantes. Debido a que todos organismos endogámicos en cultivos (genéticamente similares) pueden ser susceptibles a una misma enfermedad y acabar con toda la población de cultivo. El monitoreo a través de marcadores genéticos como los microsatélites y la región control del ADN mitocondrial servirán para evaluar y controlar la diversidad genética de las poblaciones de cultivo. Finalmente, las poblaciones silvestres de camarón blanco pueden servir como reservorios naturales variación genética para ser utilizada en las poblaciones cultivadas.

CONCLUSIONES

El análisis de microsatélites y ADN mitocondrial mostraron que las poblaciones de *Litopenaeus vannamei* se encuentran estructuradas. Con base en los análisis de microsatélites y ADN mitocondrial, las localidades de Sinaloa, Guerrero, Guatemala y Panamá pueden considerarse como diferentes poblaciones. Por lo tanto, se sugiere que deben ser tratadas como unidades diferentes y deben manejarse separadamente.

El número de alelos observado con microsatélites y la diversidad en la composición de haplotipos de la región control del ADN mitocondrial indican una alta diversidad genética en las poblaciones analizadas de *Litopenaeus vannamei*, con la excepción de Guerrero.

Los bajos niveles de diversidad observados en la población de Guerrero muestran que las poblaciones silvestres de camarones son vulnerables en su constitución genética. Las poblaciones de invertebrados marinos explotadas, con características de desovadores múltiples, de altas fecundidades, dispersión larval y amplio rango de distribución geográfica, como el caso de *L. vannamei*, no están libres de depleción o extinción.

La región control del ADN mitocondrial de *L. vannamei* es una región excelente para el monitoreo de diversidad genética en organismos silvestres. Esta región tiene gran potencial para el monitoreo de la diversidad genética de organismos de cultivo y podría ayudar a identificar poblaciones dentro de las actividades de acuicultura.

RECOMENDACIONES

1. Investigar la estructura poblacional del camarón blanco a una escala geográfica menor para identificar los límites poblacionales entre las localidades estudiadas.
2. Monitorear la diversidad genética de poblaciones silvestres y de cultivo, principalmente de las regiones donde se realizan ambas actividades. Esto podría ayudar para tener un manejo genético adecuado entre los organismos silvestres y de cultivo.
3. Es importante evitar el traslado de organismos silvestres entre lagunas costeras y a estanques de cultivo, sin que previamente se evalúen las posibles consecuencias genéticas que puede traer consigo esta actividad. De ser posible se debe tener en cuenta el uso de parámetros de diversidad genética de las poblaciones.
4. Utilizar la región control del ADN mitocondrial para la evaluación de la diversidad genética de poblaciones de cultivo podría ayudar a la identificación de endogamia. Debido a que el ADN mitocondrial evoluciona más rápido que los microsatélites, es posible observar cambios genéticos en pocas generaciones en comparación con microsatélites.
5. Es recomendable monitorear los valores de diversidad genética dentro de una población a través de tiempo. Cuando las poblaciones presentan distintos periodos reproductivos como en el caso del camarón blanco es importante comparar si existen variaciones genéticas en estos eventos.

Referencias

- Aubert, H., D.V. Lightner. (2000) Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. *Mar Biol* 137: 875-885.
- Avise, J. C. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Baldwin, J. D., A. L. Bass, B. W. Bowen, W. H. Jr. Clark. (1998) Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. *Mol Phylogenet Evol* 10: 399-407.
- Ball, A. O., S. Leonard, R. W. Chapman. (1998) Characterization of (GT)_n microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Mol Ecol* 7: 1247-1263.
- Beardmore, J. A., G. C. Mair, R. I. Lewis. (1997) Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquac Res* 28: 829-839.
- Benzei, J.A.H. 1998. Penaeid genetics and biotechnology. *Aquaculture* 164:23-47.
- Benzie, J. A. H. (2000) Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquac Res* 30: 95-119.
- Benzie, J. A. H., E. Ballment, S. Frusher. (1993) Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: preliminary data from allozymes and mtDNA. *Aquaculture* 111: 89-93.
- Benzie, J. A. H., S. Frusher, E. Ballment. (1992) Geographical variation in allozyme frequencies of *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda) populations in Australia. *Aust J Mar Fresh Res* 43: 715-725.
- Bouchon, D., C. Souty-Grosset, R. Raimond. (1994) Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *P. japonicus* Bate. *Aquaculture* 127: 131-144.
- Brenes, C. L., J. E. Coen, D. B. Chelton, D. B. Enfield, S. León, S., D. Ballesterro. (2003) Wind drive upwelling in the Gulf of Nicoya, Costa Rica. *Int J Remote Sens* 24(5): 1127-1133.
- Brooker, A. L., J. A. H. Benzie, D. Blair, J. J. Versini. (2000) Population structure of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in Australian waters, determined using microsatellite markers. *Mar Biol* 136: 149-157.
- Cabrera-Jiménez, J. L. (1997) Los períodos de presencia y ausencia de las postlarvas del camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* Boone (CRUSTACEA, DECAPODA, PENAEIDAE) en una boca litoral tropical. *Rev Invest Mar* 3: 260-267.
- Carvalho, G. R., L. Hauser. (1994) Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev Fish Biol Fisher* 4: 326-350.

- Castric, V., L. Bernatchez, K. Belkhir, F. Bonhome. (2002) Heterozygote deficiencies in small lacustrine populations of brook charr *Salvelinus fontinalis* Mitchell (Pices, Salmonidae): a test of alternative hypotheses. *Heredity* 89: 27-35.
- Castro, J. A., A. Picornell, M. Ramon. (1998) Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. *Internatl Microbiol* 1: 327-332.
- Chakraborty, R. (1990) Mitochondrial DNA polymorphism reveals hidden heterogeneity within some Asian populations. *Am J Hum Gen* 47:87-94.
- Chappell, J. (2002) Sea level changes forced ice breakouts in the last Glacial cycle: new results from coral terraces. *Quaternary Sci Rev* 21: 1229-1240.
- Chu, K. H., C. P. Li, Y. K. Tam, S. Lavery. (2003) Application of mitochondrial control region in population genetic studies of the shrimp *Penaeus*. *Molec Ecol Notes* 3: 120-122.
- Crow, J. F., A. M. Kimura. (1965) Evolution in sexual and asexual populations. *Am Nat* 99: 439-450.
- Cruz, C. P., H. Mejia-Ruiz, R. Perez-Enriquez, A. M. Ibarra. (2002) Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Mol Ecol Notes* 2: 239-341.
- Cruz, C. P. (2003) Identificación, caracterización y herencia de microsatélites y su aplicación como marcadores moleculares en un programa de mejoramiento de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de doctorado. La Paz, B. C. S., México.
- Cruz, P., A. M. Ibarra, H. Mejia-Ruiz, P. M. Gaffney, R. Perez-Enriquez. (2004) Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Mar Biotechnol* 2: 157-164.
- De la Lanza, G.E. (ed) (1991) *Oceanografía de mares mexicanos*. AGT Editor, S. A. México.
- De la Rosa-Velez, J., R. Escobar, F. Correa, E. Félix. (1999) High allozyme variation and genetic similarity of two populations of commercial penaeids, *Penaeus brevisrostris* (Kingsley) and *P. vannamei* (Boone), from the Gulf of California. *J Roy Stat Soc* 30: 459-463.
- De la Rosa-Velez, J., R. Escobar-Fernández, F. Correa, M. Maqueda-Cornejo, 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. *Fish Bull* 98: 674-683.
- Duda, T. F. Jr., S. R. Palumbie. (1999) Population structure of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, among western Indian Ocean and western Pacific populations. *Mar Biol* 134: 705-710.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, J. M. Quattro. (1992) Analysis of molecular variance from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

- Felsenstein, J. (1993) Phylip (Phylogeny Inference Package), Version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, SK-50, University of Washinton, Seattle.
- Féral, J-P. (2002) How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *J Exp Mar Biol Ecol* 268: 121-145.
- Gaffney, P. M., T. M. Scott, R. K. Koehn, W. J. Diehl, (1990) Interrelationships of heterozygosity, growth rate heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics* 124: 687-699.
- Garcia, D. K., M. A. Faggart, L. Rhoades, A. A. Alcivar-Warren. (1994) Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Mol Mar Biol Biotech* 5: 270-280
- Garcia-Machado, E., A. Robainas, G. Espinosa, M. Oliva, J. Páez, N. Verdecia, M. Monnerot. (2001) Allozyme and mitochondrial DNA variation in Cuban populations of the shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea: Decapoda). *Mar Biol* 138: 701-707.
- Goldstein, D. B., C. Schlötterer. (1999) Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press.
- Goudet, J. (1995) FSTAT. Version 1.2 : A computer program to calculate *F*-statistic. *J Hered* 86: 485-486.
- Graves, J. E., J. R. McDowell. (1994) Genetic analysis of striped marlin (*Tretrapturus audax*) population structure in the Pacific Ocean. *Can J Fish Aquat Sci* 51: 1762-1768.
- Harrison, R. G. (1989) Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology. *TREE* 1: 6-11.
- Hedgecock, D. 1994. Population genetics of marine organisms. U.S. Global New. No. 6, april.
- Hedgecock, D., M. L. Tracey, K. Nelson. (1982) Genetics. In : *The Biology of Crustacea* (ed.): L. G. Abele. Academic Press, New York. pp. 284-403.
- Hedrick, P. W. (1999). Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53: 313-318.
- Hedrick, P. W., P. S. Miller. (1992) Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecol Appl* 2(1): 30-46.
- Hewitt, G. M. (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol J Linn Soc* 58: 247-276.
- Hoolihan, J. P., J. Premanandh, M.- A. D'Aloia-Palmieri, J. A. H. Benzie. (2004) Intraspecific phylogeographic isolation of Arabian Gulf sailfish *Istiophorus platypterus* inferred from mitochondrial DNA. *Mar Biol* 145: 465-475.
- Hwang, U., W. Kim. (1999) General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean J Parasitol* 37: 215-228.

- Jarne, P., P. J. L. Lagoda. (1996) Microsatellites from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 10: 424-429.
- Kimura, M., J. F. Crow. (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- Klinbunga, S., D. J. Penman, B. J. McAndrew, A. Tassanakajon. (1999) Mitochondrial DNA diversity in three population of the Giant Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. *Mar Biotechnol* 1: 113-121.
- Klinbunga, S., D. J. Penman, B. J. McAdrew, A. Tassanakajon, P. Jarayabhand. (1998) Genetic Variation, Population Differentiation and Gene Flow of the Giant Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Inferred from mtDNA-RFLP Data. In Flegel T. W. (ed) *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Klinbunga, S., D. Siludjai, W. Wudthijinda, A. Tassanakajon, P. Jarayabhand, P. Menasveta. (2001) Genetic heterogeneity of Giant Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and mitochondrial DNA RFLP analyses. *Mar Biotechnol* 3: 428-438.
- Knowlton, N. and B. D. Keller. 1986. Larvae which fall far short of their potential: highly localized recruitment in an alpheid shrimp with extended larval development. *Bulletin of Marine Science* 39: 213-223.
- Lavery, S., C. Morit, D. R. Fielder. (1996) Indo-Pacific population structure and evolutionary history of the coco-nut crab *Birgus latro*. *Mol Ecol* 5: 557-570.
- Lavery, S., T. Y. Chan, Y. K. Tam, K. H. Chu. (2003) Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp genus *Penaeus s.l.* derived from mitochondrial DNA. *Mol Phylogenetic Evol*, in Press.
- Lester, L. J. (1979) Population genetics of Penaeid shrimp from the Gulf of Mexico. *J Hered* 70: 175-180.
- Lester, L. J., M. J. R. Pante. (1992) Genetics of *Penaeus* species. In: *Marine shrimp culture principles and practices*. A. W. Fast y L. J. Lester (Editors). Elsevier. 29-52 pp.
- Luikart, G., P. R. England. (1999) Statistical analysis of microsatellite DNA data. *TREE* 7: 253-256.
- Lunt, D. H., Lawrence E., Whipple E., Hyman, B. C. (1998) Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Mol Ecol* 7: 1441-1455.
- Martínez-Córdova, L. R., A. Campaña-Torres. (1999) Especies de peneidos actuales y potenciales para el cultivo. En: Martínez, L. R. (ed). *Cultivo de camarones Peneidos: principios y prácticas*. AGT, S. A. México, 23-38 pp.
- McElroy, D. M., P. Moran, E. Bermingham, I. Kornfield. (1991) REAP: An integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. Version 4.0. *J. Hered.* 83: 157-158

- McMillen-Jackson, A. L., T. M. Bert. (2003) Disparate patterns of population genetic structure and population history in two sympatric penaeid shrimp species (*Farfantepenaeus aztecus* and *Litopenaeus setiferus*) in the eastern United States. *Molec Ecol* 12: 2895-2905.
- McMillen-Jackson, A. L., T. M. Bert. (2004) Genetic diversity in the mtDNA control region and population structure in the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*. *J Crust Biol* 24(1): 101-109.
- Meyer, A. (1994) DNA technology and phylogeny of fish. In *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Eds. A. R. Beaumont. Chapman & Hall. 219-249 pp.
- Meyran, J.-C., M. Monnerot, P. Taberlet. (1997) Taxonomic status and phylogenetic relationships of some species of the genus *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) deduced from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 8: 1-10.
- Mulley, J. C., B. D. H. Latter. (1981) Geographic differentiation of tropical Australian penaeid prawn population. *Aust J Mar Fresh Res.* 32: 897-906.
- Navajas, M., J. Gutierrez, J. Lagnel. (1999) DNA sequences and cross-breeding experiments in the hawthorn spider mite *Amphitetranychus viennesis* reveal high genetic differentiation between Japanese and French populations. *Etmol Exp Appl* 90: 113-122.
- Navajas, M., J. Lagnel, J. Gutierrez. (1998) Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *J Hered* 80: 742-752.
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, N. Y. Columbia University Press.
- Nei, M., F. Tajima. (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97: 145-163.
- O'Connell, M., M. C. Dillon, J. M. Wright. (1998). Development of primers for polymorphic microsatellite loci in the Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). *Molec Ecol* 7: 358-359.
- O'Really, P., J. M. Wright. (1995) The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *J Fish Biol* 47: 29-55.
- Page, R. D. M. (1996) Treeview. An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp Appl Biosci* 12: 357-358.
- Palumbie, S. R., J. Benzie. (1991) Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1: 27-34.
- Park, L. K., P. Moran. (1994) Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Rev Fish Biol Fisher* 4: 272-299.
- Pemberton, J. M., J. Slate, D. R. Bancroft, J. A. Barrett. (1995) Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol Ecol* 4: 249-252.

- Pérez-Enriquez, R., M. Takemura, K. Tabata, N. Taniguchi. (2001) Genetic diversity of red sea bream *Pagrus major* in western Japan in relation to stock enhancement. *Fisheries Sci* 67: 71-78.
- Quan, J., X. Lu, Z. Zhuang, J. Dai, J. Deng, Y. Zhang. (2001) Low genetic variation of *Penaeus chinensis* as revealed by mitochondrial COI and 16S rRNA gene sequences. *Biochem Genet* 39: 7-8.
- Raymond, M., F. Rousset. (1995) GENEPOP (version 3.3): Population genetics software for exact test and ecumenicism. *J Hered* 86: 248-249.
- Redfield, J. A., D. Hedgecock, K. Nelson, J. P. Salini (1980) Low heterozygosity in tropical marine crustaceans of Australia and the trophic stability hypothesis. *Mar Biol Lett* 1: 303-313.
- Rice, W. R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 41: 223-235.
- Rodriguez-Romero, F., M. Gasca. (1999) La genética y sus aplicaciones en el desarrollo de la camaricultura moderna. En: Martínez, L. R. (ed.). *Cultivo de camarones Peneidos: principios y prácticas*. AGT, S. A., México. 261-283 pp.
- Rodríguez-Rubio, E., S. Wolfgang. (2003) On the seasonal circulation within the Panama Bight derived from satellite observations of wind, altimetry and sea surface temperature. *Geophys Res Lett* 30(7): 63-1 to 63-4.
- Rogers, A. R., H. Harpendings. (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Ecol Evol* 9: 552-569.
- Rothlisberg, P. C. (1982) Vertical migration and its effect on dispersal of penaeid shrimp postlarvae in the Gulf of Carpentaria, Australia. *Fish Bull* 80: 541-554.
- Ruzzante, D. E., C. T. Taggart, D. Cook. (1996) Spatial and temporal variation in the genetic composition of a larval cod (*Gadus morhua*) aggregation: cohort contribution and genetic stability. *Can J Fish Aquatic Sci* 53: 2695-2705.
- Schlötterer, C., J. Pemberton. (1994) The use of microsatellites for genetics analysis of natural populations. In: B. Schierwater, B Streit, G. P. Wagner y R. DeSalle. *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Birhauser Verlag/Switzerland.
- Schneider, S., D. Roessli, L. Excoffier. (2000) Arlequin ver 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- SEMARNAP. (2002). Anuario estadístico de Pesca. México, D. F. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.sagarp.gob.mx/conapesca/planeacion/anuario2002/>
- Sodsuk, S., B.J. McAdrew, D.J. Pennman. 1992. Genetic population structure of the giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798) in the gulf of Thailand and the Andaman Sea. In: D. Penman, N. Roogratri and B. McAdrew (Eds.) Proceedings of the First ASEAN-EEC Aquaculture Development and Coordination Program, AADCP, Stirling. 161-165 pp.

- Sodsuk, S., B.J. McAdrew, D.J. Pennman. 1996. Population structure and fisheries management of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in SE Asia. In: D. Penman, N. Pongthana and B. McAdrew (Eds.) Proceedings of the Second ASEAN-EEC Aquaculture Development and Coordination Program, AADCP, Phuket, Thailand.
- Sugama, K., Haryanti. 1997. Genetic variation and population structure of tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius in Indonesia. *Aquaculture*, 164.
- Sunden, S. L. F., S. K. Davis. (1991) Evaluation of genetic variation in domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. *Aquaculture* 97: 131-142.
- Supungul, P., P. Sootanan, S. Klinbunga, W. Kamonrat, P. Jarayabhand, A. Tassanakajon. (2000) Microsatellite polymorphism and the population structure of the Black Tigre Shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Mar Biotechnol* 2: 339-347.
- Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tassanakajon, A., A. Tiptawonnukul, P. Supungul, V. Rimphanitchayakit, D. Cook, P. Jarayabhand, S. Klinbunga, V. Boonsaeng. (1998). Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Molec Mar Biol Biotechnol* 2: 55-61.
- Thorpe, J. P., A. M. Solé-Cava, P. C. Watts. (2000) Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hydrobiologia* 420: 165-184.
- Trasviña, A., D. Lluch-Cota, A.E. Gallegos, A. (1999) Oceanografía y El Niño. In: V. O. Magaña R. (ed). *Los Impactos de El Niño en México*. UNAM, México, pp 69-101.
- Van Hooft, W. F., A. F. Groen, H. H. T. Prins. (2002) Phylogeography of the African buffalo based on mitochondrial and Y-chromosomal loci: Pleistocene origin and population expansion of the Cape buffalo subspecies. *Mol Ecol* 11: 267-279.
- Ward, R. D. (2000) Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* 420: 191-201.
- Weir, B. S., C. C. Cockerham. (1984) Estimation *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wilson, K., V. Cahill, E. Ballment, J. Benzie. (2000). The complete sequence of the Mitochondrial Genome of the Crustacean *Penaeus monodon*: Are Malacostracan Crustaceans More Closely Related to Insects than to Branchiopods? *Mol Biol Evol* 17 (6): 863-874.
- Wolfus, G. M., D. K. Garcia, A. Alcivar-Warren. (1997) Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture* 152: 35-47 pp.

- Xu, Z., J. H. Primavera, L. D. de la Pena, P. Pettit, J. Belak, A. A. Alcívar-Warren.
(2001) Genetic diversity of wild and culture Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* 199: 13-40.
- Zhang, D., G. Hewitt. (2003) Nuclear DNA analysis in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol* 12: 563-584.
- Zouros, E., D. W. Foltz. (1984) Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. *Malacologia* 25: 583-541.

Listado de iniciadores utilizados para amplificar cinco regiones de ADN mitocondrial de *Litopenaeus vannamei*.

Iniciador	Secuencia	Diseñado para	Región de amplificación	Autor
mt-260	CGGAGCTTGGATTGGACTTGAA	<i>Litopenaeus vannamei</i>	ND2	Gaffney, P. (2003). Sin publicar
mt-261	TGAATGATAAACCACTTGGGAAT	<i>Litopenaeus vannamei</i>	ND2	Gaffney, P. (2003). Sin publicar
mt-262	GCTCCATTTTCATTTTTGGTT	<i>Litopenaeus vannamei</i>	ND2	Gaffney, P. (2003). Sin publicar
mt-266	TGTGGGGCAAATCATAGATTT	<i>Litopenaeus vannamei</i>	ATP-8 y APT-6	Gaffney, P. (2003). Sin publicar
mt-267	GGTAAGTACCTTCTCGCGTAA	<i>Litopenaeus vannamei</i>	ATP-8 y APT-6	Gaffney, P. (2003). Sin publicar
mt-271	CGCTGGAGCTTCAGTAGA	<i>Litopenaeus vannamei</i>	COI	Gaffney, P. (2003). Sin publicar
mt-272	CGCGTAATATCTCGTCATCATT	<i>Litopenaeus vannamei</i>	COI	Gaffney, P. (2003). Sin publicar
mt-275	AGCCCATGACCTTTAACAGG	<i>Litopenaeus vannamei</i>	COIII	Gaffney, P. (2003). Sin publicar
mt-276	GACTACATCAACAAAATGTCAGTATCA	<i>Litopenaeus vannamei</i>	COIII	Gaffney, P. (2003). Sin publicar
12S	AAGAACCAGCTAGGATAAACTTT	<i>Penaeus merguensis</i>	Region Control	Chu et al. (2003).
PCR-1R	GATCAAAGAACATTCTTTAACTAC	<i>Penaeus merguensis</i>	Region Control	Chu et al. (2003).
Ile-3	GCTTACATGTTCTACCCTATCAAG	<i>Farfantepoenaes aztecus</i>	Region Control	McMillen-Jackson y Bert (2003).
"	"	<i>Litopenaeus setiferus</i>	Region Control	McMillen-Jackson y Bert (2003).
16Sar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	*	16S	Simon et al., (1994).
16Sbr	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	*	16S	Simon et al., (1994).

* Iniciadores universales

APÉNDICE II

Secuencia consenso del gene 16S de *Litopenaeus vannamei*.

CGCCTGTTTA TCAAAAACAT GTCTATATGA 30
TTGGTATGTA AAGTCTGGCC TGCCCACTGA 60
TTTATTTTAA AGGGCCGCGG TATACTGACC 90
GTGCGAAGGT AGCATAATCA TTAGTCTTTT 120
AATTGGAGGC TCGTATGAAT GGTTGGACAA 150
AAAGCAAAC TGTCTCAATTA TATTTATTGA 180
ATTTAACTTT TAAGTGAAAA GGCTTAAATA 210
AATTAAGGGG ACGATAAGAC CCTATAAAGC 240
TTTACAATAA GTTACCTATA TTATAAATTG 270
TTAGTATAAC TTGAGTTTAG GTAACGTTTG 300
TTGCGTTGGG GCGACGAGAA TATAATAAGT 330
AACTGTTCTT AAGTTATTTA ATGACAGAAA 360
TTTCTGGAAA ATTAATGATC CTCTACTAGA 390
GATCATAAGA TTAAGTACT TTAGGGATAA 420
CAGCGTAATC TTCTTTGAGA GTCCACATCG 450
ACAGGAAGGG TTGCGACCTC GATGTTGAAT 480
TAAGGGTTCC TTATAATGCA GCAGTTATAA 510
AGGAGGGTCT GTTCGACCTT TAAATCCTTA 540
CGTGATCTGA GTTCAGACCG G 561

APÉNDICE III

Secuencia consenso del gene ATP-8 y -6 de *Litopenaeus vannamei*.

AAATTCCTTC	TTAAACTGAA	TTTCTTCTTC	60
CAGAGAAGCC	TCATCGGATG	ACTGAAAGTA	90
AGTGTAGGTC	TTTAAACCT	ATAATAGTAA	120
TTAACGACTA	CTTCCGATGA	TTAAAAGATT	150
AGTTAATTAA	ACATAACATA	AGCCTGTCAT	180
GCTTAAGTAA	TCAATATCAT	TGATATCTTT	210
TGATCCCTCA	AATAGCTCCC	TTATTATGAC	240
TAAACCTATT	TCTTATATTT	TCAACCACAT	270
TTATTGTATT	TATTATCTTA	AATTATTTCA	300
TTAAAGTACC	TACAAAATT	GAAAAATCAC	330
CTTCTCCACT	ACAAAAGTA	GAAATAAATT	360
GAAAATGATA	ACAAATTTAT	TCTCAGTCTT	390
TGATCCTACA	TCAAGAGTTC	TTATACTCCC	420
TCTTAACTGA	ATATCTACCT	TCCTTGGAAT	450
GATATTTTTA	CCTATACTTT	ATTGAGCAAT	480
ACCATCACGA	TGATCCCTAT	TATGAACTTT	510
GATTACAAGA	ACTCTTCACA	AAGAATTTAA	540
AACTTTATTA	GGTTCATCTC	ATTTTGGAAC	570
TACACTCATA	TTTGTTAGTC	TTTTTAGCCT	600
TATTGTTTTT	AATAACTTTT	TAGGTCTACT	630
TCCATACGTT	TTACAAGCA	CAAGACATCT	660
TGCTATAACA	CTAGCTCTTG	CCCTACCTTT	690
ATGAGTAGCC	TTTATAATAT	TCGGATGAAT	720
TAACCACACT	CAACATATGT	TTGCTCATCT	750
TGTTCCGCAA	GGGACTCCCG	GAGCTCTTAT	780
ACTTTTTATA	GTATTAATTG	AAACCATCAG	810
AAATGTAATC	CGACCTGGTA	CCTTAGCAGT	840
GCGATTAGCA	GCTAATATAA	TTGCAGGCCA	870
CCTATTACTT	ACTCTTTTAG	GAAGAACTGG	900
TCCTTCCTTA	TCAGCTACAT	TGATTTCTAT	930
RCTTATTATT	GGACAGATCC	TATTATTAAT	960
TCTTGAAGCT	GCTGTAGCAG	TTATTCAGTC	990
ATATGTATTT	GCAGTATTAA	GAACCCTTTA	1020
TGCTAGCGAA	GTCACATAAT	AAACTAATGA	1050
CATCATCTCA	CGGACATCAC	GCCTTCCACT	1080
TAGTAGACAT	AAGACCATGA	CCTCTTACGG	1110
GCTCAATTAG	AGCTATAATA	TTAACTACGG	1140
GATTAGTTAA	ATGATTTTAC	CAATTCAATC	1170
CTGACCTATT	AATTTTAGGA	GTTAC	1195

APÉNDICE IV

Secuencia consenso del gene COI de *Litopeneus vannamei*.

TAGGMCCGCG	TCATAGACTT	ATTATCCGAG	30
CTGAATTARG	TCAACCTGGG	GAGCCTCATT	60
GGGGATGATC	AAATTTATAA	CGTAGTTGTC	90
ACAGCTCACG	CTTTTGTAAT	AATTTTTTTT	120
ATAGTTATAC	CAATTATAAT	TGGAGGATTT	150
GGTAATTGAC	TAGTACCTTT	AATGTTAGGT	180
GCCCCAGATA	TAGCCTTCCC	TCGRATGAAT	210
AATATAAGCT	TCTGGTTATT	ACCTCCTTCT	240
CTYACATTGC	TTTTATCAAG	AGGAATGGTT	270
GAAAGAGGTG	TCGGAACCGG	ATGAACGGTA	300
TACCCTCCTT	TATCTGCCAG	TATTGCTCAC	330
GCTGGAGCTT	CAGTAGATCT	TGGAATTTTC	360
TCTCTTCACT	TAGCTGGAGT	ATCTTCTATT	390
CTGGGAGCAG	TAAACTTTAT	AACAACCTGCA	420
ATCAATATAC	GAT		433

APÉNDICE IV

Secuencia consenso del gene COIII de *Litopeneus vannamei*.

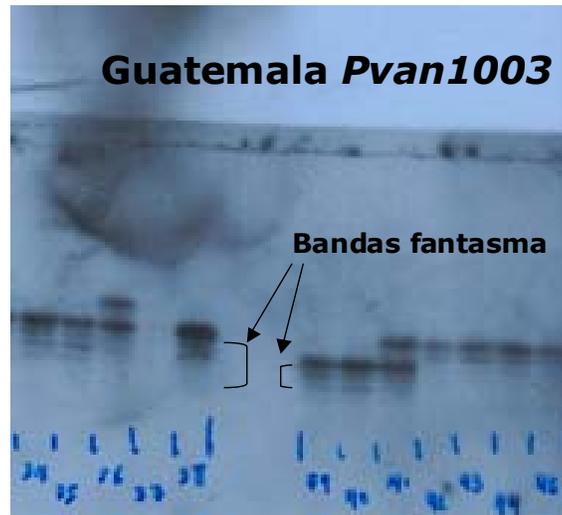
TCTTAGCGCA	CATGAATAAC	AGTGCAAGAC	30
CGTAGAAAAC	CTGTGGCAAC	AAAGAATGTG	60
GAACCATAAA	CAGAATCGGC	AATTGTAAAT	90
GGGGCTTCAT	AGTATTCTAG	AGCTTATAGT	120
GCTGTAAAAT	ATATTCCTAG	GAATACTGTA	150
ATAGCCAGAC	TTTGTATAGC	TTGGGAATGG	180
TTAGATTCTA	TAATCGCGTG	GTGAGCTCAT	210
GTTACAGTGG	CTCCAGAAGC	AAGTAAGATA	240
GCAGTATTTA	GGAGAGGAAT	CTGGAATGGG	270
TTAAAAGTTT	GAATACCTGC	TGGAGGTCAG	300
CAACTTCCTA	CTTCTACGTT	AGGAGCAAGT	330
CTTCTATGAA	AGAAAGCTCA	AAAAGRTGAA	360
AAAAAGAATA	AAACTTCTGA	GGTAATAAAT	390
AGGATTATTC	CTCATCGAAG	TCCAATAGTA	420
ACTGCCTTTG	TATGAAGACC	TTGATAAGTT	450
CCTTCTCGGT	GTAATATCTC	GTCATCGCAC	480
TGAATCTATA	GTGAGTAGTA	GTACGCAGTA	510
ATTCY			515

APÉNDICE VI

Secuencia consenso de la región control de *Litopeneus vannamei*.

TACAAAMATA	AAWTATCCCT	GTTTATAATC	30
ATAAATTTTT	TGCTCTGCAT	TAAATTGTGA	60
TAATAAAAAC	ATAGCTTTRT	AGAAAAAGAG	90
CAGAAAAAAA	AATTAATAAT	AGAACAATAT	120
ATCTYATTAA	TTTTRTATAA	GCYAAAATTA	150
ATTTTAAAAA	TTTATTTTTA	ATTAAATAGA	180
TTGATTTTTAT	ATTAATAAGAT	AGTTATAAAA	210
ATTAGTGTCT	TCTTTTTGTG	TGAAACTTTA	240
ATCAGAGAAT	ATTTAAGTTT	CACAGAAGAA	270
GACACTAATT	TATTTTAAAA	AAAATAATYT	300
TAATGAATTA	TAAARGGAAC	TTGATTTAYT	330
CTCTAGTATT	TATRWGCTTA	ATTGTAATAA	360
CAATTTAAAG	TAAGATAAAT	ATTTTCACTA	390
TTTATCTATT	GATCAATAAA	TATAAATTAA	420
CTACGCTTTA	AAGTAACACT	TTAAATATAA	450
AGATTTAAAG	TCATATTTAA	RTTAAATAAA	480
CATTTAAAGT	TAATATAGAT	AGCATAAYTG	510
TTTAAAYACAA	AACTARTGAA	TATAYAATTA	540
AACAAATATT	TATATAAAAT	CTTATTTAAA	570
TCTAGTTAAT	TAGRAAATTT	ATATGGARCT	600
TGTCAAATTT	ATATCACTAA	TATAATAGTT	630
GTTTAATTAT	AAAATAAAT	ATRATTTTAR	660
CAAAAAAAGA	AATGTTATAT	ATATTGTTGC	690
ATTCTAAAAA	AAAATTGAGG	GCAATCATAT	720
AATTCTACAA	AAAGAAAAGT	AAGAATATAA	750
ACAAAAGATG	TAATTGTTAT	TTTTGTTCTA	780
GAATAAAAGC	ATAATTATAA	TTATGTCAAA	810
TATAAAATGC	AAGCGAATAA	ATGTTTTATA	840
CAAAAAGGG	GAAAAAAGGG	GAGRAAATGT	870
AATTCTAAGT	GTAAATTAGT	TTTATTCTAA	900
AATGATTCAT	TTTTAATAAA	AAT	923

APÉNDICE VII



APÉNDICE VIII

Dendrograma de la relación entre haplotipos compuestos de *Litopenaeus vannamei*.

