

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“CARACTERIZACION DE POBLACIONES DE CAMARON BLANCO Litopenaeus vannamei y L. setiferus: ESTUDIO MORFOMETRICO Y MOLECULAR”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA DE SISTEMAS Y RECURSOS ACUATICOS) PRESENTA: BIOL. MARIA LETICIA ARENA ORTIZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS ROSAS VAZQUEZ

MEXICO, D. F. 1999

273323



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Se realizó este trabajo con la beca DGAPA IN200994 bajo la tutoría del Dr. Carlos Rosas Vázquez, Facultad de Ciencias, UNAM, en el Instituto de Ecología, A.C. Xalapa Veracruz bajo la dirección del Dr. Efraín de Luna García, en el marco del proyecto 1860-N199212 CONACYT y en la Station de Biologie Marine, Concarneau, Francia bajo la dirección del Dr. Alain Van Wormhoudt, en el marco del proyecto ECOS M97-B04.

**A Yolanda Leticia Esperanza Ortiz Aguilar**

## **Agradecimientos**

Al Dr. Carlos Rosas, el Dr. Efraín de Luna y Dr. Alain Van Wormhoudt, por la gran confianza, el gran apoyo, por ser profesores y amigos.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Luis Soto, Dr. Porfirio Alvarez, Dra. Ana Laura Ibáñez, Dra. Guillermina Alcaraz y Dra. Laura Sanvicente, por sus comentarios a mi escrito y las facilidades que me brindaron.

### **Agradecimientos personales**

Agradezco y dedico este trabajo a las personas que son muchas (afortunadamente), que tuvieron que ver con el desarrollo de esta historia y en que finalmente llegara a este momento (incluyendo a las arriba citadas). Muchas gracias a **Leticia Esperanza** mi madre, por su infinito amor, confianza, apoyo, compañía y ejemplo de fortaleza. A mi hermana **Lupita** por su existencia, su amor y sus enseñanzas. A mis abuelos **Miguel Ortiz** y **Esther Aguilar** por su ejemplo y herencia (genética). A mi padre y hermano, por existir. A **Tyson-Lalo**, por la inagotable e incondicional fuente de amor, de apoyo, de paciencia y enseñanza. A **Claudio** por ser mi guía espiritual, académico y personal. A **Marisa**, un ángel de luz bondadosa. A **Miguel Castillo** por enseñarme la definición de amistad con su ejemplo, por su gran apoyo y confianza. A la familia **Ortiz Otero** completita. A **Ariadna** por las largas pláticas trascendentales. A **Pablo** por su increíble comprensión. A mis amigas, **Bety**, **Tarin**, **Rowie**, **Guille**, a la pequeña familia. A **Alejandro Pérez** por compartir y hacerme partícipe de su talento literario y biológico. A **Lupita**, **Javi**, **Francisco**, **Roberto**, **Jorge** en Xalapa. En Cuba a la **Dra. Georgina Espinosa**, y a mis amigos **Maye**, **Damir**, **Vivian**, **Angel** y **Andres**. A mis amigos del laboratorio de Ciudad del Carmen, **Fabián**, **Paco** mi hermano, **Adrianita**, **Pedro**, **Tomas**, **Gabriel** y **Gaby**, a mis amigos del grupo **Alma Peregrina**, y a **Karla**, **Heidi** y **Mercedes** literales compañeros de danzares, a mis amigas del laboratorio de Concarneau, **Rozenn**, **Claire** e **Isabelle**, y a **Reneé** y mis tíos que hicieron fácil mi estancia en Francia, merci beaucoup. A **José Arévalo** por acortar distancias y fortalecer ánimos. A **Jorge A. González Astorga** por la semilla del poema de la manzana y la ayuda científica. A los camarones muertos para este efecto.

Muchas gracias a todos ustedes, acepten mi agradecimiento y éstas páginas que aunque no reflejan con nada la época que simboliza, es una pequeña evidencia del efecto de su existencia.

## **Indice**

	<b>pag.</b>
Resumen	i
Résumé	ii
Introducción General	2
<b>Sección I</b>	
<b>Variación morfométrica en dos especies de camarón blanco, <i>Litopenaeus setiferus</i> y <i>L. vannamei</i>.</b>	
I Antecedentes	6
II Metodología	10
III Resultados	18
IV Discusión	39
<b>Sección II</b>	
<b>Marcadores Moleculares.</b>	
I Antecedentes	41
II Metodología	43
III Resultados	47
IV Discusión	67
<b>Sección III</b>	
I Discusión General	69
II Conclusión General	73
Bibliografía	75
Apéndices	86

## Resumen

Mediante el uso de las herramientas de la morfometría y la biología molecular se reporta la variación en tres genes distintos, así como la plasticidad fenotípica expresada en la variación para algunos caracteres morfométricos entre poblaciones de dos especies de camarones.

Se analizaron 24 caracteres morfológicos de 140 organismos procedentes de dos poblaciones de *Litopenaeus setiferus* del Golfo de México y de dos poblaciones de *L. vannamei* del Pacífico, con un equipo para la captura y procesamiento de imágenes, se estableció un sistema para camarones, se calibró la técnica encontrando un error de medición de  $1.7 \times 10^{-5}$  %. Se encontraron diferencias significativas entre sexos de la población procedente de Veracruz para el largo del cefalotórax y del abdomen, en la población de Campeche las diferencias entre sexos se reportan para los segmentos abdominales, entre ambas poblaciones las diferencias son para los largos del cefalotórax, del abdomen y los anchos de los segmentos abdominales 1 y 6. Para de *L. vannamei* las poblaciones se diferencian por el largo y ancho del segmento abdominal 6 y por el largo del cefalotórax y del abdomen. Dentro de las poblaciones se observó diferencia entre los sexos para los largos del cefalotórax y abdomen y para los largos y anchos de los segmentos abdominales. Los datos fueron ajustados, y se realizaron un análisis de componentes principales y de coeficientes de variación reportando diferencias entre las poblaciones de cada especie encontrando al largo del segmento 4 como uno de los caracteres con mayor valor de coeficiente de variación en *L. setiferus* para las hembras y en machos para *L. vannamei*.

Se secuenciaron, amplificaron y analizaron 3 genes, (CO I, 16 S y Amilasa S-R) para *L. vannamei*. Se diseñaron juegos de oligonucleótidos y se realizó un análisis de dos poblaciones de *L. vannamei* y dos poblaciones de *L. setiferus* mediante RFLPs, se estandarizó la técnica y se obtuvieron patrones de bandas diferentes a los teóricos. Se utilizaron los mismos oligonucleótidos para los análisis en *L. setiferus* ya que se emplearon secuencias conservadas. Se observaron diferencias entre el número de genes amplificados en la PCR en *L. setiferus* y *L. vannamei* para la Amilasa S-R, y se encontraron diferencias en los patrones de bandas de los RFLPs, para los tres genes estudiados cuando son digeridos con taq I, así como para los sitios de corte entre las dos especies. Adicionalmente se estandarizó la técnica de microsatélites la cual detectó niveles de variación entre individuos de *L. vannamei*, encontrando diferencias en la frecuencia alélica, entre las poblaciones de esta especie.

## Résumé

L'utilisation de la morphométrie et de la biologie moléculaire a permis de différencier deux populations de deux espèces de crevettes *Litopenaeus setiferus* du Golfe du Mexique et de deux de *L. vannamei* du Pacifique. Ainsi la plasticité phénotypique est bien corrélée à la variation de certains caractères morphométriques et l'analyse de deux gènes mitochondriaux (ARN ribosomal 16S et Cytochrome oxydase I) et d'un gène nucléaire (amylase) confirme ces différences.

L'analyse de 24 caractères morphologiques de 140 organismes provenant des deux populations de chaque espèce de crevette a été faite avec un équipement permettant la capture et le traitement des images. Cet équipement spécialement adapté à l'observation des crevettes a été calibré avec une erreur sur la mesure de  $1.7 \times 10^{-5} \%$ . Chez *L. setiferus*, on a mis en évidence des différences significatives entre les mâles et les femelles de la population de Veracruz au niveau de la longueur du céphalothorax et de l'abdomen. Dans la population de Campêche, les différences entre sexes se situent sur les segments abdominaux, pour les autres populations, on observe des différences dans la longueur du céphalothorax, de l'abdomen et les largeurs des segments abdominaux de 1 à 6. Chez *L. vannamei* les populations se différencient par la largeur et la longueur du segment abdominal 6 et par les longueurs du céphalothorax et de l'abdomen. Parmi ces populations, on observe une différence entre les sexes concernant les longueurs du céphalothorax et de l'abdomen, et pour les longueurs et largeurs des segments abdominaux. Les données ont été ajustées, et une analyse en composante principale, et des coefficients de variations, a mis en évidence les différences entre les populations de chaque espèce, définissant la longueur du segment 4 comme un des caractères présentant la plus importante valeur du coefficient de variation, chez *L. setiferus* pour les femelles et chez les mâles pour *L. vannamei*.

Trois gènes (CO I, 16S et a-amylase) ont été clonés et séquencés chez *L. vannamei*. A partir de ces séquences, on a choisi un jeu d'oligonucléotides et réalisé une analyse sur les deux populations de *L. vannamei*, en utilisant la digestion par plusieurs enzymes de restriction (Rsa I, Taq I et Alu I) et l'analyse électrophorétique des fragments obtenus (RFLPs). Le pattern théorique a été retrouvé : certains individus présentent cependant l'absence de certains sites de coupure. C'est le cas par exemple du gène 16S digéré par Alu I. L'utilisation des mêmes oligonucléotides pour l'analyse de *L. setiferus* a montré la conservation des séquences choisies. Des différences ont été mises en évidence entre le nombre de gènes d'amylase amplifiés par PCR chez *L. vannamei* et avec les gènes amplifiés chez *L. setiferus*. Ainsi, des différences entre les bandes obtenues après RFLPs, pour les trois gènes étudiés sont différentes quand ils sont digérés par Taq I et correspondent à des positions des sites de digestion différents entre les deux espèces. De plus, l'existence d'un microsatellite dans l'intron 6 d'un des gènes d'amylase a permis de mettre au point la technique d'analyse des microsatellites sur gels de séquence et d'utiliser la méthode pour détecter des niveaux de polymorphisme entre les individus de *L. vannamei*. Des différences de fréquence allélique entre les populations de cette espèce ont pu ainsi être mises en évidence et en faire un outil puissant pour l'analyse des populations.



FALTA PAGINA

No. **1**

## I Introducción General

Dada la importancia comercial de los camarones, estos organismos han sido objeto de numerosos trabajos. Entre otros aspectos se han explorado las características biológicas de estas especies (Bliss, 1983; Chow y Sandifer, 1991), las relaciones evolutivas (Chow y Sandifer, 1991; Mulley y Latter, 1981), la estructura y variación genética (Benzie et al., 1993, Lester, 1979; Rodríguez et al., 1982), y el monitoreo del estado genético de las poblaciones silvestres. Estos estudios se han enfocado en la obtención de herramientas en la protección de poblaciones naturales e implementar programas de protección ecológica (Chow y Sandifer, 1991) y programas de seguimiento del efecto de cerrar ciclos de vida en cultivo, en países donde la camaronicultura es una actividad importante. En nuestro país el camarón es el recurso marino que más divisas aporta. Según el anuario estadístico de Pesca 1997, en ese año se pescaron 88,489 toneladas en el Pacífico y 21,984 toneladas en el Golfo y Caribe. Debido a su alto y rápido crecimiento, a su resistencia y adaptabilidad en condiciones de cultivo, a su aceptable maduración en cautiverio y al conocimiento existente sobre sus requerimientos nutricionales, las especies cultivables de camarón preferidas en el hemisferio occidental han sido *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 en el Pacífico (Martínez, 1993), y *Litopenaeus setiferus* Linnaeus 1767, (Food and Drug Administration, 1992) en el Golfo de México. El camarón blanco del Pacífico *L. vannamei*, es una especie nativa de la Costa Oeste del Pacífico y su distribución se extiende desde Sonora en el Golfo de California, México, hasta las costas del Norte de Perú (Farfante, 1997). En tanto que el camarón blanco *L. setiferus* se distribuye desde la costa Atlántica Norte de los Estados Unidos hasta el Noreste de la Península de Yucatán (Farfante, 1997). Para el caso de los camarones, existen numerosos tipos de estudios con base en las diferencias morfológicas entre especies usados para distinciones taxonómicas, pues las especies del género *Litopenaeus* difieren en una variedad de características morfológicas, reflejo de las diferencias genéticas entre ellas (Lester y Pante, 1992). Este tipo de estudios están enfocados a la estructura de los genitales, apéndices, rostrum o a la forma del caparazón. No obstante, los estudios de la variación entre especies en caracteres relacionados con la talla, la forma y otros caracteres comerciales son muy escasos.

Los estudios de morfometría de camarones son ampliamente utilizados en la identificación de postlarvas donde características como diferencias en el radio antenular pueden ser una herramienta importante para la descripción de especies y para distinguir entre ciertos géneros. Además de que existen evidencias de que caracteres como el largo del rostrum y el tamaño de espinas y espinulas es distinto en poblaciones silvestres y de cultivo (Kitani, 1993). Por otro lado están los estudios dentro de programas de cultivo, con fines de selección y mejora en la que se utilizan estructuras de interés comercial, como lo son el largo y peso del abdomen, el largo total y ancho de los organismos, etc. (Acosta, 1994) También ha sido analizada la relación de la variación morfométrica con la tasa de crecimiento (Conceicao, 1993) Las características morfológicas en particular son ampliamente utilizadas en los estudios de los patrones de variación geográfica debido a que pueden ser causadas tanto por condiciones ecológicas como factores históricos (Thorpe, 1976).

La interpretación de los datos resultantes de la medición de variables discretas ó continuas (peso del cuerpo, o distancia entre dos puntos) ha sido de gran importancia en el entendimiento de algunos fenómenos biológicos, como por ejemplo: en estudios de relaciones filogenéticas, ecomorfología, historias de vida, desarrollo animal, estructura de comunidades, procesos ecológicos, así como en el esclarecimiento de problemas en sistemática, ecología, medicina, agronomía y otros campos (Molvray et al., 1993; Yezerinac et al., 1992). No obstante en organismos marinos de importancia económica, donde históricamente se trabajaba con base en la morfometría y en las historias de vida, actualmente se ha reconstruido la filogenia a partir de la combinación de distintas herramientas como lo son los caracteres morfológicos, fisiológicos y ontogénicos, hibridación del ADN, variación en la movilidad de proteínas, cariotipos y polimorfismos en secuencias de ADN (McKay et al., 1996).

En el afán de obtener conocimiento de la estructura de las poblaciones y las relaciones filogenéticas, en los camarones, se ha incrementado el uso de técnicas moleculares (Benzie et al., 1993; Bouchon et al., 1994; Machado et al., 1993; Machado, 1996; Van Wormhoudt y Sellos, 1996). Se ha recomendado complementar los estudios con base en la morfometría (Arena, 1995; Mulley y Latter, 1981; Rodríguez et al., 1982, Van Wormhoudt y Sellos, 1996) pues se ha observado que los datos morfológicos y moleculares se complementan (Lawrence, 1991). En los últimos años los avances en la tecnología de la biología molecular y la

bioquímica, han permitido el desarrollo de una gran variedad de marcadores genéticos, que pueden ser utilizados para responder a problemas de manejo y conservación de especies, caracterizando la variación entre poblaciones (Rigaa, 1997). En el caso de los peces los marcadores genéticos ya se han aplicado al análisis de *stocks* para el cultivo, en la acuicultura y en la sistemática (Moira y Danzmann, 1998). También estos han sido adoptados como herramientas para el estudio de los ahora Litopeneidos. En relación con otros organismos, los camarones Litopeneidos tienen niveles bajos de variación de alonzimas, (Hedgecock et al., 1982), por lo que se han desarrollado métodos para analizar la variación de ADN mitocondrial (ADNmt), para conocer con más detalle la estructura tanto de poblaciones silvestres como provenientes de cultivo (Benzie et al., 1993; Bouchon et al., 1994; Tassankajon et al., 1997). Las secuencias de ADN mitocondrial, se han usado para examinar diferencias moleculares entre especies de camarones *Litopeneidos* y los datos demuestran diferencias genéticas entre especies morfológica y ecológicamente similares (Palumbi y Benzie, 1991). Como el ADNmt presenta variación tanto entre individuos como entre poblaciones, lo hace un efectivo marcador de la estructura de poblaciones y de los patrones de variación geográfica. También puede ser una herramienta útil para detectar diferencias dentro de poblaciones y entre especies (Harrison, 1989, Silberman et al., 1994).

Otra de las técnicas que ha sido desarrollada y utilizada para monitorear variación genética es el polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLPs). Esta es una técnica para los camarones es relativamente rápida, y en la cual no se requiere de radioactividad o equipamiento caro, (Lessa y Applebaum, 1993). Recientemente el uso de microsatélites ha surgido como una herramienta muy poderosa en la investigación de genética de poblaciones (Morán et al., 1997). También se ha observado que todos los tipos de microsatélites muestran variación en el número de repeticiones y reflejan un nivel de polimorfismo generalmente mayor que el de una hebra de una secuencia única, por lo tanto los microsatélites se usan en pruebas de identidad, en estudios de poblaciones en análisis de linajes y mapeo genético (Estoup et al., 1993).

Por otro lado, en los últimos años en el caso particular de los Decápodos el uso del ADN mitocondrial así como el estudio de genes como el 18S Ribosomal y el estudio de los polimorfismos en las isoenzimas de la amilasa, como marcadores genéticos adicionales, se han

implementado en los estudios poblacionales y de evolución (Van Wormhoudt, 1995, Van Wormhoudt y Sellos, 1996).

Con base a la experiencia de trabajo anterior (Arena, 1995), estudio en el que se utilizaron algunos caracteres morfológicos de interés comercial como el largo y peso del abdomen, con lo cual es posible hacer cálculos de rendimientos alimenticios y a su vez se analizaron los polimorfismos de ocho enzimas para comparar los niveles de variación morfológica y heterogeneidad genética, entre dos poblaciones del antes *Penaeus setiferus* ahora *L. setiferus* (Farfante, 1997) del Golfo de México, se obtuvieron resultados preliminares de diferencias en la variación morfológica y genética entre estas dos poblaciones. Estos resultados abrieron el camino para estudios con el uso de técnicas mas finas que permitan acercarse más al estado de las poblaciones de esta especie que es de gran importancia económica en México.

### **Objetivo**

En el presente trabajo se han elegido las herramientas de la morfometría y la biología molecular, para explorar la variación geográfica entre sexos de dos poblaciones de camarón blanco, *L. setiferus* del Golfo de México y dos poblaciones de *L. vannamei* del Pacífico.

## SECCIÓN I

### Variación morfométrica en dos especies de camarón blanco, *Litopenaeus setiferus* y *L. vannamei*.

#### I Antecedentes

El campo de la morfometría está interesado en los métodos de descripción y análisis estadísticos de la variación de la forma entre y dentro de muestras de organismos. Las muestras que pueden representar localidades geográficas, estadios del desarrollo, efectos genéticos, ambientales, etc., así como el análisis de los cambios de forma resultantes del crecimiento, de tratamientos experimentales o de la evolución, utilizando la descripción o la comparación de formas de organismos o de estructuras en particular. Para Bookstein (1982), la morfometría es una fusión empírica de la geometría con la biología, ya que en este método se obtiene información de las fuentes geométrica y biológica de los individuos, con el propósito comparativo tanto en estudios de crecimiento, anomalías o diferencias taxonómicas (Davis y Gilmartin, 1985; Rohlf y Marcus, 1993). En el caso de los organismos marinos de importancia comercial y en particular para los camarones la morfometría ha sido una de las herramientas en investigaciones enfocadas a los análisis filogenéticos (Lawrence, 1991) en estos, las estructuras centrales de los análisis son características específicas de estructuras como antenas, las maxilas, maxilípedos, pereópodos, urópodos, etc. En otros casos la descripción y comparación de caracteres morfométricos en los diferentes estadios de mudas, sirven en la identificación de postlarvas entre diferentes especies (Kitani, 1991). Por otro lado también en algunos de los estudios relacionados con fines comerciales, en estudios de selección o bien de mejora se emplea la información proveniente del análisis de datos morfométricos (Acosta, 1995; Espinosa, 1989; Martínez, 1993; Primavera et al., 1998, Rodríguez et al., 1982). Así mismo esta herramienta ha contribuido a la información de la variación geográfica para caracteres morfométricos (Lester, 1979; Rodríguez et al., 1982). En este sentido en un trabajo preliminar (Arena, 1995), se relacionaron la varianza poblacional de algunos caracteres morfológicos de interés comercial con el nivel de heterocigosidad en loci enzimáticos, para

dos poblaciones de camarón blanco *L. setiferus* en el Golfo de México, encontrándose diferencias en los niveles de variación morfométrica y bioquímica.

En las últimas décadas se ha aplicado la estadística multivariada a los grupos de variables de interés (algunos ejemplos, son los análisis de componentes principales, los análisis canónicos y las funciones discriminantes). Estas variables corresponden usualmente a varias distancias medidas en un organismo e implica la digitalización (adquisición de la información geométrica) y la manipulación estadística de las medidas. Las medidas son usualmente largos y anchos de estructuras y distancias entre algunos puntos definidos. Algunas veces se utilizan ángulos y proporciones, y en algunos estudios se analiza la alometría (cambios en forma en función del tamaño) y corrección de la talla (para permitir el estudio de las diferencias en forma entre muestras de organismos ajustados a una talla común). Los resultados son expresados numérica y gráficamente en términos de combinaciones lineales en las variables medidas. Como resultado, un grupo de datos morfométricos es una representación abstracta de la información original, archivada en un número adecuado de patrones de distancias, o bien por coordenadas cartesianas, o vectores como se emplea actualmente (Rohlf y Marcus, 1993)

Los datos morfométricos, tienen cierta variación que ha sido denominada error de medición (EM). Este puede ser determinado por la medición repetida de un carácter y ser expresada como un porcentaje. Dicho porcentaje es el valor de la variación de la muestra asociado a la imprecisión de la medida (Bailey y Byrnes, 1990). El EM puede deberse a la falta de puntos bien definidos al medir a los organismos, flexibilidad en la estructura medida, experiencia en buscar y tomar medidas, variación entre observadores, precisión del aparato con el que se mide, continuidad con que se hacen las medidas, y tamaño de la estructura en relación al método de medición, entre otras (Yezerinac et al., 1992). Por este motivo en los análisis morfométricos se ha utilizado el concepto de error de medición como la variación que aporta el sistema de medición a un carácter particular. Cuando el EM no es tomado en cuenta los trabajos que pueden verse afectados e incluso fracasar son justamente los estudios donde se comparan individuos o grupos de la misma especie, tales como las evaluaciones morfológicas en que las diferencias entre grupos pueden ser pequeñas, los estudios de heredabilidad donde la variación intraespecífica es probablemente pequeña, los estudios en los que la muestra puede ser pequeña y el proceso de medición es corto, los estudios a largo plazo en que las

comparaciones biológicas son hechas entre animales medidos al comienzo y al final del período de estudio, etc. (Baley y Byrnes, 1990).

El desarrollo de las computadoras ha reducido las labores de adquisición de imágenes, de colección de medidas y se ha disminuido el grado de imprecisión, así como también se han desarrollado procedimientos poderosos de análisis estadísticos de los datos (Molvray et al., 1993). Actualmente existen distintas tecnologías para la adquisición de información de formas de especímenes biológicos. Una son las tabletas digitalizadoras sobre las cuales se localizan puntos de referencia ya sea del organismo o de dibujos o fotografías, las cuales son muy útiles cuando el objeto a medir no tiene volumen. La información es registrada en una computadora en forma de matriz sin quedar guardada la forma (Molvray et al., 1993).

En el pasado la información de los organismos se guardaba básicamente en dibujos y en film fotográfico, ya sea en fotografías, negativos, transparencias, etc. El desarrollo de la digitalización de imágenes supera con mucho las limitaciones del material fotográfico, como es el alto costo de reproducción, almacenamiento, formas de envíos etc. y trae consigo numerosas ventajas, pues la captura es rápida y se almacenan en una variedad amplia de opciones electromagnéticas, formando bancos de imágenes de las cuales se pueden obtener impresiones de alta calidad, reproducción rápida e incluso pueden ser enviadas por correo electrónico para intercambio entre investigadores. Otra alternativa es adaptar a las computadoras una cámara de video y un paquete de cómputo para procesar esas imágenes (Rohlf y Marcus, 1993)

En el presente estudio se han elegido dos de las especies de camarón de gran importancia comercial en nuestro país *Litopenaeus vannamei* y *L. setiferus*, para profundizar en el conocimiento de la variación geográfica y el dimorfismo sexual para algunos caracteres morfométricos, con base en evidencias anteriores de que a lo largo de su distribución estos organismos presentan distintos niveles de variación, relacionados quizá al conjunto de los factores ambientales, ecológicos, genéticos e históricos de estas especies. Se han elegido dos poblaciones de cada especie, para el caso de *L. vannamei* dos puntos separados geográficamente dentro del territorio nacional como son las costas de Sonora y Chiapas, y para *L. setiferus* se colectó en las dos zonas de incidencia e importancia pesquera en el Golfo de México: Veracruz y Campeche.



## Objetivos

- a) Adaptar un sistema de captura de imágenes para camarones *Litopenaeidos*
- b) Caracterizar el nivel de precisión del sistema, calibrando el error de medición que aporta esta técnica.
- c) Determinar la variación geográfica para 24 caracteres morfológicos entre sexos y poblaciones de *L. vannamei*.
- d) Determinar la variación geográfica para 24 caracteres morfológicos entre sexos y poblaciones de *L. setiferus*.

## II Metodología

### Colecta

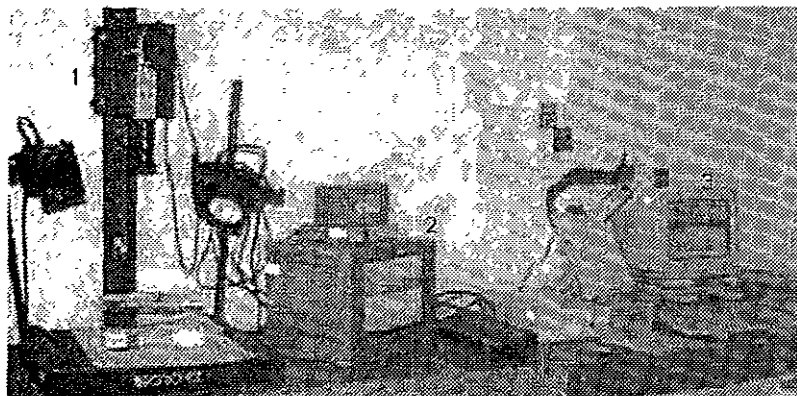
Los organismos utilizados en el presente estudio fueron colectados utilizando redes de arrastre de barcos camaroneros, obteniendo organismos en un intervalo de tallas que están entre 89.6 y 156.8 mm. (Fig. 1). Se colectaron un total de 140 organismos adultos provenientes de cuatro poblaciones, de dos especies de *Litopenaeus*, identificados como *L. setiferus*, y *L. vannamei*. (Farfante, 1997). Los organismos fueron fijados en alcohol al 70% para su posterior análisis.



**Figura 1.** Mapa de la República Mexicana donde se muestran las zonas de colecta para este estudio. 1=Huatabampo, Sonora, 2=Costa de Chiapas, 3= Tuxpan, Veracruz, y 4= Cd. del Carmen Campeche.

## Equipo para la captura de imágenes

El análisis morfométrico se realizó utilizando equipo y un programa, de captura y procesamiento de imágenes (Fig. 2).



**Figura 2.** Equipo utilizado para la captura y procesamiento de imágenes. 1=Soporte de la cámara de video y de iluminación, 2=Monitor donde se regula la calidad de la imagen antes de su captura, 3=Computadora PC donde se almacenaron y procesaron las imágenes

El programa empleado fue Image-Pro plus, un paquete que permite la adquisición de imágenes con una cámara de video (CCD, VCR) o un CD, lee y salva las imágenes en todos los formatos estándares como, TIFF, JPEG, BMP, GIF, TGA (Media cybernetics, 1994). Se trabajó con una cámara de video Sony CCD- Iris a color modelo DXC-107A, para capturar las imágenes a partir del animal fijado en alcohol. Las imágenes se almacenaron con formato tiff. Se trabajó en blanco y negro, debido a que los animales pierden su coloración original al ser fijados en alcohol y no era un carácter de interés en este estudio (sin embargo, con este equipo se puede trabajar también a color). El programa permite trazar y dar contorno manual o automático a objetos, midiendo atributos como área, ángulos, perímetros y diámetros. Por las características de los animales se utilizó la opción de medición manual para medir 24 caracteres morfológicos para cada uno de los 140 ejemplares (Tabla 1)

Tabla 1. Caracteres morfológicos analizados en este estudio, registrados en mm.

Número	Medida
LT	Largo total
L1	Largo del cefalotórax
L2	Ancho del cefalotórax
L3	Largo del segmento 1
L4	Ancho del segmento 1
L5	Largo del segmento 2
L6	Ancho del segmento 2
L7	Largo del segmento 3
L8	Ancho del segmento 3
L9	Largo del segmento 4
L10	Ancho del segmento 4
L11	Largo del segmento 5
L12	Ancho del segmento 5
L13	Largo del segmento 6
L14	Ancho del segmento 6
L15	Largo 1 del telson
L16	Ancho pleópodo 1
L17	Ancho pleópodo 2
L18	Ancho pleópodo 3
L19	Ancho pleópodo 4
L20	Ancho pleópodo 5
L21	Largo del rostrum
L22	Largo 2 del cefalotórax
L23	Largo del abdomen
L24	Largo 2 del telson

Se calibró la escala espacial para registrar las mediciones en milímetros. Como los datos que se generan con este programa puede intercambiarse dinámicamente con *excel* y otros programas de ambiente *windows*, en este trabajo los datos generados fueron almacenados en una matriz 166x28, en Excel 5.0

Se tomaron dos imágenes a cada animal, una dorsal y otra lateral (Fig. 3). Cada imagen cuenta con la información referente a: sexo, fecha y localidad de colecta, número de dientes rostrales (DR) y observaciones como alguna malformación y/o estado de conservación del individuo.

Debido a la característica transparencia del exoesqueleto que impide distinguir claramente los límites entre segmentos, en el caso de la imagen lateral fue necesario colocar alfileres como una referencia entre los segmentos abdominales de cada camarón, para resaltar los límites y hacer más fácil la medición sobre las imágenes digitales. En cada imagen se incluyó una regla, debido a que el programa expresa las medidas espaciales en píxeles, la regla sirve como referencia, para calibrar y registrar las medidas en mm.

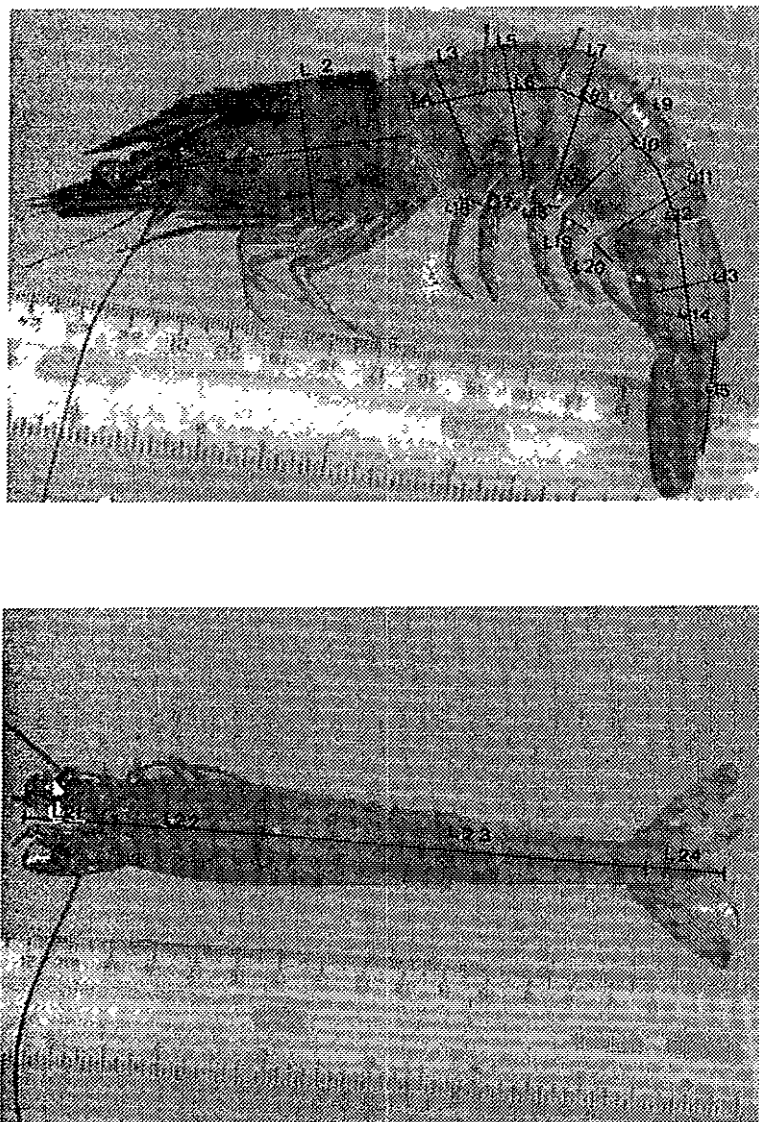


Figura 3. Imágenes lateral y dorsal que fueron capturadas para cada uno de los organismos en este estudio utilizando el programa Image-pro Plus

## Calibración del Error de Medición (EM)

Dada la importancia de la precisión de la fuente de medición en la interpretación de los resultados, se realizó un estudio de calibración de la tecnología utilizada. Utilizando el protocolo que reportan Bailey y Byrnes (1990) en el que se divide la varianza total de cada carácter en los componentes de varianza dentro y entre individuos utilizando la siguiente fórmula.

$$\%EM = \frac{S^2_{\text{entre}}}{S^2_{\text{entre}} + S^2_{\text{dentro}}} \times 100$$

Donde:

%EM = porcentaje de error de medición

$S^2_{\text{entre}}$  = varianza entre individuos (n=10)

$S^2_{\text{dentro}}$  = varianza dentro (la varianza que aporta el programa de medición que resulta de medir varias veces un mismo carácter)

Se eligieron 10 organismos al azar de una misma población y se midieron los 24 caracteres morfológicos antes mencionados 10 veces independientes, para calcular el porcentaje de error de medición.

## Análisis estadístico de los datos

### a) Prueba de normalidad

Ya que los procedimientos de la estadística paramétrica asumen que los datos tienen distribución normal. Existe un número variado de métodos para validar esta suposición (Byrkit, 1987). Antes de realizar cualquier análisis, para validar esta suposición de normalidad, se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov con el programa STATGRAPHICS versión 5. Esta prueba provee un vector con los datos observados y un vector con el valor de la distribución teórica correspondiente a cada valor, calcula la máxima distancia entre la distribución

acumulada de la muestra y la distribución teórica, si esta distancia es suficientemente grande la hipótesis de distribución de las observaciones es rechazada (Statgraphics, 1991).

#### b) Estadísticos descriptivos

Posterior a la prueba de normalidad se calcularon la media aritmética o promedio. Y la desviación estándar como medida de la dispersión de los valores respecto a la media. El valor numérico de la desviación estándar tiene significado solo en relación al valor de la media de la muestra. Se calculó el coeficiente de variación para cada variable por especie, este coeficiente expresa la desviación estándar como un porcentaje de la media. El CV es un indicador de la homogeneidad de las muestras, es usado particularmente cuando se comparan muestras de la misma especie en diferentes localidades o cuando se trata de investigar la variación de distintas variables en la misma muestra (Lewontin, 1966)

#### c) Análisis de varianza

Se utilizó el análisis de varianza como herramienta para explorar las diferencias entre y dentro (diferencias entre sexos) poblaciones en ambas especies. Este procedimiento determina que tanto de la variación de nuestras observaciones esta dada por diferencias en la población y que tanto por la variabilidad al azar, por la comparación de estos dos reinos de variación podemos determinar la diferencia en poblaciones (Campel, 1987). Analiza la variación total de todos los datos y entonces muestra que tanto de la variabilidad es causada por diferencias entre poblaciones y que tanto dentro de las poblaciones separadas. Esta técnica fue desarrollada para probar la hipótesis de que la media de poblaciones distintas es o no igual (Brykit, 1987). Para el análisis se organizaron los datos en matrices por sexos (diferencias dentro de las poblaciones) y se realizó una comparación entre cada población, para cada especie. Se aplicó la prueba de Homocedasticidad de Varianzas utilizando el programa Statgraphics versión 5, prueba en la que se acepta o rechaza dependiendo del nivel de significancia, la hipótesis de que la varianza en los distintos niveles de comparación es homogénea, para posteriormente realizar el análisis de varianzas

## Análisis de la variación dentro de las especies

No son muy frecuentes las definiciones de talla y forma (Somers, 1986). La talla describe la magnitud de un carácter mientras que la forma implica relación entre dos o mas caracteres. En el presente estudio se realizaron comparaciones a distintos niveles entre los organismos se busco una alternativa para eliminar el factor de que los camarones no son todos de la misma talla. Se han propuesto varios métodos para remover el efecto de la talla antes o durante los métodos multivariados, como son la transformación de los datos, usando proporciones, el ajuste de los datos en relación a una talla común, la extracción del primer componente en un análisis de componentes principales (Huxley, 1972; Ibáñez, 1996; Rohlf y Marcus, 1993; Somers, 1986). El objetivo de este trabajo es comparar los niveles de variación entre sexos y entre poblaciones, para lo cual se realizó una transformación a la que llamamos “filtrado de los datos” siguiendo el protocolo descrito por Ibáñez (1996), en el cual se ajustaron los datos a un valor de referencia que se describe mas adelante.

El filtrado de los datos se realizó a través de la notación:

$$Z_{ij} = Y_{ij} \frac{Y_{ij}}{X_0}$$

$Z_{ij}$  = valor que toma la variable  $Y_{ij}$  una vez transformada

$Y_{ij}$  = variable  $i$  del individuo  $j$

$X_0$  = valor de referencia de la longitud total.

Los valores de referencia establecidos, correspondientes a la media del LT en cada una de las categorías fueron los siguientes: para la matriz agregada de *L. setiferus* 120.6 mm (llamamos agregada a la matriz que contiene los datos de ambas poblaciones), para la población de Veracruz, 125.8 mm, para Cd. del Carmen Campeche, 115.42 mm. En el caso de *L. vannamei*, en los datos agrupados 130.4 mm, para Sonora 125.66 y para la población de Chiapas 140.03 mm.



Después de este procedimiento se pierde la primera columna de los datos que corresponde al LT convirtiéndose a  $X_0$  todas las columnas.

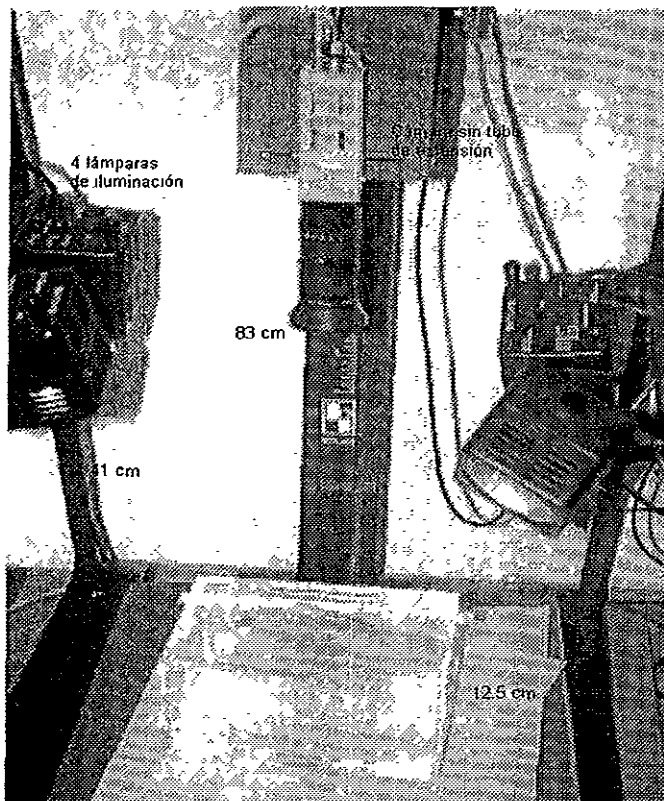
Posterior a los análisis descritos anteriormente cada una de las especies se trabajó de dos maneras, de manera agregada, las dos poblaciones en una sola matriz para cada especie y de manera desagregada, una matriz de datos para cada una de las poblaciones

### **Análisis de Componentes Principales**

Se utilizó el procedimiento analítico de componentes principales como herramienta exploratoria que permite conocer que porción de la varianza total se atribuye a cada componente del análisis. Este método transforma un grupo complejo de variables en otro grupo reducido de variables para su interpretación. Es decir partiendo de una nube de  $n$  puntos en  $p$  dimensiones, este método implica la rotación de los ejes de coordenadas originales en una nueva forma de referencia en el espacio de nuevas variables ortogonales. Cada una de las  $n$  variables originales se describe en términos de  $\lambda$  nuevas dimensiones. El primer componente es la combinación lineal de las variables originales las cuales contribuyen al máximo de la varianza total, el segundo componente principal ortogonal con el primero, contribuye al máximo de la varianza residual y así hasta que el total de la varianza es analizada. La suma de las varianzas de todos los  $n$  componentes principales es igual a la suma de las varianzas de las variables originales (Isebrands y Cow, 1975; Pielou, 1984; Somers, 1986). Así que para conocer la estructura en la relación entre las variables, así como a que carácter morfológico se le atribuye mayor porcentaje de la variación total, en los distintos niveles de comparación, tanto dentro como entre las especies, se analizaron los conjuntos de datos mediante varios análisis de componentes principales, con el programa Statgraphics v.5. Se realizó un análisis con los datos agregados, es decir para ambas especies, y otro para los datos desagregados, es decir en cada una de las poblaciones para analizar la variación entre sexos.

### III Resultados

Como resultado de la estandarización de un modelo para la captura de imágenes, se estableció un sistema de adquisición de imágenes laterales y dorsales para *Litopeneidos* adultos. Se tiene la distancia focal, el plano focal, fondo e iluminación tales que resultan en una toma en la cual se resaltan claramente los 24 caracteres morfológicos que se utilizan en este estudio (Fig. 4).



**Figura 4.** Modelo para la captura de imágenes estandarizado en este trabajo. La plataforma donde se encuentra el camarón soluciona el efecto de la iluminación reduciendo sombras y junto con la posición de las lámparas y la distancia de la cámara se logra la mejor imagen.

Se cuenta con un banco de 280 imágenes en blanco y negro en formato Tiff almacenadas en discos de alta densidad, con información individual referente a especie, sexo, localidad, número de dientes rostrales y fecha de colecta. Se generó una colección de datos en una matriz (140x28), de todos los caracteres morfológicos registrados en mm.

### **Error de Medición**

Los valores obtenidos en el estudio de calibración para calcular del Error de Medición asociado a cada carácter morfológico fluctuó entre valores de  $1.07 \times 10^{-5}$  a 6.0326 % (Tabla, 2). El programa utilizado en este estudio es de alta precisión y se encontró que la variación que aporta la técnica, es de alrededor de  $1.7 \times 10^{-5}$  %, para cada carácter. Estos resultados muestran que esta técnica es altamente confiable. Se observó que algunos caracteres, el largo del rostrum y el largo del telson experimentan cambios durante el proceso de conservación de los individuos o bien se pierde parte durante la captura. Por otro lado los pleópodos en este modelo tienen el problema de no fijarse en la misma posición cada vez, lo cual produce un error de medición mayor que el encontrado para otras medidas. Por esta razón estos caracteres (L15 a L20) fueron eliminados y no se consideraron en el resto de los tratamientos.

**Tabla 2** Valores obtenidos en el estudio de calibración para calcular el porcentaje de Error de Medición (EM) asociado a los caracteres morfológicos utilizados en este estudio.

Código	Medida	% EM
L1	Largo 1 del cefalotórax	0.0000107
L2	Ancho del cefalotórax	0.0056
L3	Largo del segmento 1	0.0036
L4	Ancho del segmento 1	0.0006
L5	Largo del segmento 2	0.0048
L6	Ancho del segmento 2	0.0098
L7	Largo del segmento 3	0.0236
L8	Ancho del segmento 3	0.258
L9	Largo del segmento 4	0.987
L10	Ancho del segmento 4	0.065
L11	Largo del segmento 5	0.0452
L12	Ancho del segmento 5	0.0078
L13	Largo del segmento 6	0.265
L14	Ancho del segmento 6	0.043
L15	Largo 1 del telson	1.943
L16	Ancho pleópodo 1	2.186
L17	Ancho pleópodo 2	5.1628
L18	Ancho pleópodo 3	6.0326
L19	Ancho pleópodo 4	2.0067
L20	Ancho pleópodo 5	0.0004
L21	Largo del rostrum	0.687
L22	Largo 2 del cefalotórax	0.0086
L23	Largo del abdomen	0.000085
L24	Largo 2 del telson	4.0308

### Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas de Kolmogorv-Smirnov demuestran que todos los datos analizados tienen distribución normal ( $\alpha=0.05$ ). En la tabla 3 se presentan los tamaños de muestra utilizados, la media de la longitud total (mm), la varianza y el rango de tallas de los organismos.

**Tabla 3.** Tamaño de muestra (n), media, varianza y rango de tallas (rango) del largo total (LT) en mm para los organismos utilizados en este estudio.

<i>L. setiferus</i>		n	media	var	rango
Veracruz	Hembras	20	128.79	47.03	116.8 - 142.8
	Machos	20	122.74	47.23	109.6 - 136.7
Carmen	Hembras	20	104.57	48.80	89.6 - 116.8
	Machos	20	126.27	40.43	116.6 - 134.0
<i>L. vannamei</i>					
Sonora	hembras	20	129.07	48.97	117.4 - 144.3
	machos	20	122.25	20.55	114.2 - 132.0
Chiapas	hembras	10	151.86	15.83	146.3 - 156.8
	machos	10	128.19	28.74	121.8 - 137.5

Los valores de los estadísticos descriptivos para cada especie se muestran en las tablas 4 y 5. En promedio, en el caso de *L. setiferus*, para los largos del cefalotórax y del abdomen en la población de campeche, los machos son de mayor tamaño que las hembras, en la población de Veracruz es al contrario, las hembras son mayores, para el caso del largo del abdomen en el caso de la población campechana las hembras tienen mayor tamaño del abdomen que los machos y éstos son mayores en cefalotórax El valor de medición para estos caracteres en la población sureña de Campeche es de mayor tamaño que la veracruzana. Para *L. vannamei* en ambas poblaciones y para estos dos caracteres las hembras son de mayor tamaño que los machos.

Tabla 4. Estadísticos descriptivos para 17 medidas (mm) de dos poblaciones del camarón blanco *L. setiferus* del Golfo de México. f=hembras, m=machos.

Medida	sexo	Ciudad del Carmen, Campeche			Tuxpan, Veracruz.		
		Promedio	Des. Est.	CV	Promedio	Des. Est.	CV
L1	f	49.73	1.92	3.86	42.30	3.81	9.02
	m	54.57	3.01	5.52	37.12	8.11	21.85
L2	f	26.95	0.94	3.51	19.86	0.29	1.47
	m	32.32	2.44	7.56	17.79	1.45	8.15
L3	f	17.39	2.10	12.04	13.36	0.16	1.20
	m	21.74	0.33	1.51	12.80	0.85	6.61
L4	f	26.51	1.20	4.51	23.48	0.42	1.77
	m	31.28	0.49	1.57	19.80	1.63	8.24
L5	f	12.54	0.52	4.12	11.59	0.11	0.97
	m	15.39	0.45	2.92	10.95	1.08	9.87
L6	f	28.60	2.41	8.42	23.78	0.63	2.66
	m	34.96	0.01	0.03	21.46	2.46	11.44
L7	f	14.08	2.51	17.84	11.26	0.99	8.83
	m	15.36	0.74	4.84	10.68	0.52	4.90
L8	f	28.03	2.27	8.09	22.91	0.54	2.36
	m	34.46	0.30	0.87	21.23	2.58	12.16
L9	f	11.96	0.48	4.05	8.86	0.11	1.23
	m	14.42	0.60	4.14	10.09	0.69	6.88
L10	f	24.87	0.26	1.05	20.03	0.64	3.21
	m	31.35	0.53	1.70	17.62	1.33	7.56
L11	f	14.79	1.28	8.67	11.22	0.94	8.35
	m	15.79	0.50	3.19	10.87	0.72	6.59
L12	f	22.21	0.30	1.33	18.45	0.12	0.65
	m	27.12	0.25	0.93	16.07	1.84	11.43
L13	f	21.74	2.58	11.85	20.03	0.78	3.91
	m	30.25	0.28	0.92	17.95	2.17	12.10
L14	f	17.78	1.18	6.63	14.89	0.37	2.50
	m	21.88	0.40	1.83	14.57	1.72	11.78
L22	f	37.43	0.00	0.00	34.10	2.09	6.12
	m	39.45	2.84	7.20	38.32	5.68	14.82
L23	f	89.97	0.00	0.00	73.02	1.57	2.14
	m	88.24	0.95	1.07	79.81	10.64	13.33
L24	f	15.05	0.00	0.00	15.20	1.24	8.18
	m	17.75	0.45	2.51	17.12	0.77	4.48

Tabla 5 Estadísticos descriptivos para 17 medidas (mm) de dos poblaciones del camarón blanco *L. vannamei* del Pacífico. f=hembras, m=machos.

Medida	sexo	Batabambo, Sonora			Chiapas		
		Promedio	Des. Est.	CV	Promedio	Des. Est.	CV
L1	f	55.49	4.06	7.32	49.55	4.42	8.92
	m	45.71	3.99	8.74	47.34	2.68	5.66
L2	f	30.63	1.91	6.24	27.83	2.63	9.45
	m	25.98	2.49	9.59	26.78	2.28	8.53
L3	f	17.00	1.34	7.86	16.79	1.05	6.28
	m	15.78	1.59	10.08	16.98	1.95	11.45
L4	f	28.96	1.31	4.52	28.07	1.97	7.03
	m	24.85	2.29	9.21	28.26	2.20	7.78
L5	f	13.07	0.98	6.52	13.74	1.05	7.64
	m	13.50	1.54	11.41	14.43	1.27	8.83
L6	f	30.62	1.64	5.36	29.69	1.56	5.25
	m	27.27	2.68	9.85	31.00	2.23	7.18
L7	f	14.97	1.23	8.19	13.73	1.30	9.49
	m	13.55	1.48	10.92	13.94	1.15	8.23
L8	f	30.84	1.51	4.90	29.33	1.92	6.54
	m	27.46	2.72	9.90	30.24	1.82	6.02
L9	f	13.43	1.44	10.75	11.23	1.10	9.78
	m	13.18	1.41	10.71	11.67	1.99	17.05
L10	f	26.63	1.42	5.33	25.99	1.73	6.64
	m	23.26	2.63	11.31	26.29	1.77	6.73
L11	f	14.24	1.04	7.32	13.48	0.95	7.08
	m	13.38	1.72	12.85	14.06	0.93	6.64
L12	f	22.90	1.56	6.82	22.88	1.25	5.46
	m	20.59	2.18	10.58	22.84	1.38	6.02
L13	f	27.64	1.81	6.54	24.55	1.32	5.38
	m	24.05	2.53	10.51	24.72	2.35	9.52
L14	f	20.55	1.44	7.01	19.73	1.37	6.96
	m	17.69	1.83	10.36	19.78	1.59	8.06
L22	f	40.38	4.09	10.12	43.34	2.94	6.79
	m	35.59	3.14	8.83	35.36	2.48	7.01
L23	f	88.68	3.90	4.40	94.24	3.95	4.19
	m	86.66	2.96	3.42	85.11	3.96	4.65
L24	f	15.85	1.92	12.12	17.79	2.08	11.69
	m	15.24	2.80	18.37	16.75	1.20	7.16

### Coefficiente de variación

El coeficiente de variación (CV) es usado particularmente cuando se comparan muestras de la misma especie de diferentes localidades o cuando se trata de investigar la variación de distintas variables en la misma muestra (Rohlf, 1993). Al analizar los CV para la población de Cd del Carmen Campeche, (fig. 5) se observa que los rangos de variación están entre 5 y 15 %, los valores mas altos se encuentran en el largo del segmento abdominal 3 (L7) y largo del segmento 5 (L11) para las hembras de esta población.

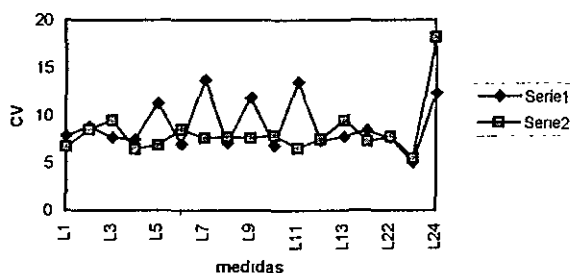


Figura 5. Gráfica de los coeficientes de variación (CV) para algunos caracteres morfométricos del camarón blanco *L. setiferus*, comparando hembras y machos de la población de Ciudad del Carmen Campeche.

Para la población de Veracruz se observa un rango de variación distinto a la población anterior (fig. 6), los valores se encuentran entre 6 y 18%, los valores más altos se encontraron para el largo del segmento abdominal 3 (L7), y el largo del segmento abdominal 4 (L9) para las hembras. En esta población se observaron valores del CV bajos para los largos del cefalotórax, del abdomen y del telson (L22, L23 y L24) en ambos sexos.

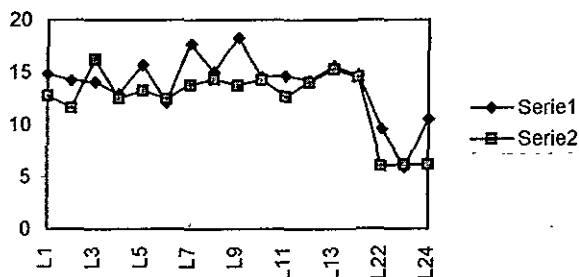


Figura 6. Gráfica de los coeficientes de variación (CV) para algunos caracteres morfométricos del camarón blanco *L. setiferus*, comparando hembras y machos de la población de Tuxpan, Veracruz.

Para *L. vannamei* en la población de Sonora (fig. 7) el rango de variación se obtuvo entre 5 y 19%, en esta población para todos los caracteres, los machos muestran valores mas altos del CV, con excepción del largo del segmento abdominal 4 (L9) donde el valor es igual en hembras que en machos.

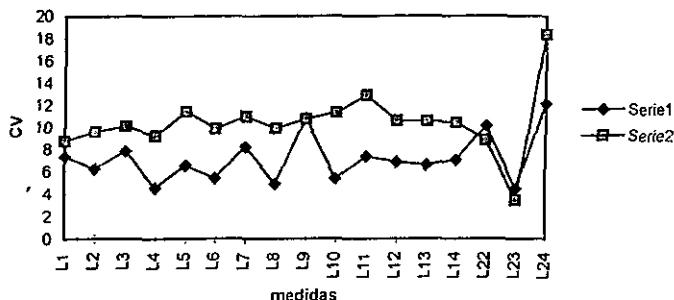


Figura 7. Gráfica de los coeficientes de variación (CV) para algunos caracteres morfométricos del camarón blanco *L. vannamei*, comparando hembras y machos de la población de Sonora.

Para la población de *L. vannamei* proveniente del Estado de Chiapas (fig. 8), los valores para el CV se encuentran entre 5 y 18%, el valor mas alto lo presenta el largo del segmento abdominal 4 (L9) por los machos, y el largo del rostrum (L24) es mayor en las hembras que en los machos.

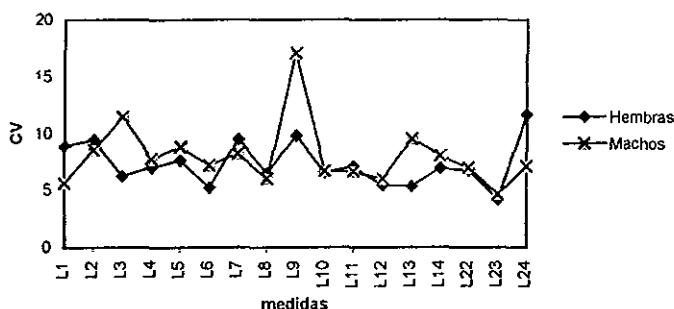


Figura 8. Gráfica de los coeficientes de variación (CV) para algunos caracteres morfométricos del camarón blanco *L. vannamei*, comparando hembras y machos de la población de Chiapas.



## Análisis de Varianza

Se analizaron ambas poblaciones *L. setiferus*, para explorar las diferencias entre sexos. Se encontró que existen diferencias significativas entre hembras y machos, que difieren en una y otra población es decir, mientras que en la población de Tuxpan, Veracruz los sexos se diferencian en los largos del cefalotórax y del abdomen (diferencia en talla), en la población de Ciudad del Carmen las diferencias se encuentran en los largos y anchos de los segmentos (diferencia en forma) tabla. 6. Cuando se compararon entre poblaciones los sexos, se observó que casi en la totalidad de los caracteres las hembras de ambas poblaciones son diferentes significativamente y en los machos se observó, que son diferentes en todos los caracteres.

**Tabla 6.** Tabla donde se resumen los resultados de los análisis de varianza en la especie *L. setiferus*. SV=comparación entre sexos en la población de Veracruz. SC= comparación entre sexos de la población de Cd. del Carmen, Campeche, H= comparación entre hembras de ambas poblaciones, M= comparación entre machos de ambas poblaciones, GL= 39 en ambas poblaciones,  $\alpha=0.05$ , \*= $p<0.05$ , \*\*= $p<0.01$ , \*\*\*= $0.001$

Medida	SV F	SC F	H F	M F
L1				
L2			39.77***	48.32***
L3		10.979**	11.19**	124.46***
L4			17.102**	34097***
L5				74.91***
L6			17.58**	40.906***
L7		10.11**	12.51*	58.41***
L8		11.78***		43.24***
L9		6.37*		56.951***
L10			16.24**	26.025***
L11		13.13***		82.095***
L12		14.63***	11.902*	86.542**
L13		14.98***		90.436***
L14		8.313**		38.88***
L21	8.028**			
L22	36.447***		8.102***	
L23	115.23***		148.79***	
L24				

También se realizaron comparaciones a distintos niveles, explorando las diferencias entre sexos dentro de cada población de *L. vannamei* y entre ellas. Al analizar los sexos de la población del Estado de Sonora, se encontró diferencias en el largo y ancho del cefalotórax y de los segmentos, en las costas de Chiapas la diferencia se encuentra en los largos del cefalotórax y del abdomen (tabla 7). Cuando se comparan las hembras de ambas poblaciones se encuentran diferencias significativas en el largo y ancho de los segmentos y del abdomen, como es el caso de los machos de ambas poblaciones.

**Tabla 7.** Tabla donde se resumen los resultados de los análisis de varianza en la especie *L. vannamei*. SS=comparación entre sexos en la población de Sonora, SC= comparación entre sexos de la población de la costa de Chiapas, H= comparación entre hembras de ambas poblaciones, M= comparación entre machos de ambas poblaciones, GL= 39 en la poblaciones de Sonora y GL=29 en la población de Chiapas,  $\alpha=0.05$ , \*= $p<0.05$ , \*\*= $p<0.01$ , \*\*\*=0.001

Medida	SS F	SC F	H F	M F
L1	58.08***			12.382**
L2	43.77***			
L3			8.73**	16.752***
L4	48.51***		10.545**	41.535***
L5	14.84***			15.65***
L6	22.66***		10.019**	40.562***
L7	10.86**			8.216*
L8	23.71***			30.299***
L9				
L10	25.38**		10.471**	32.196**
L11				10.252*
L12	14.74**		15.467***	29.025***
L13				
L14	30.05***			27.28***
L21				
L22		79.98***	27.412***	
L23		52.29***	99.96***	11.79**
L24				

### Análisis de la variación entre especies

Para el análisis de componentes principales la matriz de datos de entrada para ambas especies estuvo constituida por el número total de individuos (140) y por los caracteres (L1 a L14, L21, L22 y L23) (tabla 8), se encontró que los dos primeros componentes explican el 87.57 % de la variación. Asociados al primer componente se encuentran el largo y ancho del cefalotórax (L1 y

L2) y los largos y anchos de los segmentos abdominales del 1 al 5 (L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, y L12) y el largo del segmento 6 (L13) (tabla 9).

**Tabla 8.** Tabla que muestra los resultados del análisis de componentes principales para los datos de *L. setiferus* y *L. vannamei*.

Número de componente	Porcentaje de variación	Porcentaje acumulado
1	78.51	78.51
2	9.05	87.57

**Tabla 9.** Tabla donde se muestra la relación de las variables asociadas a los dos principales componentes del análisis para datos de *L. setiferus* y *L. vannamei*.

Medida	Componente 1	Componente 2
L1	0.904	0.017
L2	0.928	-0.044
L3	0.848	0.328
L4	0.969	0.077
L5	0.907	-0.056
L6	0.960	0.090
L7	0.905	-0.014
L8	0.980	0.063
L9	0.757	0.153
L10	0.965	0.120
L11	0.901	0.123
L12	0.953	0.162
L13	0.957	-0.064
L14	0.955	0.046
L21	0.529	-0.812
L23	0.609	-0.757

Del análisis de componentes principales para ambas poblaciones (fig. 9) se obtuvieron dos nubes de datos, cada una perteneciente a una especie, las agrupaciones de datos muestran por la forma un gradiente de variación, en los caracteres. En la figura 10, se observan estos agrupamientos de puntos etiquetados para cada una de las cuatro poblaciones de las dos especies analizadas, se observó que en cada especie existe un par de nubes con una zona de traslape de cada población.

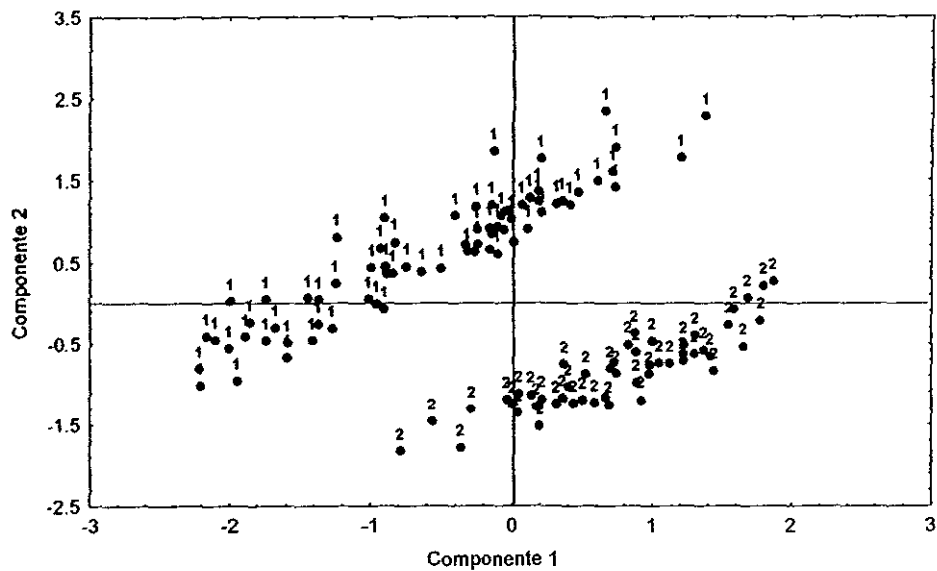


Figura 9. Gráfica donde se muestran los dos primeros componentes principales para el análisis de dos especies de camarón blanco, 1=*L. setiferus* y 2=*L. vannamei*

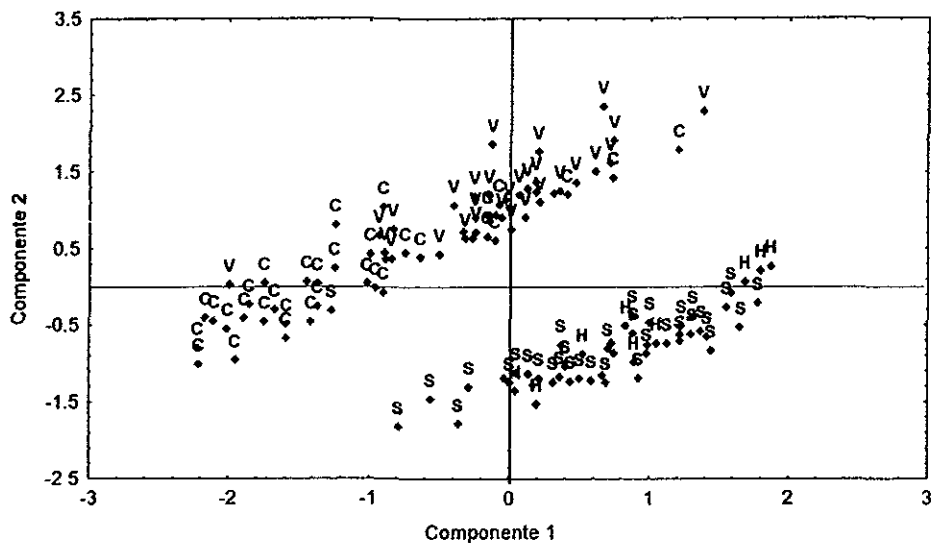


Figura 10. Gráfica donde se muestran los dos primeros componentes principales para el análisis de cuatro poblaciones de dos especies de camarón blanco, *L. setiferus* y *L. vannamei*. V=Veracruz. C=Campeche, S=Sonora y H=Chiapas.

#### Análisis de la variación entre sexos dentro de las poblaciones.

Para el análisis de componentes principales de la población de Veracruz de *L. setiferus*, donde se analizaron ambos sexos y para los siguientes análisis la matriz de datos de entrada estuvo constituida con los mismos caracteres que el anterior, el número de organismos en cada tratamiento es el total de los colectados para cada población.

Se encontró que los dos primeros componentes explican el 76.23% de la variación (tabla, 10). Asociados al primer componente se encuentran el largo y ancho del cefalotórax (L1 y L2), y los largos y anchos de los seis segmentos abdominales (L3 a L14) (tabla, 11).

**Tabla 10.** Tabla que muestra los resultados del análisis de componentes principales para *L. setiferus* de la población de Veracruz.

Número de componente	Porcentaje de variación	Porcentaje acumulado
1	68.52	68.52
2	7.07	76.23

**Tabla 11.** Tabla donde se muestra la relación de las variables asociadas a los dos principales componentes del análisis para datos de la población de Veracruz de *L. setiferus*.

Medida	Componente 1	Componente 2
L1	0.83165688	0.0183676
L2	0.85149281	0.19614128
L3	0.90790887	-0.00322008
L4	0.94473747	-0.06852785
L5	0.75153943	-0.11525844
L6	0.93843274	0.02076793
L7	0.82358554	-0.12738983
L8	0.96715413	0.00175206
L9	0.72146593	0.02583976
L10	0.95616534	0.07381611
L11	0.83075267	-0.06927117
L12	0.93263737	0.10195545
L13	0.8919618	0.14664715
L14	0.91426565	0.04209971
L21	0.00721829	-0.858955
L23	-0.38131369	0.61400144

Al graficar los dos primeros componentes principales para esta población se observaron dos nubes de datos con una zona de traslape (fig. 11).

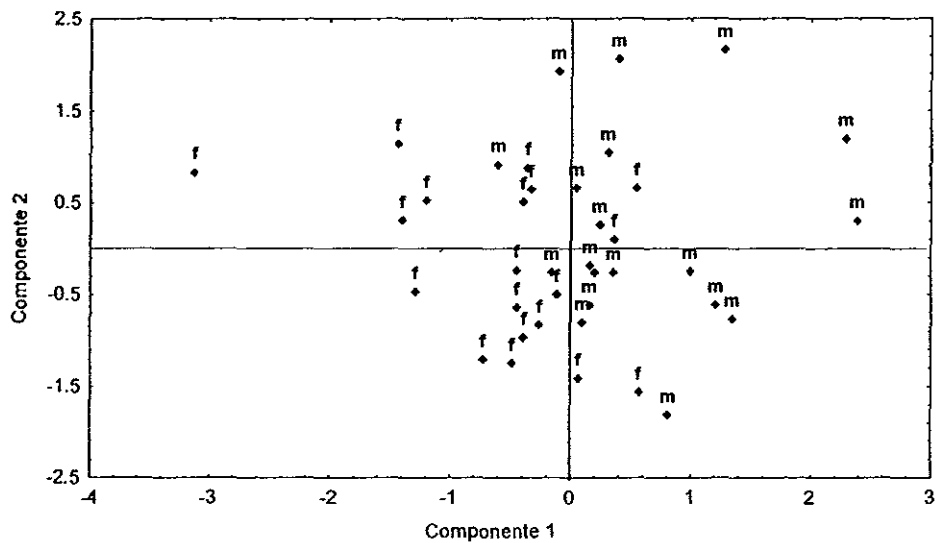


Figura 11. Gráfica de los dos primeros componentes principales y la nube de datos que se generan para la matriz de datos de *L. setiferus* Para la población Veracruzana, f=Hembras y m=Machos.

En la matriz de correlación para esta población, se encuentran diferencias en magnitudes y signos, como en el caso del análisis de los datos por especie, se encontró el ancho de los segmentos 4 y 5 con uno de los valores mas altos de correlación, encontrandose también, el ancho de los segmentos 1 y 3, y 2 y 3.

Tabla 12. Matriz de correlaciones de los datos filtrados y desagregados de la población de *Tuxpan Veracruz*, de *L. setiferus*.

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	
L1	1.0000																			
L2	-0.719	1.0000																		
L3	-0.811	0.9732	1.0000																	
L4	0.454	0.181	0.259	1.0000																
L5	0.648	0.378	0.581	0.6489	1.0000															
L6	0.574	-0.072	0.093	0.8920	0.5106	1.0000														
L7	0.497	-0.614	0.156	0.623	0.4912	0.7198	1.0000													
L8	0.5118	0.8866	0.197	0.8138	0.3965	0.8581	0.7381	1.0000												
L9	0.7791	0.8733	0.171	0.6248	0.5782	0.6216	0.5459	0.6187	1.0000											
L10	0.3494	0.3269	0.3964	0.8362	0.6357	0.8165	0.6753	0.8161	0.6363	1.0000										
L11	0.3147	-0.0966	0.0252	0.6764	0.4464	0.6762	0.6782	0.7051	0.6069	0.4810	1.0000									
L12	0.1881	0.3122	0.2239	0.7868	0.7126	0.7651	0.5884	0.8026	0.3215	0.9161	0.5619	1.0000								
L13	0.7898	-0.4461	-0.2282	0.6787	0.3380	0.7478	0.5771	0.3124	0.3394	0.6378	0.5367	0.5314	1.0000							
L14	0.2987	0.4831	0.5811	0.7589	0.6687	0.6752	0.6003	0.5111	0.1845	0.9048	0.5394	0.8076	0.4006	1.0000						
L15	0.3686	0.9920	0.8920	0.0923	0.1388	-0.0182	-0.0431	-0.0397	-0.0316	-0.0507	0.0241	-0.0301	-0.2790	0.0391	1.0000					
L16	0.7882	-0.9284	-0.9093	-0.2676	-0.3376	0.3112	-0.0286	-0.0336	-0.0069	-0.1658	0.1277	-0.3081	0.2242	-0.3385	-0.1725	1.0000				
L17	0.7816	-0.9781	-0.9257	-0.0396	-0.2926	0.3043	0.1222	-0.0189	0.0275	-0.1892	0.2017	-0.2571	0.4566	-0.3785	-0.0173	0.8610	1.0000			
L18	-0.5672	0.7911	0.7672	0.6147	0.3378	-0.1372	0.0080	-0.0527	0.0901	0.1993	-0.0648	0.3216	-0.7316	0.4337	0.2492	-0.7056	-0.8096	1.0000		



En el análisis de componentes principales para el conjunto de datos de la población de Campeche los dos primeros componentes explican el 84.32% de la varianza (tabla, 13). Asociados al primer componente se encontraron el largo y ancho del cefalotórax (L1 y L2) y los largos y anchos de los seis segmentos abdominales (L3 a L14) (tabla, 14).

En la matriz de correlación (tabla, 15) se observaron diferencias en las magnitudes y los signos, las mayores correlaciones se encuentran en el ancho de los segmentos 1 y 2 y 1 y 3, en los anchos de los segmentos 2 y 4, y del 6 y 4.

**Tabla 13.** Tabla que muestra los resultados del análisis de componentes principales para los datos de *L. setiferus*. población de Ciudad del Carmen, Campeche

Número de componente	Porcentaje de variación	Porcentaje acumulado
1	75.71	75.71
2	8.61	84.32

**Tabla 14.** Matriz donde se muestra la relación de las variables asociadas a los dos principales componentes del análisis para datos de la población de Campeche para *L. setiferus*.

Medida	Componente 1	Componente 2
L1	0.89	-0.04
L2	0.89	0.24
L3	0.92	-0.04
L4	0.96	0.11
L5	0.91	-0.06
L6	0.97	-0.04
L7	0.88	-0.12
L8	0.98	-0.08
L9	0.86	-0.15
L10	0.97	0.01
L11	0.91	0.03
L12	0.96	0.09
L13	0.96	-0.06
L14	0.95	0.00
L21	-0.04	-0.82
L23	0.09	0.76

Tabla 15. Matriz de correlaciones de los datos de la población de Cd. del Carmen, Campeche de *L. setiferus*.

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	
L1	1.0000																				
L2	0.3836	1.0000																			
L3	0.2027	0.9552	1.0000																		
L4	0.1768	0.0649	0.2453	1.0000																	
L5	0.5916	0.3382	0.4703	0.8466	1.0000																
L6	0.7431	0.1621	0.3580	0.9394	0.8590	1.0000															
L7	0.6192	0.1784	0.3463	0.8295	0.7665	0.8301	1.0000														
L8	0.7392	0.1672	0.3687	0.9132	0.8608	0.9561	0.8807	1.0000													
L9	0.6775	0.1053	0.2883	0.8109	0.7785	0.7987	0.7878	0.8132	1.0000												
L10	0.6533	0.2903	0.4872	0.8816	0.8345	0.9186	0.8252	0.9462	0.7915	1.0000											
L11	0.7351	-0.0782	0.0751	0.8545	0.7462	0.8774	0.7331	0.8411	0.7260	0.7596	1.0000										
L12	0.6394	0.2591	0.4457	0.9119	0.8527	0.9270	0.8415	0.9328	0.7892	0.9247	0.8200	1.0000									
L13	0.8667	-0.2785	-0.0659	0.8693	0.6938	0.8314	0.7616	0.8557	0.7610	0.7757	0.8679	0.7969	1.0000								
L14	0.6163	0.3313	0.5233	0.8160	0.8445	0.8841	0.7844	0.9027	0.8018	0.8901	0.7470	0.9233	0.7275	1.0000							
L15	0.1629	0.0452	0.0243	0.0491	0.0863	0.1766	0.0907	0.1174	0.2269	0.0905	0.0950	0.0223	0.1226	0.1351	1.0000						
L16	0.1934	-0.3474	-0.7933	0.1493	-0.1808	-0.0150	-0.0482	-0.0221	0.0543	-0.1051	0.2489	-0.0377	0.1792	-0.1091	0.0251	1.0000					
L17	0.4970	0.9647	-0.8976	0.0730	0.1790	0.0015	-0.0192	-0.0023	0.0369	0.1493	0.2199	-0.1223	0.4150	-0.1963	0.0941	0.1671	1.0000				
L18	-0.2467	0.9402	0.9014	-0.0461	0.2083	0.0760	0.0538	0.0915	0.0123	0.1999	-0.1717	0.1814	-0.3438	0.7609	0.0461	0.8283	0.9302	1.0000			

Al graficar los datos para este análisis se obtuvo una nube donde no es clara la división entre cada uno de los sexos (fig. 12).

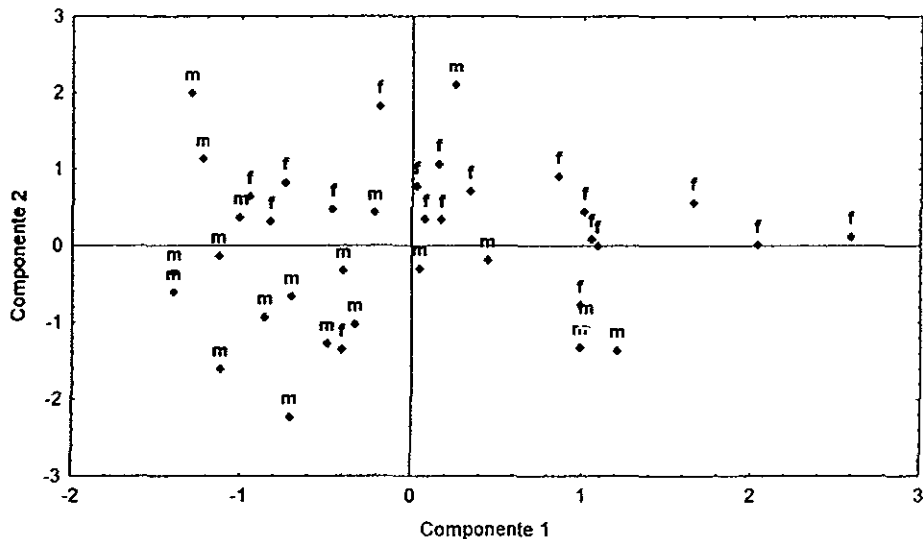


Figura 12. Gráfica donde se muestran los dos primeros componentes principales para el análisis entre sexos de la población de Cd. del Carmen Campeche, de *L. setiferus*, f=Hembras, m=Machos

En el análisis de los datos de *L. vannamei* por población se encontró para la población de Sonora que los dos primeros componentes principales explican el 78.58% de la variación (tabla 16). Asociados al primer componente se encuentran el largo y ancho del cefalotórax (L1 y L2) y los largos y anchos de los segmentos abdominales (L3 a L14) (tabla 17).

En la matriz de correlaciones se encuentran diferencias en magnitud y de signo como en los casos anteriormente descritos, en esta población los valores mas altos se encuentran en ancho del cefalotórax y el segmento 1, el ancho de los segmentos 3 y 4, y el ancho del segmento 3 con el largo del segmento 6 (tabla, 18).

En la gráfica de los dos primeros componentes para esta población se observan dos nubes de datos con una zona donde se traslapan ambas nubes para los sexos (fig. 13).

**Tabla 16.** Tabla que muestra los resultados del análisis de componentes principales para los datos de la población de Sonora de *L. vannamei*.

Número de componente	Porcentaje de variación	Porcentaje acumulado
1	68.95	68.95
2	9.63	78.58

**Tabla 17.** Tabla donde se muestra la relación de las variables asociadas a los dos principales componentes del análisis para datos de la población de Sonora de *L. vannamei*.

Medida	Componente 1	Componente 2
L1	0.89	-0.05
L2	0.90	0.03
L3	0.70	0.16
L4	0.95	0.04
L5	0.89	-0.01
L6	0.90	0.26
L7	0.83	-0.08
L8	0.93	0.25
L9	0.59	0.10
L10	0.94	0.04
L11	0.83	0.15
L12	0.93	-0.02
L13	0.91	0.01
L14	0.94	-0.05
L21	0.50	-0.79
L23	-0.35	0.85

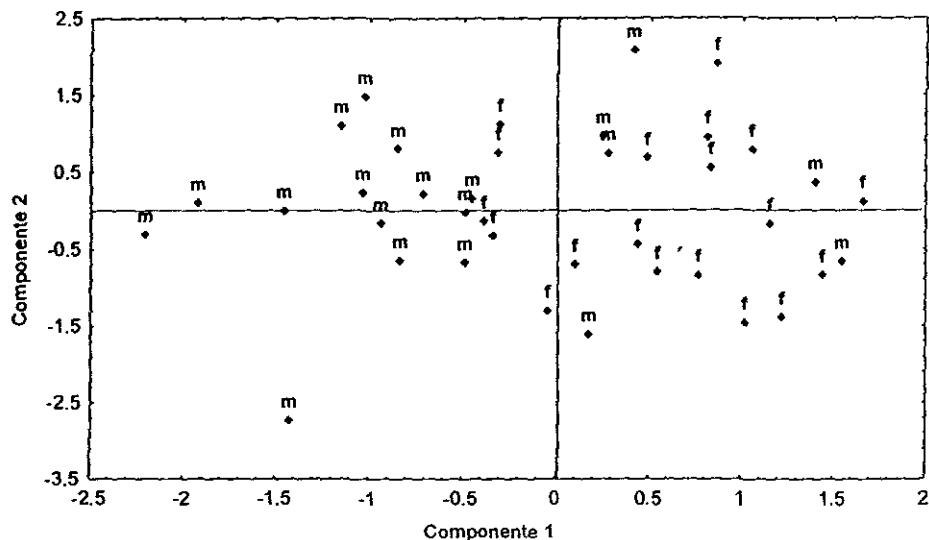


Figura 13. Gráfica donde se muestran los dos primeros componentes principales del análisis entre sexos para la población de Sonora, de *L. vannamei*, f=Hembras, m=Machos.

Tabla 18. Matriz de correlaciones de los datos de la población de Sonora de *L. vannamei*.

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L22	L23	L24
L1	1.0000																
L2	-0.1981	1.0000															
L3	-0.1597	0.9626	1.0000														
L4	0.6187	0.2120	0.2180	1.0000													
L5	0.4189	0.3651	0.3389	0.8021	1.0000												
L6	0.7213	-0.0637	-0.0183	0.3256	0.7030	1.0000											
L7	0.5569	-0.0720	0.0198	0.7010	0.6550	0.7074	1.0000										
L8	0.6325	0.0876	0.1402	0.8773	0.7324	0.9082	0.7196	1.0000									
L9	0.2601	0.0893	0.1244	0.4714	0.4627	0.5071	0.4604	0.5371	1.0000								
L10	0.4939	0.2856	0.1179	0.8710	0.7941	0.7783	0.7209	0.9038	0.4973	1.0000							
L11	0.6131	-0.0988	-0.0163	0.7101	0.6196	0.8030	0.7516	0.7954	0.4352	0.3058	1.0000						
L12	0.4747	0.1946	0.3383	0.8828	0.7900	0.7572	0.7407	0.8419	0.5301	0.8826	0.6974	1.0000					
L13	0.8948	-0.5360	-0.4017	0.6410	0.4283	0.7434	0.6199	0.6730	0.3728	0.5267	0.6608	0.4278	1.0000				
L14	0.7003	0.0730	0.1033	0.9073	0.7847	0.8419	0.7732	0.8367	0.4344	0.8482	0.7327	0.8387	0.7054	1.0000			
L22	0.7495	-0.7131	-0.7025	0.2209	0.0680	0.3107	0.3889	0.2078	0.1160	0.1459	0.3686	0.1616	0.7583	0.1624	1.0000		
L23	0.6391	-0.8766	-0.8656	-0.0606	-0.2376	0.2025	0.1133	0.0683	-0.0189	-0.1512	0.2099	-0.1701	0.6685	0.0447	0.7081	1.0000	
L24	-0.5782	0.8613	0.8083	-0.0591	0.0748	-0.3095	-0.2860	-0.2139	-0.1367	-0.0186	-0.3694	-0.0268	-0.6876	0.2015	0.7119	-0.8019	1.0000

En el análisis de componentes principales para la población de Chiapas, se encontró que los dos primeros componentes explican el 76.49% de la variación (tabla 19). Asociados al primer componente se encontraron el ancho del cefalotórax (L2), el largo y ancho del primer segmento abdominal (L3 y L4), el ancho del segmento 2 (L6), el largo y ancho del segmento 3 (L7 y L8), los anchos de los segmento 4, 5 y 6 y el largo del quinto y sexto (L10 a L14) (tabla 20).

En la matriz de correlación de esta población se encuentran diferencias en signos y magnitudes, la mayor correlación se encontró entre el largo 1 del cefalotórax y del segmento 6, el ancho del segmento 1 y del abdomen, y en el ancho de los segmentos 1 y 2 (tabla 21).

**Tabla 19.** Tabla que muestra los resultados del análisis de componentes principales en la población de la costa de Chiapas, de *L. vannamei*.

Número de componente	Porcentaje de variación	Porcentaje acumulado
1	63.82	63.82
2	12.67	76.49

**Tabla 20.** Tabla donde se muestra la relación de las variables asociadas a los dos principales componentes del análisis para datos de la población de la costa de Chiapas de *L. vannamei*.

Medida	Componente 1	Componente 2
L1	0.54	-0.55
L2	0.92	-0.07
L3	0.89	-0.06
L4	0.98	0.09
L5	0.61	0.49
L6	0.95	0.09
L7	0.78	0.20
L8	0.96	0.11
L9	0.56	-0.65
L10	0.94	0.17
L11	0.78	0.13
L12	0.92	0.20
L13	0.82	-0.26
L14	0.81	-0.01
L21	0.11	-0.90
L23	-0.70	0.11

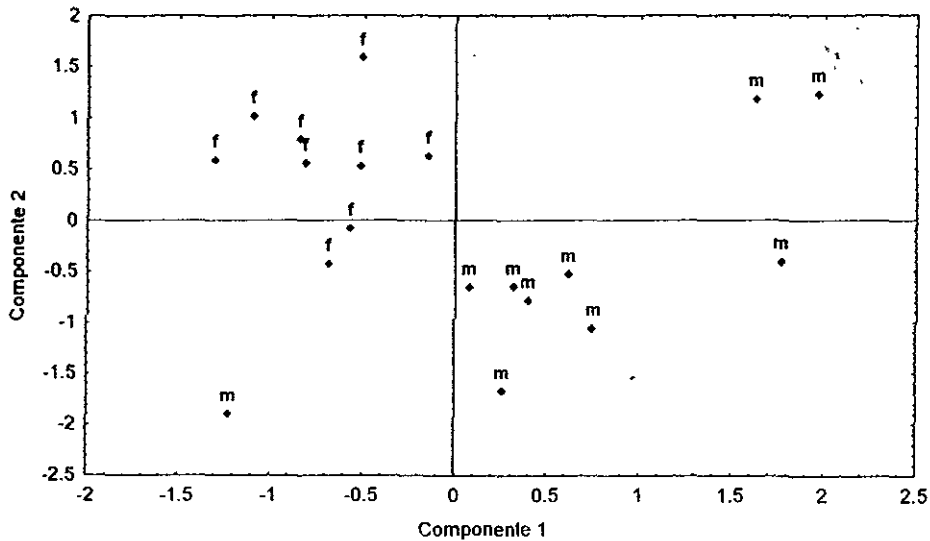


Figura 14. Gráfica donde se muestran los dos primeros componentes principales para el análisis entre sexos de la población de Chiapas, de *L. vannaei*. f=Hembras. m=machos

Tabla 21. Matriz de correlaciones de los datos filtrados y desagregados de la población de la costa de Chiapas, de *L. vannaei*.

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L22	L23	L24
L1	1.0000																
L2	-0.6603	1.0000															
L3	0.8197	0.9263	1.0000														
L4	0.5271	-0.1741	-0.0816	1.0000													
L5	-0.2487	0.6197	0.5909	0.2039	1.0000												
L6	0.5743	-0.2550	-0.1660	0.9376	0.0010	1.0000											
L7	0.3243	-0.2581	-0.1863	0.8121	0.1824	0.7138	1.0000										
L8	0.2615	0.1356	0.2036	0.8976	0.3269	0.8580	0.6455	1.0000									
L9	0.0205	0.3179	0.4068	0.6851	0.3199	0.6567	0.4310	0.7257	1.0000								
L10	-0.0471	0.4843	0.5143	0.7039	0.5461	0.6057	0.5197	0.8648	0.6988	1.0000							
L11	0.5330	-0.2354	0.2090	0.6245	0.1014	0.6733	0.5307	0.6207	0.3141	0.5551	1.0000						
L12	-0.1150	0.5000	0.5639	0.6410	0.5023	0.5283	0.5128	0.7810	0.6100	0.8509	0.3652	1.0000					
L13	0.9018	-0.7803	-0.7258	0.6630	-0.3594	0.7182	0.6005	0.3991	0.1883	0.0513	0.6154	0.0102	1.0000				
L14	-0.1844	0.4484	0.5343	0.5005	0.3900	0.4890	0.3746	0.6186	0.7459	0.6216	0.2199	0.6432	-0.0197	1.0000			
L22	0.9093	-0.3653	0.8368	0.2734	-0.5641	0.3702	0.2368	0.0176	-0.0968	-0.2942	0.3171	-0.3565	0.7994	-0.3348	1.0000		
L23	0.8318	-0.9550	-0.9435	0.2473	0.5713	0.3106	0.3400	-0.0604	-0.2852	-0.3801	0.3053	-0.4265	0.8122	-0.4364	0.8219	1.0000	
L24	-0.8573	0.9609	0.9608	0.1723	0.5560	-0.2582	-0.2397	0.0787	0.2884	0.3928	-0.3049	0.4893	-0.7608	0.4749	-0.8736	-0.9218	1.0000

## IV Discusión

En la fase de calibración del equipo utilizado para el análisis morfométrico, se encontró un error de medición de alrededor de  $1.7 \times 10^{-5}\%$ , para cada carácter, lo cual constata que, si el diseño de captura es constante, el programa utilizado en este trabajo es de alta precisión, convirtiéndolo en una opción técnica altamente confiable. Estructuras como el rostrum y el telson que experimentan cambios durante el proceso de conservación de los individuos o bien que se pierden durante la captura, no son recomendables. Por otro lado, para este modelo los pleópodos presentan el problema de no fijarse en la misma posición cada vez, lo cual produce un error de medición mayor que el encontrado para otras medidas. Si se analiza que en las investigaciones en las que se utiliza como método de medición un vernier, el cual puede aportar hasta un 10% de error dependiendo del material y hasta un 15% dependiendo del muestreador, se recomienda la utilización del equipo y programa empleado para este trabajo, ya que además de reducir el porcentaje de error de medición con respecto a las técnicas tradicionales, facilita la adquisición y almacenamiento de datos a partir de las imágenes, que en sí forman un banco de información para estudios en el futuro. Aunque para Lester y Pante, (1992) aparte de algunos cambios en la forma del rostrum y del tercer segmento abdominal no existe segregación morfométrica en poblaciones de la familia Penaeidae, explicando que las variaciones morfológicas son afectadas por los diferentes ambientes los cuales forman amplios gradientes, en este trabajo los análisis estadísticos utilizados mostraron diferencias entre estos organismos a diferentes niveles.

En cuanto a los resultados para los coeficientes de variación, para *L. setiferus* en la población de Cd. del Carmen, los rangos de variación se encuentran entre 5 y 15% los valores más altos los presentan las hembras para los largos de los segmentos abdominales 3, 4 y 5. Para la población de Veracruz los valores se encuentran entre 6 y 18%, los valores más altos de variación se encontraron en los largos de los segmentos abdominales 3 y 4, perteneciendo a las hembras los valores más altos. En cuanto al análisis de varianza, se encontraron diferencias significativas entre sexos para la población de Cd. del Carmen en los largos y anchos de los segmentos abdominales, en la población de Veracruz las diferencias se encontraron en los largos del cefalotórax y del abdomen. Entre ambas poblaciones se

observó que en el caso de los machos existen diferencias significativas para todos los caracteres mientras que para las hembras la variación está en el largo y ancho de los segmentos abdominales. Al estudiar el conjunto de datos de las dos especies con un análisis de componentes principales se obtuvieron dos nubes de datos y se encontró que el ancho del primer segmento abdominal y el ancho del tercero son medidas que influyen en la separación de estas dos poblaciones, también se observa que existe un gradiente de variación dentro de las especies, posterior a este análisis se realizó uno para cada población para obtener información entre sexos. Para el caso de la población Veracruzana los dos primeros componentes explican un 76% de la variación y el ancho del segmento 3 (L8) influye en la separación de las dos nubes, para la población de Campeche el valor es de 84.32%, en ambos casos las medidas que están asociadas al primer componente son el largo y ancho del cefalotórax (L1 y L2) y los largos y anchos de los segmentos abdominales (L3 a L14), en ambas poblaciones la gráfica de nube de puntos para los sexos muestra dos nubes con una zona de traslape, entre ellas siendo el ancho del tercer segmento abdominal que influye en la separación de las nubes de datos.

Para *L. vannamei* se observó que los rangos del coeficiente de variación para las dos poblaciones de esta especie varían entre 5 y 19%, para esta especie el mayor valor lo presentan los machos en el largo del segmento abdominal 4. En cuanto a los resultados de los análisis de varianza, se observó dimorfismo sexual, al encontrar diferencias significativas entre ambos sexos. Ya se ha reportado dimorfismo sexual en esta especie (Chow y Sandifer, 1991), citado por Primavera et al., 1998. Resultados similares han sido obtenidos en trabajos para especies como *F. aztecus*, *L. indicus*, y *L. longistylus* (Primavera, et al., 1998). Los resultados del análisis de componentes principales para esta especie, son distintos en ambas poblaciones, para la población de Sonora los dos primeros componentes explican un 78% de la variación y los anchos de los segmentos abdominales 4, 5 y 6 diferencian a los sexos. La población proveniente de Chiapas, en donde los dos primeros componentes explican el 76% de la variación son los anchos del primer y tercer segmentos abdominales los caracteres que influyen en la separación de este grupo.



## SECCIÓN II

### MARCADORES MOLECULARES

#### I Antecedentes

Las investigaciones centradas en la herencia de caracteres como, colores de ojos en crustáceos en 1912 marcan el inicio del desarrollo de la genética en estos organismos, los estudios relacionados con el material genético datan de la década de los cincuenta, en estos se pretendía cuantificar de material genético nuclear en diferentes especies de cangrejos y otros grupos de crustáceos con el fin de conocer si las cantidades de ADN son distintas entre grupos taxonómicos, pero debido a que la talla del genoma no está relacionado con los grupos y además existe variación incluso entre especies muy relacionadas se han desarrollado técnicas más sofisticadas para obtener más información (Lawrence, 1982). Estas técnicas no solo han estado centradas en la búsqueda de información taxonómica y evolutiva pues los datos de diversidad genética pueden proveer información de alelos raros, decrecimiento en la heterocigosidad, incremento en los niveles de entrecruzamiento y junto con el establecimiento de marcadores genéticos, este conocimiento puede ayudar en la selección de animales, con propósitos de cría y puede ser un gran beneficio para domesticar a estos individuos. De esta manera el uso de los datos moleculares, permite a los científicos desarrollar programas para seleccionar crías dependiendo las necesidades del mercado. Algunas técnicas han sido desarrolladas y utilizadas para monitorear variación genética incluyendo, electroforesis en geles de almidón y acrilamida, polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD), de éstas, la variación enzimática es uno de lo menos sensitivo de los tres y está limitado a un número pequeño de loci polimórficos que pueden ser analizados la mayor variación genética ha sido detectada usando ADN mitocondrial (ADNmt), RFLPs nucleares y datos de secuencias de ADNmt (García et al., 1994). Quizá el uso más amplio del ADNmt como marcador ha sido para definir afinidades entre especies cercanas basándose en la comparación de los patrones de los fragmentos de restricción (Harrison, 1989). Como el ADNmt presenta variación tanto entre individuos como entre poblaciones, juega un papel importante como un efectivo marcador de la estructura de poblaciones y de los patrones de

variación geográfica, pues con relativa facilidad secuencias homólogas pueden ser aisladas y comparadas, tiene una secuencia simple, es de herencia materna y la ausencia de recombinación permite proveer información detallada acerca de relaciones filogenéticas en algunos niveles de la escala evolutiva, además puede ser una herramienta útil para detectar diferencias dentro de poblaciones y entre especies, por tener una alta tasa de cambio (Harrison, 1989; Silberman, 1994).

Otra de las técnicas que ha sido desarrollada y utilizada para monitorear variación genética son los polimorfismos en el largo de los fragmentos de restricción (RFLPs), que es una técnica en la cual no se requiere de radioactividad o equipamiento caro (Lessa y Applebaum, 1993), y más recientemente el uso de microsatélites ha surgido como una herramienta muy poderosa en la investigación de genética de poblaciones (Morán, 1997). Esto se debe a que todos los tipos de microsatélites muestran variación en el número de repeticiones y reflejan un nivel de polimorfismo generalmente mayor que el de una hebra de una secuencia única y tan alto como los minisatélites, por lo tanto los microsatélites constituyen un marcador nuclear poderoso, incrementándose su uso en pruebas de identidad, en estudios de poblaciones en análisis de linajes y mapeo genético (Estoup et al., 1993). Como para el caso particular de los crustáceos quedan todavía abiertas algunas interrogantes, es por esta razón que se ha implementado en el caso particular de los decápodos el estudio de los polimorfismos en las isoenzimas de la amilasa (Van Wormhoud y Sellos, 1996).

Aunado a estos esfuerzos en los últimos 10 años se han desarrollado sofisticadas técnicas moleculares altamente sensibles en la aplicación de la biotecnología para el cultivo de camarones, estas herramientas proveen las bases para tener información detallada del genoma de los camarones, para entender la resistencia a enfermedades, para desarrollar efectivos controles de reproducción y el desarrollo de líneas resistentes a enfermedades (Benzie, 1998).

### **Objetivo**

Mediante el uso de las técnicas de RFLPs y microsatélites explorar la variación molecular para tres genes de dos poblaciones del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y de dos poblaciones del camarón *L. setiferus*.

## II Metodología

### Colecta

En septiembre de 1998 se colectaron individuos de *L. setiferus*, originarios de la Laguna de Términos Ciudad del Carmen, Campeche, Laguna de Tuxpan en Veracruz y de *L. vannahamei* procedentes de Sonora y de la granja de SYSAL originarios de Panamá (Fig. 1), los cuales se mantuvieron vivos hasta el momento de la disección.

Se diseccionaron los pedúnculos oculares, que fueron transportados individualmente en hielo seco y posteriormente se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  en el laboratorio.



**Figura 1.** Mapa de la República Mexicana donde se muestran las zonas de colecta para este estudio. 1=Huatabampo, Sonora  $109^{\circ}01'20''$ , 2= Granja Sysal, 3= Tuxpan, Veracruz  $97^{\circ}08'57''$ , y 4= Cd. del Carmen Campeche  $91^{\circ}01'01''$ .

### Extracción de ADN

Se aisló el ADN de 13 camarones de cada población de las dos especies (52 totales) utilizando los pedúnculos oculares (durante la manipulación las muestras se mantuvieron en nitrógeno líquido). Se ensayaron dos métodos de extracción para averiguar en cual se obtenía la mejor calidad y cantidad de ADN, se utilizó un método comercial *Wizard Kit Genomic DNA purification* y otro protocolo que utiliza un tampón con una mezcla de Bromidío de alquil trimetil amonio, CTAB (apéndice 1).

### Cuantificación del ADN

Dado que el ADN en forma de doble hélice tiene una absorbancia máxima de 260 nm en una concentración 1 mg/ml 20 unidades, y que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de soluto absorbente, utilizando una solución 1/100 de extracto de ADN (solución madre) se observó la curva de absorción de cada muestra en un espectrofotómetro y posteriormente se calculó la concentración de material genético, así como la existencia o no de contaminantes, que se evidencian en la forma de la curva de absorción.

### Amplificación del ADN

Se utilizó el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Método *in vitro* de síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN, en el cual usando dos oligonucleótidos (oligos), en una serie repetitiva de ciclos que incluyen desnaturalización, unión de los oligos a su secuencia suplementaria, y la extensión a partir de estos en el resto de la hebra por medio de la DNA polimerasa, que da como resultado una acumulación exponencial del fragmento específico de interés (Erlich, 1989).

Los fragmentos de ADN en los que esta centrado este trabajo corresponden a dos familias de genes nucleares, 16S y Citocromo Oxidasa I (COI) y el gen Amilasa S-R.

Se analizaron cada uno de los individuos, se utilizó la información de *L. vannamei* como base y se utilizaron los mismos protocolos y oligos para trabajar con *L. setiferus*.

Utilizando el ADN en una concentración de 0.1 µg/µl se realizaron una serie de pruebas preliminares para encontrar la temperatura ideal en la amplificación de la secuencia de interés. Los oligos utilizados fueron sintetizados una vez que se conocieron las secuencias.

### COI

Para obtener la secuencia de la COI se consultó la base de datos European Bioinformatics Institute-European Molecular Biology Laboratory (EBI-EMBL) y se utilizó la secuencia X 82 503 de CO I, para *L. vannamei*.

### **Amilasa S-R**

Para la secuencia del gen de la amilasa S-R se utilizó en el trabajo de Van Wormhoudt y Sellos 1996.

### **16 S**

El gen 16S fue clonado y secuenciado en el laboratorio. Después de cada amplificación el producto de la PCR es precipitado con AcNa 5M, pH 8. Se realizó una electroforésis control para identificar y verificar la talla conocida de los fragmentos obtenidos en geles de agarosa 1.2%, que tiene un rango de separación de moléculas lineares de ADN de 6 - 0.4 kb (Maniatis, 1982). Las bandas de ADN se observaron directamente del gel utilizando fluorescencia (Bromuro de etidio) en una lámpara de luz ultravioleta y, en caso de tener resultados, se registraron fotográficamente, con una cámara polaroid MP4. El marcador utilizado fue del fago Lambda digerido por la enzima de restricción Pst I (apéndice 2). Los fragmentos son extraídos del gel con un equipo comercial *Qquick* de *Quiagen*.

### **Secuenciación**

A partir de extractos de *L. vannamei* se secuenció en el laboratorio el gen 16S, clonando, recuperando el ADN y leyendo en geles horizontales. Para la clonación se utilizó el método *pGEM-T Easy Vector Systems* de Promega. La recuperación del ADN plasmídico se realizó utilizando S1ET (Sucrose-Triton-EDTA-TRIS-HCL). Para la secuenciación se utilizó el método de Amersham (T7 Sequenase Version 2.0) método que permite determinar mediante el marcaje radioactivo la secuencia del fragmento contenido en el plásmido (apéndice 3)

### **Análisis con enzimas de restricción**

#### **RFLPs**

Para la elección de las enzimas, se obtuvo la carta de restricción para cada una de las secuencias utilizando el programa Strider 1.0. Se elaboró el mapa de restricción con las distancias teóricas para cada una de las enzimas. El cual sirve como referencia para saber si los fragmentos obtenidos corresponden a lo que se espera, o bien si existe alguna contaminación. Se sometió con tres enzimas: Alu I, Rsa I y Taq I, a una digestión durante dos horas, en un volumen final de 15 µl de muestra, a cada uno de los fragmentos, Co I, Amilasa y 16S. Este tratamiento se aplicó a cada uno de los 52 individuos (ver la siguiente tabla).

**Tabla 1.** Enzimas utilizadas para analizar diferencias entre poblaciones de dos especies de camarón blanco, *L. setiferus* y *L. vannamei*.

Especie	<i>L. setiferus</i>	<i>L. vannamei</i>	CO I	Amilasa	I6 S
Población	Veracruz	Sonora	Alu I Rsa I Taq I	Alu I Rsa I Taq I	Alu I Rsa I Taq I
	Campeche	Panamá	Alu I Rsa I Taq I	Alu I Rsa I Taq I	Alu I Rsa I Taq I

Las digestiones fueron detenidas adicionando 5 µl de colorante.

Los productos de cada digestión se corrieron en un gel de agarosa 2% durante dos horas a 100v (anexo 4). De igual manera que en las amplificaciones las bandas de ADN se observaron directamente del gel utilizando fluorescencia (Bromuro de etidio) en una lampara de luz ultravioleta, los geles se registraron fotográficamente. En cada gel se comparaban las distintas poblaciones de cada especie para observar si existen diferencias entre los fragmentos resultantes de cada digestión.

### Microsatélites

Hemos elegido el gen 28 de la amilasa S-R, que corresponde al segmento de 650pb analizado con enzimas de restricción, en este gen existe una zona de microsatélites en un intrón. Se utilizaron los oligonucleótidos PV17, y PV20R, los detalles de la técnica se encuentran en el apéndice 5.

### Presentación de los resultados

Los resultados están organizados en dos partes, una primera sección donde se muestran los productos de la PCR y de las digestiones con las diferentes enzimas, mostrando como referencia el esquema teórico con base en las secuencias (carta de restricción) y mostrando el registro fotográfico siempre comparando entre las dos especies. Y una segunda sección donde se caracterizan las poblaciones, es decir durante toda la fase experimental se conservó la individualización de las muestras, de esta manera puede hacerse un seguimiento individual para todos los tratamientos en cada camarón, y analizar el tipo de patrones de bandas que se obtienen para las poblaciones. Se analizó cada enzima comparando la carta de restricción y el patrón de bandas en el gel, se ha nombrado arbitrariamente con letras los distintos tipos de esquemas.

En el caso de los resultados de los microsatélites igualmente hemos nombrado con letras de la a a la f a los alelos de menor a mayor talla.

### III Resultados

#### Extracción y Cuantificación

Al analizar las curvas de absorción de los extractos de ADN de la prueba preliminar utilizando dos métodos distintos, se observó que el ADN aislado a partir del equipo comercial registró rastros de contaminación con fenol, fue necesario hacer al menos cuatro lavados con cloroformo y luego éter para limpiar el fenol y obtener un ADN libre de contaminación. Para el caso del segundo método se obtienen curvas sin rastro de contaminación, por este motivo se eligió este protocolo para aislar las muestras de ADN del resto de los camarones. Los extractos fueron numerados para mantener la individualización y poder llevar un seguimiento durante el trabajo.

En general la ventaja de utilizar un paquete comercial es que el trabajo es más práctico y ahorra tiempo lo que justifica su precio, en este caso el *kit* no resultó un método adecuado pues al final es necesario hacer lavados, lo cual implica tiempo y exposición a sustancias tóxicas, además un pequeño rastro de ellas puede inhibir la PCR.

Las concentraciones de ADN aislado varían en cada individuo, sin embargo son siempre mayores que  $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  por lo que de estas soluciones madre se hizo una dilución y se trabajó siempre a una concentración de  $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

La razón de esta variación de concentraciones se debe a que no siempre se utiliza exactamente la misma cantidad de tejido, ya se ha especificado que el extracto se hace a partir de los pedúnculos oculares, siempre se utilizó un solo pedúnculo ocular, entre cada animal hay variación en el tamaño de éstos, y además es necesario eliminar las omatidias, con una navaja se retira todo el tejido negro y se deja exclusivamente el tejido blanco donde se encuentra el sistema nervioso.

Tabla 2. Concentración en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de ADN, de los extractos de pedúnculos oculares, de dos especies de camarón blanco utilizando un protocolo CTAB. (no=número de muestra)

<i>Litopenaeus vannamei</i>				<i>Litopenaeus setiferus</i>			
Sonora		Panamá		Veracruz		Campeche	
no.	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	no.	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	no.	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	no.	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1	1.6	11	0.5	21	0.65	31	2.3
2	1.1	12	1.1	22	1.1	32	1
3	1.1	13	0.7	23	0.36	33	1.2
4	1.15	14	0.5	24	0.8	34	0.9
5	1.1	15	0.5	25	1	35	0.5
6	3	16	0.2	26	3.4	36	1.6
7	2	17	0.2	27	0.5	37	1.5
8	0.55	18	0.5	28	0.5	38	2
9	0.9	19	0.2	29	0.7	39	3.4
10	1.1	20	0.3	30	0.3	40	2.3
S1	1.2	P1	0.3	T1	0.7	C1	0.7
S2	0.8	P2	0.6	T2	0.3	C2	0.8
S3	0.5	P3	0.3	T3	1.2	C3	0.6

## Amplificación

### Estandarización del protocolo de la PCR

#### Elección de oligonucleótidos

En este trabajo se utilizaron oligonucleótidos seleccionados y sintetizados con base en secuencias conocidas de *L. vannamei*, dado que trabajamos genes con secuencias conservadas (Van Wormhoudt, 1996) hemos utilizado los mismos oligos para los análisis de *L. setiferus*.

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Gen	Secuencia	Largo del segmento (pb)
Citocromo Oxidasa I (CO I)	COI 5'GACATTGGAACATTATACTTT3' CO Rev 5'GTTGATCCAATGGAAGATACA3'	1340
16 S	16 ter 5'GACATTGGAACATTATACTTT3' 12 val rev 5'AAGATGGAGCTTGAATAGTTAAG 3'	1189
Amilasa S-R	Ami S 5'GGAGAATGGCCAGGATAAGAAC3' Ami R 5'CCGTCGCCGCCACAGTCACG3'	En este caso se obtienen dos fragmentos de 650 y 750



Los productos de cada PCR, se precipitaron con AcNa, el ADN amplificado se mantuvo seco en refrigeración, para rehidratarse en agua antes de las digestiones.

### Estandarización de la temperatura

Dado que no se cuenta con una técnica estándar para estos genes en estas especies, fue necesario hacer algunos ensayos preliminares variando las temperaturas de unión de los oligonucleótidos.

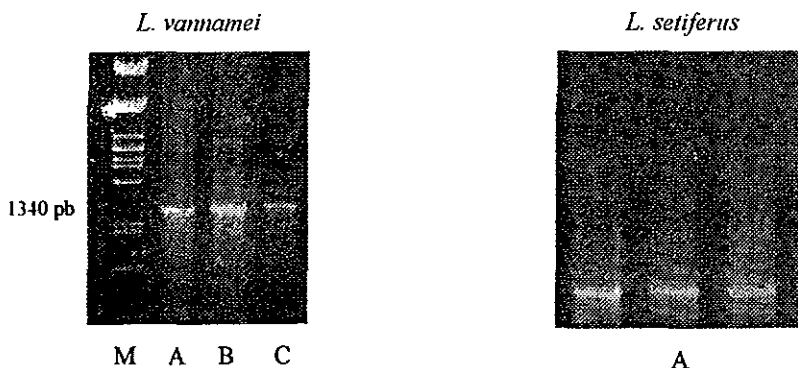
### CO I

Se realizó una serie de pruebas preliminares para *L. vannamei* a 44, 52 y 56°C.

Los mejores resultados se obtuvieron a 44°C.

Para *L. setiferus* fueron necesarias pruebas a 40, 44 y 46°C. En cada uno de los tratamientos fueron recuperadas aquellas muestras que amplificaban pues en ninguna PCR amplificó el 100% de ellas (fig. 1).

En ambas especies el fragmento amplificado coincide con la talla teórica (1340 pb) calculada con base en la secuencia. y no hay variación entre individuos.



**Figura 1.** Fotografías de geles de agarosa 1.2%. de los productos de la PCR para el gen CO I de dos especies de camarón *L. vannamei* y *L. setiferus*. M= marcador, A= 44°C, B= 52°C y C= 56°C.

## 16 S

Para la amplificación de este gen, se ensayaron en ambas especies 44, 46 y 48°C, utilizando el mismo protocolo que en CO I (apéndice 5).

Los productos en cada uno de los ensayos se precipitaron con AcNa y se recuperaron de geles de agarosa 1.2%, para lograr el mayor numero de muestras posibles, pues no hubo una temperatura a la cual todos las muestras amplificaran, esto se puede deber en el caso de *L. setiferus* a que los oligonucleótidos no son específicos (fig 2).

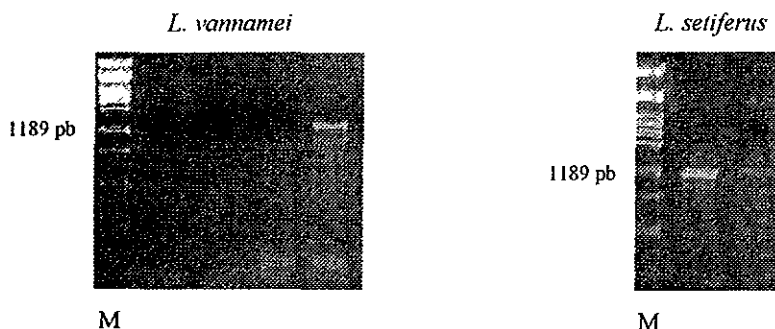


Figura 2. Fotografías de geles de agarosa 1.2%. de los productos de la PCR para el gen 16 S de dos especies de camarón *L. vannamei* y *L. setiferus*. M= marcador.

## Amilasa S-R

Se utilizó un mismo protocolo de amplificación para *L. vannamei* y *L. setiferus* (apéndice 3). Se eligieron dos genes basándonos en las secuencias de Van Wormhoudt y Sellos (1996), los oligos diseñados amplifican dos genes distintos de 650 y 790 pb, estos fragmentos contienen una zona de microsatélites

Como puede observarse en la figura 3, para *L. vannamei* los productos de la PCR son los esperados, un par de bandas, una de 790 y otra de 650 pb, sin embargo existen individuos que tienen únicamente el gen de 650 pb, esto permite detectar diferencias en la población aún antes de realizar el análisis con las enzimas de restricción.

Resulta interesante encontrar para el caso de *L. setiferus*, resultados distintos, puede observarse que con los mismos oligos para *L. vannamei*, para una secuencia que se mantiene conservada, se amplifican dos y tres genes seguramente de la misma familia, esto evidencia, como en el caso anterior, diferencias en este fragmento entre las poblaciones de *L. setiferus*,

sin embargo se complica la interpretación debido a que no se cuenta con la secuencia de esta especie

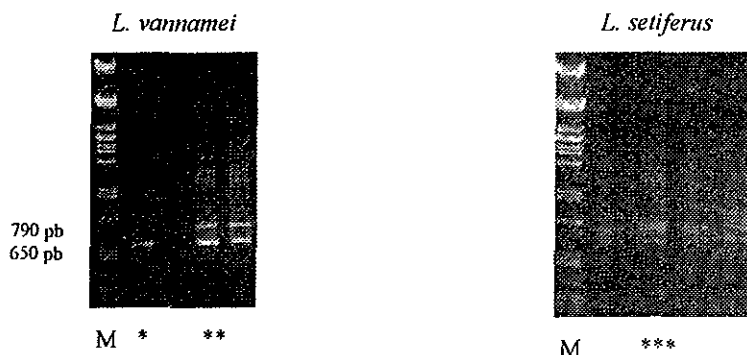


Figura 3. Fotografías de geles de agarosa 1.2% de los productos de la PCR para el gen Amilasa S-R de dos especies de camarón *L. vannamei* y *L. setiferus*. M= marcador. \*= individuos con un solo gen \*\*=Individuos con dos genes. \*\*\*=individuos con tres genes.

### Caracterización de los individuos utilizando Enzimas de Restricción

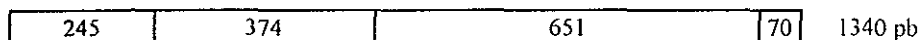
Para las secuencias obtenidas en el laboratorio por clonación y posterior recuperación, y las secuencias ya antes conocidas se obtuvieron los mapas de restricción. Con base en estos se elaboraron las cartas de restricción, lo cual permite tener la referencia teórica del número y talla de los fragmentos que se obtienen después de las distintas digestiones. Se analizaron para elegir tres enzimas que reconocieran sitios en las tres secuencias de interés y se elaboraron algunas pruebas preliminares, las enzimas con las que se trabajó fueron Alu I (AGVCT), Rsa I (GTVAC) y Taq I (TVCGA)

### Productos de la digestión

Para el análisis de los resultados se representa el fragmento amplificado en forma de rectángulo, señalando los sitios de corte de las enzimas como divisiones, así como la talla de cada fragmento en pares de bases (pb). Los resultados de las digestiones se presentan en fotos, comparando siempre ambas especies.

### Gen Co I digerido por Taq I

En la carta de restricción para el gen CO I en *L. vannamei* cortado por la enzima Taq I se obtienen tres sitios, el esquema es el siguiente.



Después de la digestión con Taq I para *L. vannamei* se obtienen cuatro bandas, como en el esquema teórico, en la fotografía el fragmento de 70 pb no es evidente debido a su pequeña talla, no se observaron diferencias de los patrones de bandas entre los individuos

Para la otra especie encontramos, que existen algunos sitios que se conservan como el 1 y 2, que dan bandas de 245 y 374 pb, sin embargo se observa que en algunos individuos no existe el sitio de corte 2, y se observa una banda de 950 pb, para *L. setiferus* pueden observarse algunas diferencias entre animales de las dos poblaciones (fig 4). Esto la convierte en un marcador efectivo para diferenciar ambas poblaciones.

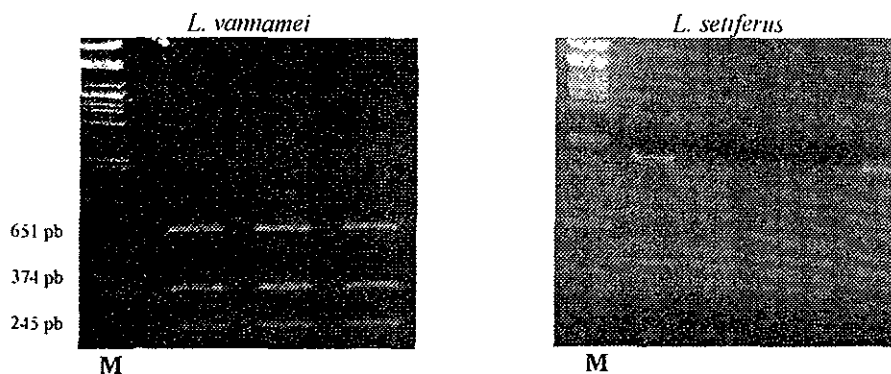


Figura 4 . Geles de agarosa 2% de la digestión del gen CO I con Taq I, en dos especies de camarón blanco, *L. vannamei* y *L. setiferus*. M= marcador

### Gen Co I digerido por Rsa I

La carta de restricción para el gen CO I en *L. vannamei* cortado por la enzima Rsa I se muestra a continuación.



Observamos que todos los individuos de *L. vannamei* tienen un patrón de bandas que coincide con los cuatro sitios encontrados teóricamente. No se observó variación entre las poblaciones. El esquema de bandas en *L. setiferus* confirma una secuencia con sitios conservados, en casi todos los individuos los patrones coinciden con lo teórico para la otra especie, en este caso se encontró un sitio de corte más en el fragmento de 300 pb, las diferencias entre poblaciones se discuten más adelante (fig. 5).

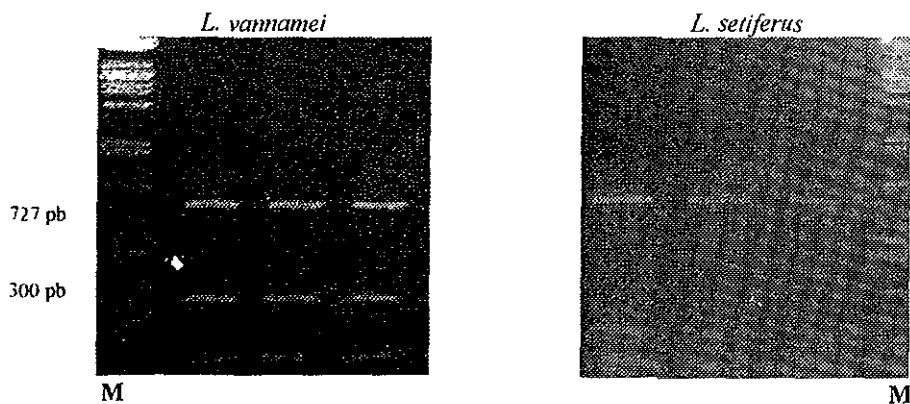
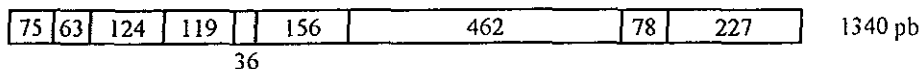


Figura 5. Geles de agarosa 2% de la digestión del gen CO I con Rsa I, en dos especies de camarón blanco, *L. vannamei* y *L. setiferus*. M= marcador.

## Gen Co I digerido por Alu I

La carta de restricción para el gen CO I con Alu I de *L. vannamei* se muestra a continuación



Los fragmentos resultantes de la digestión, en *L. vannamei* corresponden a las tallas teóricas, (fig 6) analizando todos los patrones de bandas se encontró dos esquemas distintos que pueden explicarse por una digestión parcial. En las poblaciones de *L. setiferus* se obtiene un patrón de bandas donde se observa, que existen algunos sitios conservados, aquellos que dejan después de la digestión una banda de 460 y 150, sin embargo existen algunos sitios de más, pues las tallas encontradas son de 320, 220, 180, 120 y 70 pb. Los resultados con *L. setiferus* muestran que este gen conserva algunos sitios entre ambas especies, aunque no se conoce el grado de divergencia entre ambas secuencias, ya se ha comparado *L. vannamei* con otras especies, y con crustáceos como *L. notialis* sin encontrar porcentajes más altos que 3% de diferencia entre ellas.

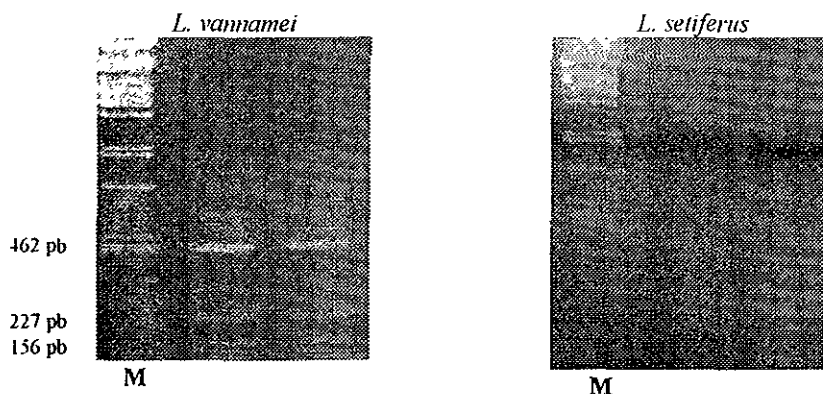
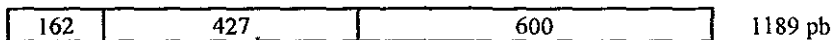


Figura 6. Gels de agarosa 2% de la digestión del gen CO I con Alu I, en dos especies de camarón blanco. *L. vannamei* y *L. setiferus*. M= marcador

## Gen 16S digerido por Taq I

La carta de restricción para el gen 16S mostrando los sitios donde corta Taq I en *L. vannamei* se muestra a continuación.



Esta enzima reconoce dos sitios en el fragmento del gen 16S que produce tres bandas, para las poblaciones de *L. vannamei* estas bandas coinciden con el patrón teórico, sin mostrar diferencias entre individuos.

En *L. setiferus* los sitios son diferentes, y se obtuvieron bandas de 850 y 220 pb, diferenciando a ambas especies (fig. 7).

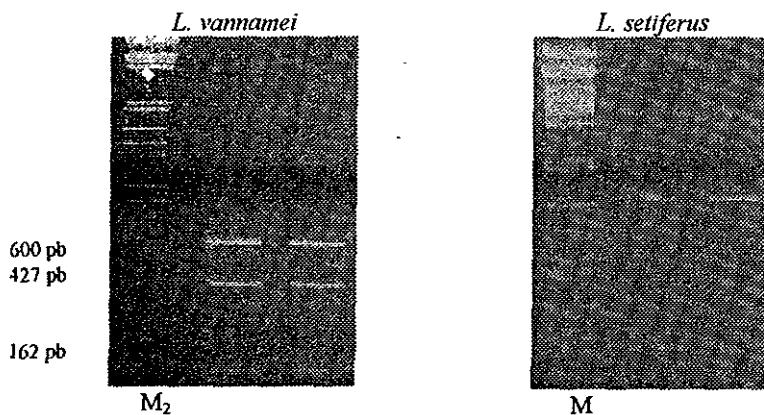
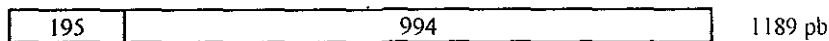


Figura 7. Geles de agarosa 2% de la digestión del gen 16S con Taq I, en dos especies de camarón blanco, *L. vannamei* y *L. setiferus*. M<sub>2</sub>= marcador 2, M=marcador

### Gen 16S digerido por Rsa I

La carta de restricción para el gen 16S mostrando los sitios donde corta Rsa I en *P. vannamei* se muestra a continuación



En ambas especies se observó el mismo patrón de bandas. En la secuencia se conserva un sitio de corte para Rsa I, y se obtienen dos bandas de 950 y 190 pb.

La talla no es exactamente igual a la teórica, esto puede explicarse por factores técnicos como la temperatura de las muestras al aplicarse en el gel (fig.8)

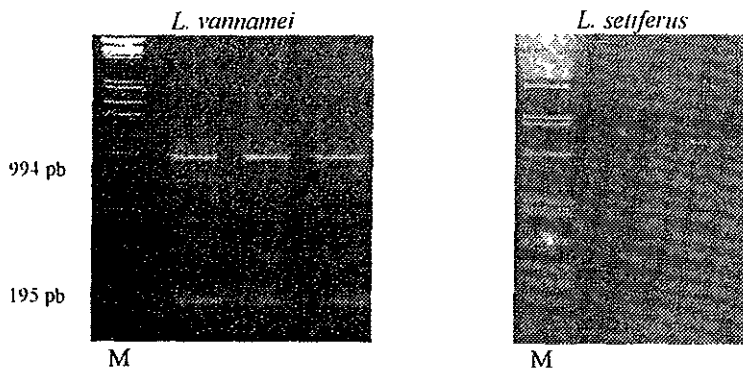
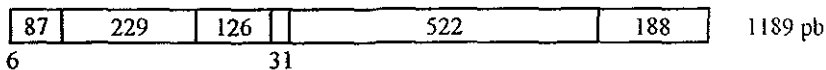


Figura 8 . Geles de agarosa 2% de la digestión del gen 16S con Rsa I, en dos especies de camarón blanco. *P. vannamei* y *P. setiferus*. M=marcador

### Gen 16S digerido por Alu I

La carta de restricción para el gen 16S mostrando los sitios donde corta Alu I en *L. vannamei* se muestra a continuación.





Los productos de la digestión para *L. vannamei* fueron analizados y se encontraron dos esquemas, uno que coincide con el esquema teórico, en el número y talla de las bandas, con excepción de dos individuos de la población de Sinaloa que serán analizados más adelante.

El caso de *L. setiferus* fue necesario hacer distintas pruebas y repeticiones, no se cuenta con muchas amplificaciones, pero se observó un conjunto de bandas en la que comparte tres con *L. vannamei*, de 520, 220 y 180 pb, pero existen diferencias en el resto de los sitios (fig. 9)

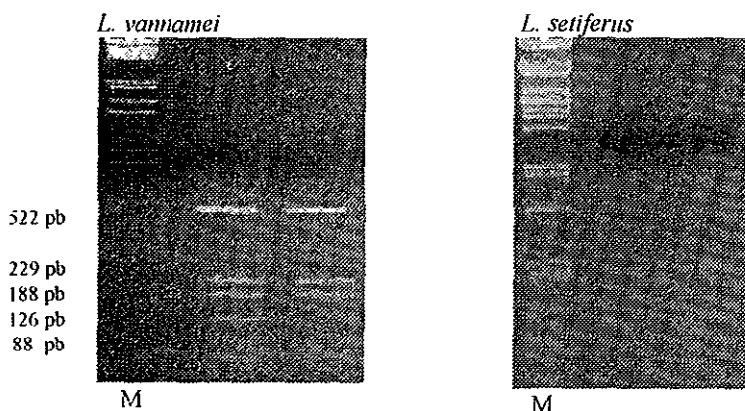


Figura 9. Geles de agarosa 2% de la digestión del gen 16 S con Alu I, en dos especies de camarón blanco, *L. vannamei* y *L. setiferus*. M= marcador.

#### Amilasa S-R digerida por Taq I

Los oligos utilizados en este caso amplifican dos genes distintos, uno de 750 y otro de 650 pb. El esquema de la carta de restricción para estos genes mostrando los sitios donde corta Taq I en *L. vannamei* se muestran a continuación



Después de la digestión con esta enzima, en *L. vannamei* se obtiene un patrón de bandas que coincide con el esperado teóricamente, con excepción de dos individuos donde al hacer la revisión de los productos de la PCR se observa que presentan un solo gen.

El caso de *L. setiferus* es distinto, pues desde los productos de la PCR se amplifican 3 bandas, por lo tanto los patrones que se encuentran son diferentes a los esperados según la carta de restricción teórica para la otra especie, debido a que no se cuenta con la secuencia es difícil diseñar las cartas en este caso, sin embargo esta molécula o bien esta familia de genes pueden ser elegidos como un eficiente marcador genético (fig. 10).

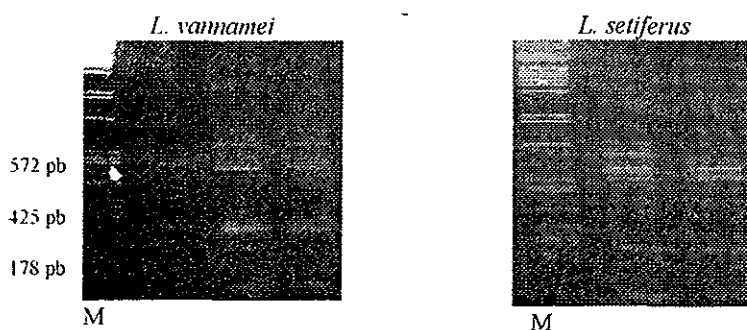
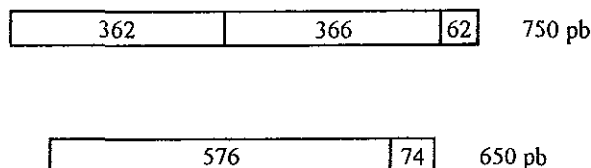


Figura 10 Gels de agarosa 2% de la digestión del gen Amilasa S-R con Taq I, en dos especies de camarón blanco, *L. vannamei* y *L. setiferus*. M=marcador

### Amilasa S-R digerida por Rsa I

La carta de restricción para estos genes mostrando los sitios donde corta Rsa I en *L. vannamei* se muestran a continuación.



Después de la digestión con Rsa I, en *L. vannamei* se obtienen bandas iguales que las que se encuentran en la carta de restricción, los restos de banda mayores que 576 pb se explican por digestiones parciales.

En la otra especie se observa una banda de más que las esperadas teóricamente, esto puede deberse a la presencia de un gen suplementario (fig. 11).

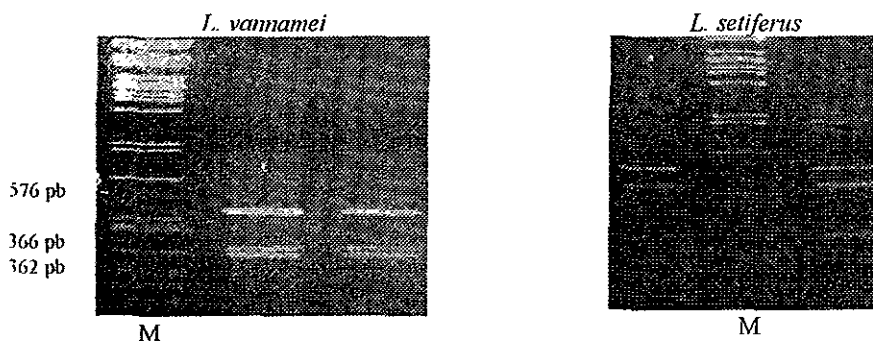
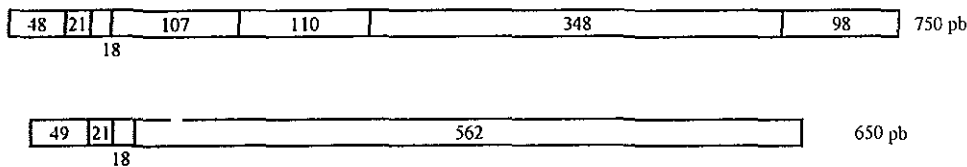


Figura 11. Geles de agarosa 2% de la digestión del gen Amilasa S-R con Rsa I, en dos especies de camarón blanco, *L. vannamei* y *L. setiferus* M=marcador

#### Amilasa S-R digerida por Alu I

Los oligonucleótidos utilizados en este caso permiten amplificar dos genes distintos, uno de 750 y otro de 650 pb. La carta de restricción para estos genes mostrando los sitios donde corta Alu I en *L. vannamei* se muestran a continuación.



Como ya se mencionó anteriormente los fragmentos amplificados incluyen una región que contiene intrones distintos entre cada fragmento, regiones donde es más probable encontrar diferencias, cortados con Alu I encontramos esquemas que concuerdan con las tallas teóricas.

Para esta enzima en *L. vannamei* se encuentran dos esquemas, uno que concuerda con el esperado y otro que analizará más adelante.

*L. setiferus* muestra un patrón de bandas semejante al de la otra especie, mostrando la existencia de sitios conservados, sin embargo la interpretación de bandas es difícil, pues como se ha mencionado anteriormente en los productos de la PCR existe una banda más posiblemente de un gen complementario (fig. 12).

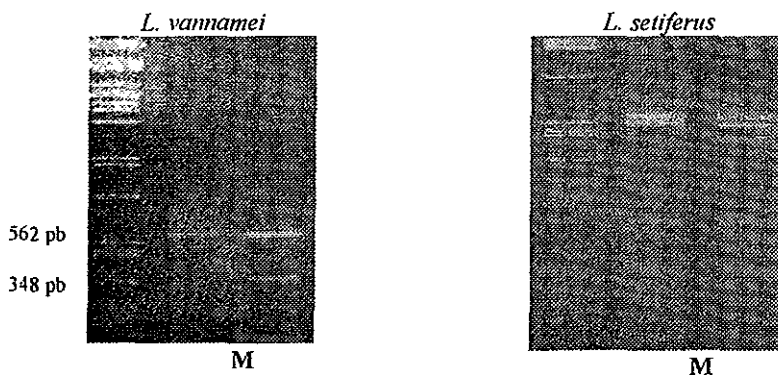
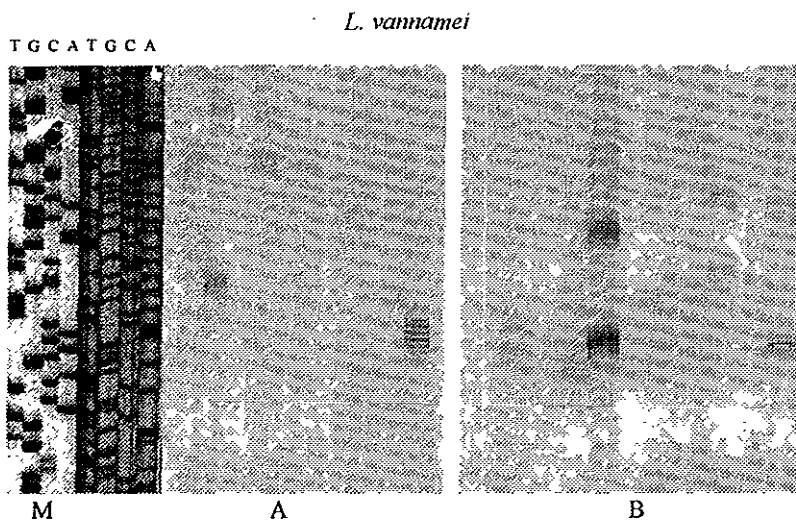


Figura 12. Geles de agarosa 2% de la digestión del gen Amilasa S-R con Alu I, en dos especies de camarón blanco, *L. vannamei* y *L. setiferus*. M=marcador

## Microsatélites

Para analizar los distintos patrones de bandas entre los individuos, nombramos con letras empezando con a para el fragmento de talla más pequeña 330 pb, hasta f para al mayor con 416 pb (fig. 13).



**Figura 13.** Análisis preliminar de la variación intra e interpoblacional para el gen 28 de la Amilasa S-R en la región microsatélite de *L. vannamei* A=Población de Panamá y B=Población de Sinaloa. a330 a f416 corresponde a los alelos y su longitud en pares de bases. Se obtiene una banda principal y bandas accesorias para cada alelo debido a un artefacto inherente a la técnica del PCR. para asignar la talla se toma como referencia la banda principal. Se utilizó la secuencia conocida de la Glucosidasa 12R como marcador

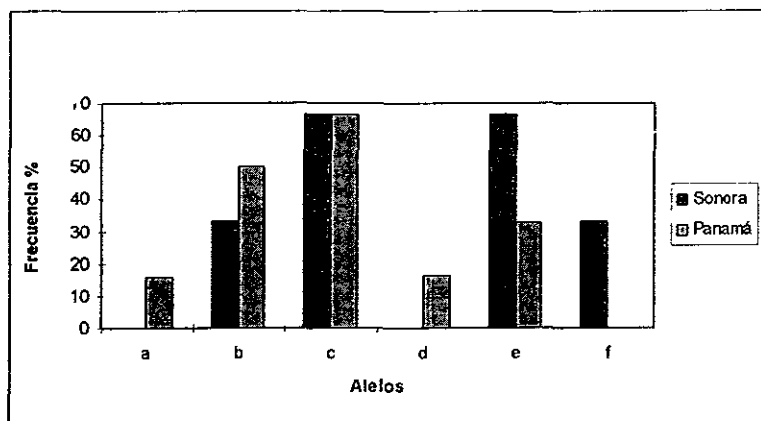
En este ensayo preliminar se observa que la frecuencia de alelos es diferente dentro y entre las poblaciones (tabla 4). Ciertos alelos como e y f están presentes en una población y ausentes en la otra.

Sin embargo, el número de individuos experimentales es reducido como para obtener un resultado objetivo.

**Tabla 4.** Frecuencia de alelos de la región microsatélite del gen 28 de la Amilasa S-R en dos poblaciones de *L. vannamei*.

Población	Individuo	Alelos
Sinaloa	1	e x 2
	2	c f
	3	e f
	4	c e
	5	c x 2
	6	b x 2
Panamá	1	b x 2
	2	a c
	3	b d
	4	c x 2
	5	c e
	6	b e

La siguiente etapa implica un estudio de al menos 30 a 50 individuos de cada localidad, que permita hacer un estudio estadístico no criticable.



**Figura 14.** Gráfica que muestra la frecuencia (%) para cada alelo en cada población de camarón blanco *L. vannamei*, en la región microsatélite del gen de la Amilasa S-R

## Caracterización de las poblaciones

### *Litopenaeus vannamei*

Para caracterizar las poblaciones con base en nuestros resultados se hizo un seguimiento de cada uno de los individuos, desde el producto de la PCR hasta los patrones de bandas en cada una de las digestiones con las diferentes enzimas, los resultados se presentan a continuación y se resumen en la Tabla 5.

### **Análisis mitocondrial.**

Al analizar los resultados para el gen de la CO I (fig. 4, 5 y 6) encontramos dos patrones que llamamos a y b, el primer patrón de bandas corresponde a aquellos individuos donde los sitios de restricción son los mismos en el patrón teórico, el segundo caso lo muestran dos individuos de la población de Sinaloa donde existe un sitio más de corte para la enzima Rsa I, que se encuentra en el segmento de 319 pb dejando dos bandas mas pequeñas. Para el gen 16S (fig. 7, 8 y 9) hemos llamado a al esquema que coincide con las cartas de restricción y al igual que en el caso anterior se encontró un segundo patrón b donde Alu I reconoce un sitio más que los esperados. Existen dos individuos de la población de Sinaloa que presentan esta segunda opción de patrón de bandas para 16S, esto diferencia a las dos poblaciones, pues en Panamá la frecuencia de individuos con el patrón teórico es 12/12, es decir de cada individuo estudiado presenta el mismo patrón que el esperado, en la otra población existen casos diferentes (tabla 5).

### **Amilasa S-R**

Se designó a al patrón de bandas que se observan después de una digestión con RsaI , b a los productos de la digestión con Taq I y c a los productos de la digestión con Alu I para el gen de 650 pb de la Amilasa S-R. La nomenclatura utilizada para el gen de 750 pb fue a', b' y c', estos coinciden con el patrón de referencia que es calculado con los mapas de restricción. En la población de Sinaloa se encontró un patrón distinto al teórico para Alu y fue llamado c'' este se encuentra en el segmento de 750 pb y es un sitio menos de reconocimiento de Alu I entre el fragmento de 110 y 348 pb. Para todos los casos en

algunas fotografías se observan rastros de la banda original producto de la PCR o bandas difusas intermedias que han sido explicadas como digestiones parciales. Hemos elegido las enzimas de restricción como marcadores genéticos que han sido utilizados en los últimos años, en estudios de estructura de poblaciones naturales o de cultivo, en especies de importancia comercial como la langosta (Silberman et al., 1994), salmones (McKay et al., 1996), en bivalvos (Rigaa et al., 1997) y camarones (Benzie et al., 1993; Bouchon et al., 1994; Tassanakajon et al., 1997) por nombrar algunos ejemplos, en los que se ha propuesto estos marcadores como efectivas herramientas para explorar la estructura de las poblaciones. El acelerado desarrollo de técnicas moleculares permite explorar con técnicas nuevas encontrando respuestas a un nivel más fino en la estructura del material genético como el uso de los microsatélites.

En este trabajo el uso de digestiones con diferentes enzimas evidencia algunas diferencias entre dos poblaciones de *L. vannamei*, donde las poblaciones estudiadas presentan una variación en los patrones de restricción distintos a los esperados en las cartas de restricción en la población de Sinaloa proveniente del medio natural, mientras que se muestra más homogénea la población Panameña proveniente de una granja de cultivo desde hace 3 generaciones. En los productos de la PCR se constata que se conservan las secuencias a pesar de las distancias geográficas. Sin embargo, también puede verse que como es de esperarse, la población silvestre muestra variación genética.

### **Microsatélites**

Los resultados de los microsatélites también fueron nombrados con letras de la a a la f para su análisis y en la tabla 5 se muestran las combinaciones que se encuentran para cada individuo. Los resultados con la técnica de microsatélites abre una alternativa para siguientes estudios, pues para esta especie parece ser la opción adecuada aumentando el número de muestra y secuencias a analizar.



**Tabla 5.** Resultados de la comparación de dos poblaciones de camarón blanco *L. vannamei*, con base en el análisis de los polimorfismos de los fragmentos de restricción y de microsatélites. no. individuo= de 1 a S3 población de Sinaloa, de 11 a P3 población de Panamá, \*=no caracterizado

<i>L. vannamei</i>					
no. individuo	CO I	16S	Amilasa S-R 650pb AluI RsaI TaqI	Amilasa S-R 750 pb AluI RsaI TaqI	Microsatélites
1	*	*	* a b	*	*
2	*	*	*	*	*
3	a	a	c a d	c' a' b'	*
4	a	a	c a b	c' a' b'	a b
5	b	*	c a b	*	*
6	a	a	c a b	c'' a' b'	b d
7	*	a	*	*	*
8	a	a	c a b	*	*
9	a	*	*	*	b b
10	a	a	c a b	c' a' b'	a c
S1	a	a	c a b	¿	a b
S2	b	b	c a b	c' a' b'	*
S3	*	b	c a b	c'' a' b'	a a
11	a	a	*	*	*
12	a	a	*	*	a a
13	a	a	c a b	c' a' b'	b b
14	a	a	c a b	c' a' b'	*
15	a	a	c a b	c' a' b'	*
16	a	a	*	*	b e
17	a	a	c a b	c'' a' b'	*
18	a	a	c a b	c' a' b'	e f
19	a	a	c a b	c' a' b'	*
20	a	a	*	*	b f
P1	*	*	c a b	c' a' b'	e e
P2	a	a	c a b	c' a' b'	*
P3	a	a	*	*	*

### *L. setiferus*

Hemos trabajado con esta especie siguiendo con la línea de investigación iniciada por nuestro grupo de trabajo en 1995 (Arena, 1995) donde con el uso de técnicas de genética-bioquímica se han encontrado evidencias de diferencias entre las poblaciones de este

camarón blanco en el Golfo de México. Siguiendo con este esfuerzo y retomando los resultados de diferencias utilizando caracteres morfológicos y diferencias bioquímicas, se iniciaron los estudios en torno a la amilasa por su gran importancia en el metabolismo de los glúcidos, que puede ser una herramienta en programas de selección genética, además de los marcadores mitocondriales que son clásicos en estos estudios. Utilizamos las secuencias de *L. vannamei* para el análisis de esta especie pues elegimos genes con secuencias conservadas (Machado, 1996). Desgraciadamente no fue un asunto trivial amplificar los fragmentos de interés utilizando los oligos diseñados para *L. vannamei* y no contar con una técnica estándar toma tiempo y reactivos, lo cual dificulta un poco la interpretación, así pues para el gen 16S se cuenta con un número reducido de muestras.

El gen de la CO I muestra para las tres enzimas patrones de digestión semejantes a *L. vannamei* con algunas diferencias entre poblaciones, también en este caso se cuenta con pocos resultados.

Para la amilasa S-R, se obtiene desde los productos de la PCR cuatro bandas de 780, 740, 680 y 640 pb, diferente que las dos bandas esperadas según la secuencia de *L. vannamei*, estas bandas difieren entre los organismos, y por consiguiente en los productos de las digestiones, dejando como resultado un patrón de bandas en el cual, algunas se conservan y otras permiten diferenciar a las especies. Estos resultados coinciden con los de Bouchon et al., 1994, quien afirma encontrar diferencias entre poblaciones de camarones cuando utiliza ADNmt, mientras que cuando se analizan la variación de aloenzimas se encuentra bajo nivel de subdivisión de poblaciones de *Penaeidos*. En investigaciones de organismos como la langosta (Silberman et al., 1994) y otras especies de camarones (Benzie et al., 1993) se han encontrado diversidad y divergencia en las secuencias de nucleótidos en estudios del genoma mitocondrial, en especies de distribución continua.

## IV Discusión

Se encontraron diferencias al analizar los polimorfismos de los fragmentos de restricción entre poblaciones de *L. setiferus*, para los tres genes estudiados CO I, 16S y amilasa S-R, cuando son digeridos con la enzima Taq I, mostrando diferencias entre las poblaciones.

Existen distintos sitios de corte entre las dos especies, ya que las secuencias no están conservadas y para *L. setiferus*, es probable que se presenten genes complementarios.

Las poblaciones de *L. setiferus* se pensaban hasta hace unos años como parte de una gran población distribuida a lo largo del Golfo de México (Lester y Pante, 1992); sin embargo, es posible descubrir diferencias con el uso de nuevas tecnologías que permiten obtener información a niveles más finos, por ejemplo, de las características moleculares.

Para *L. vannamei*, no se observaron diferencias entre poblaciones cuando se analizaron los polimorfismos en los fragmentos de restricción, para los genes CO I y 16S; para el análisis del gen de la amilasa S-R, se observó que algunos de los individuos aparentemente cuentan con un solo gen, por lo que se recomendaría como un marcador sensible a las diferencias en estas poblaciones, para lo cual es necesario ampliar el tamaño de la muestra. Sin embargo, al analizar la región microsatélite de los genes de la amilasa se observaron diferencias en las frecuencias alélicas dentro de la especie, además en la presencia ausencia de algunos alelos; por ejemplo, los alelos a y d están presentes en la población de Panamá, mientras que el alelo f se observó solo en la población de Sonora. En particular este marcador molecular, por su carácter de alta variabilidad, ha sido reportado como una herramienta fina que permite explorar diferencias de las secuencias nucleotídicas entre organismos de una misma población separados geográficamente, la cual ha sido desarrollada para organismos de importancia económica, como camarones, salmones, langostas y distintas especies de peces, (Benzie, et al., 1993; Fujii y Nishida., 1997; Pérez-Enríquez y Taniguchi, 1999; Silberman et al., 1994).

Dado que se encontraron diferencias entre los fragmentos amplificados para los genes de la amilasa entre las dos especies, podrían compararse ambas secuencias, en este estudio solo se cuenta con la información completa para *L. vannamei* y no para la otra especie, por lo tanto el no trabajar con secuencias universales puede presentar dificultades en la amplificación como surgieron en este caso, sin embargo el resultado evidencia diferencias a nivel de secuencia y posiblemente la existencia de genes complementarios entre estas dos especies.

7

## SECCIÓN III

### I Discusión General

#### *Litopenaeus setiferus*

El Golfo de México es una región dinámica, los aspectos físicos y biológicos que lo caracterizan están en constante cambio, a escalas de años, semanas e incluso días, características como los huracanes, aportes de ríos, sistemas lagunares, regiones climáticas, provincias de sedimentos, productividad, corrientes, mareas, hacen de éste un sistema complejo, con fronteras naturales abiertas y de límites variables, que se refleja en los patrones de distribución y el comportamiento de las comunidades de los organismos que lo habitan (Yáñez y Sánchez, 1983). Tan solo en la Laguna de Términos en Campeche, al estudiar los patrones de comportamiento de las comunidades de peces, los mecanismos de su productividad y las relaciones de intercambio de organismos entre el mar y los sistemas lagunar-estuarino, así como de la circulación costera y la transición sedimentológica entre provincias deltáica y carbonatada, se han delimitado dos subsistemas ecológicos, una zona heterogénea fuertemente influenciada por el aporte de estuarios y ríos adyacentes, con ciertas características de transparencia, salinidad temperatura, etc., y una zona típicamente marina, homogénea, con características distintas a la anterior (Yáñez et al., 1983). Por otro lado existen otros factores como la temperatura y quizá la salinidad que controlan las distribuciones disjuntas de algunas formas, pero no pueden pasarse por alto los factores ecológicos. Existen numerosos ejemplos de especies que muestran variación geográfica a lo largo del Golfo de México, como un reflejo de la variación ambiental en la que habitan, uno de ellos son los cangrejos del género *Uca*. Existen trece especies en el Golfo, cinco de ellas son endémicas, distribuidas de acuerdo a preferencias de temperatura, salinidad y sedimento para cada una. Morfológicamente son tan parecidos que se han confundido registros de una especie con otra, como en el caso de *Uca pugilator*, con *U. pabacea*, *U. marguerita* con *U. burgersi*, entre otros. La principal característica que diferencia sexos y especies, es la forma de una gran quela. También las diferencias residen en la presencia de pubescencias, u otras características muy finas del exoesqueleto. Las estrategias reproductivas, las conductas de territorialidad y los patrones de alimentación son semejantes entre ellos (Britton y Morton,

1989). Las costas del Golfo de México pueden ser reconocidas por la abundancia de camarones *Litopenaeus*. Esto no significa que los camarones son los miembros dominantes en el sentido de que su presencia determina la naturaleza de las comunidades y modifiquen el sustrato, sino que existen otros factores aunados a los antes descritos que influyen en las comunidades. Por ejemplo en el caso de *L. setiferus* que ha declinado por tener un predador tan fuerte como lo es el hombre, ha sido reemplazado por *Farfantepenaeus aztecus* y *L. duorarum* invadiendo otras partes del ecosistema. Es decir el ecosistema depende de un conjunto de factores además de los climáticos, como lo son las condiciones bióticas, ecológicas e históricas. Particularmente en los camarones se ha observado por ejemplo que el sustrato tiene un impacto directo sobre el crecimiento de estos organismos (Ritvo et al., 1998). En este trabajo analizando las variación dentro y entre poblaciones de *L. setiferus* se encontraron diferencias morfológicas y moleculares. En el caso de las poblaciones de Veracruz y Campeche se encuentran localizadas en distintas regiones climáticas, existen diferencias en el tipo de sedimentos que separa estas poblaciones, y el tipo de aporte de los ríos (Britton y Morton, 1989). Además existe un cañón submarino que constituye un límite de separación de los depósitos de caliza, de las arcillas y limos entre la plataforma continental de Campeche y Veracruz (Morelock y Bryant, 1971). Los polimorfismos en los fragmentos de restricción particularmente para el gen de la CO I, han sido utilizados para examinar la estructura de poblaciones de organismos marinos (Kitaura et al., 1998), encontrando variación en la secuencia para organismos de distintas poblaciones en una misma especie, y para el gen de la Amilasa S-R donde se encontró la evidencia de genes complementarios distintos a los esperados con relación a la fuente teórica, en investigaciones con este gen se ha observado que presenta un alto nivel de variación (Van Wormhoudt y Sellos, 1996),

#### *L. vannamei*

Para esta especie, su hábitat el Pacífico, tiene una plataforma continental mas o menos uniforme en amplitud (25 a 50 km.), las rocas más profundas y expuestas a lo largo de la costa mexicana son principalmente de origen ígneo y metamórfico, así que se tiene desde Cabo Corrientes hasta el Golfo de Tehuantepec los mismos tipos de sedimentos incluyendo

rocas metamórficas precámbricas a mesozoicas y sedimentos cretácicos con intrusiones de plutones. La estructura térmica del Pacífico Tropical se caracteriza por una capa de mezcla donde la temperatura es casi constante, debido a la poca profundidad de la zona costera, la estructura termohalina se ve afectada por procesos particulares, como los vientos locales, las descargas de ríos, lluvias y evaporación entre otras. El Pacífico tropical mexicano es una región de corrientes débiles por lo menos con dos zonas de frentes principales que favorecen la presencia de la capa de mínimo oxígeno. El Océano Pacífico se divide en áreas ricas y pobres en nutrientes, las cuales se distinguen en función de la detectabilidad de nitratos. En general el Océano Pacífico es pobre en elementos nutritivos pues se aprecia que los nitratos generalmente son indetectables en los primeros 10 m de profundidad mientras que los fosfatos y silicatos siempre están presentes, así como el nitrógeno amoniacal (De la Lanza, 1991). El camarón blanco del Pacífico, ha sido muy estudiado dada su importancia en la industria acuícola. Para esta especie se cuenta con información detallada en distintos niveles de estudio. En relación al análisis de la variación geográfica a nivel genético en esta especie se han explorado poblaciones de Sonora, Panamá y Ecuador, encontrando niveles muy bajos de diferenciación entre poblaciones silvestres (Sunden y Davis, 1991). Los estudios de variación geográfica toman en cuenta que éste es un proceso multidimensional, que involucra la adaptación de algunos caracteres a una variedad interdependiente de factores ambientales (genéticos e históricos) cuyos gradientes y rangos producen complejos contextos. En estos estudios todavía hoy en día, uno de los grandes problemas es la dificultad por distinguir la variación geográfica de la inducción directa del ambiente (Gould y Johnson, 1972; Thorpe, 1976). En particular para esta especie, se han obtenido evidencias del amplio rango genético de respuesta (plasticidad) que tienen estos organismos, el cual ha sido observado a través de la reproducción. Se ha reportado que los individuos provenientes de un mismo "evento reproductivo" mostraron diferencias significativas, no solo en el crecimiento, sino también en la forma, y madurez sexual al ubicarlos en sitios distintos para su desarrollo (Chow y Sandifer, 1991). Otra evidencia puede ser el hecho de que en este trabajo se encontró el mismo patrón de bandas para CO I, 16S, y para la amilasa cuando se compararon los polimorfismos en los fragmentos de restricción, en las poblaciones naturales y en las referencias teóricas; sin embargo si se analiza de manera más fina el ADN, como lo

permite la técnica de microsatélites, es posible encontrar diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones, esto indica que probablemente las interpretaciones están correlacionadas con el tipo de marcadores que se utilicen.

Se ha observado con base en el registro fósil que los crustáceos son un grupo que ha sido capaz de generar diversas combinaciones en torno a una misma forma, además de presentar patrones de convergencia morfológica. Según el registro fósil estos individuos han estado intrínsecamente relacionados con su biogeografía, hoy se sabe que los patrones de distribución de los crustáceos pueden explicarse con la hipótesis de vicarianza, observando que las especies se han ido modificando por efectos de deriva continental, apertura y cierre de océanos, especiación y extinción (Lawrence, 1982).



## II Conclusión General

Se cuenta con un sistema de captura de imágenes con un error de medición asociado a la captura de datos de  $1.7 \times 10^{-5} \%$ .

Para estas dos especies se corrobora que el uso de las herramientas morfométricas y moleculares se complementan proporcionando información de la variación intra e interespecífica.

Se encontraron diferencias entre sexos dentro de las poblaciones y entre las especies; para los valores del CV, en *L. setiferus* los valores mas altos las presentan las hembras, en el caso de *L. vannamei*, los valores mas altos se encontraron para los machos.

El análisis de varianza muestra diferencias significativas entre sexos para las poblaciones de ambas especies. para diferentes caracteres morfométricos.

El análisis de componentes principales permite diferenciar a las dos especies, siendo los anchos del primer, tercer y cuarto segmentos abdominales determinan la diferencia interespecífica.

Los valores asociados a los dos primeros componentes son los mismos en cada población, a excepción de la población de Chiapas, donde al primer componente no se encuentra asociados los largos del cefalotórax, de los segmentos 2 y 4.

Los genes CO I, 16S, y Amilasa S-R cuando son digeridos por la enzima Taq I, son marcadores efectivos para resaltar las diferencias inter e intraespecífica.

Los microsatélites son una herramienta fina para distinguir las diferencias entre poblaciones, evidenciando diferencias en la frecuencia alélica así como de la presencia ausencia de alelos entre poblaciones.

Se recomienda seguir el estudio del gen de la Amilasa S-R, ampliando el número de muestra, si se esta interesado en los cambios de frecuencias fenotípicas y genéticas a corto plazo en estos crustáceos.

Se recomienda el desarrollo de los microsatélites para la caracterización poblacional.

Independientemente de las teorías evolutivas para los crustáceos que explican la variación geográfica para estas dos especies, no se puede hablar de una gran población distribuida a lo largo de un gradiente geográfico, sin presentar cambios entre poblaciones, si no que el conjunto de las fuerzas azarosas o dirigidas se expresan en la variación de sus caracteres y marcadores genéticos.

### III Bibliografía

Acosta, J. 1994. Morfometría en el camarón blanco *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda), como método para establecer criterios de selección de reproductores. Univ. y Cien. (11): 143-148

Alvarez, P. 1995. Algunas consideraciones sobre las especies de camarones cultivables en el Litoral del Golfo de México y Mar Caribe. Memorias. Reunión Técnica Sobre Cultivo de Camarón en el Golfo de México y el Mar Caribe. 34 pp

Anuario estadístico de pesca. 1997.

[Http://www.semarnap.gob/sspesca/ANUA97/ANUA97.html](http://www.semarnap.gob/sspesca/ANUA97/ANUA97.html)

Arena, L. 1995. Estudio Morfométrico Genético-Bioquímico de dos poblaciones del camarón blanco *Penaeus setiferus* (Linnaeus) del Golfo de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 45 pp

Bailey, R. y J. Byrnes. 1990. A new, old method for assessing measurement error in both univariate and multivariate morphometric studies. Syst. Zool. 39 (2): 124-130.

Benzie, J. Ballament, E. y S. Frusher. 1993. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. Aquac. 111: 89-93.

Benzie, J. 1998. Penacid genetics and biotechnology. Aquac. 164: 23-47

Berovides, V. y M., Alfonso. 1987. Los genes en las poblaciones. Ministerio de Educación Superior. Cuba. 277 pp

Bookstein, L. 1982. Foundations of morphometrics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 13: 451-470

- Bouchon, D., Souty, C., y R. Raimond. 1994. Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *P. japonicus* Bate. Aquac. 127: 131-144.
- Britton, J. y B., Morton. 1989. Shore Ecology of the Gulf of Mexico. University of Texas Press. USA. 387 pp
- Brown, A., J., Veri, P., Scott, T. Williams, T., Middleditch, y A. Lawrence. 1979. The maturation and spawning of *Penaeus stilirostris* under laboratory condition Proc. World Maricult. Soc. 11:448-499
- Ching, S. y L., Chen. 1990. Growth characteristics and relationships among body length, body weight and tail weight of *Penaeus monodon* from a culture environment in Taiwan. Aquac. 91: 253-263.
- Chow, S., y A., Sandifer, 1991. Differences in growth, morphometric traits, and male sexual maturity among Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* from different commercial hatcheries. Aquac. 92: 165-178.
- Conceicao, N. 1993. Biometría, Genética-bioquímica y Ecofisiología de postlarvas y juveniles de la langosta *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (Crustacea, Decapoda). Tesis de Doctorado. Universidad de la Habana. Cuba. 91 pp
- Davis, J., y A. Gilmartin. 1985. Morphological variation and speciation Systematic Botany. 10 (4): 417-425.
- De la Lanza, G. 1991. Oceanografía de mares mexicanos. AGT Editor. México. 1ª Edic. 569 pp.

Drake, P., y M., Arias. 1984. Biología de los Mugílidos (Osteichthyes, Mugilidae) en los esteros de las salinas de San Fernando (Cádiz). II Crecimiento Relativo. Inv. Pesqu. 48 (2):157-173

Espinosa, G. 1989. Genética bioquímica y morfometría del camarón blanco *Penaeus schmitti* de Cuba, resultados preliminares. Rev. Inv. Mar. 10 (2): 157-162.

Estoup, A., Solignac, M., M., Harry y J. Cornuet. 1993. Characterization of (GT)<sub>n</sub> and (CT)<sub>n</sub> microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. Nucl. Acids Res 21 (6):1427-1431.

Erllich, H.1989. PCR Technology. Stockton Press. New York. 246 pp.

Estoup, A., Solignac, M., Harry, M., y J., Cornuet. 1993. Characterization of (GT)<sub>n</sub> and (CT)<sub>n</sub> microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. Nucleic Acids Res. 21 (6): 1427-1431.

Farfante, I. 1969. Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. Fishery Bulletin. Vol. 67 no. 3

Farfante, I. 1988. Illustrated key to Penaeoid shrimps of commerce in the Americas. NOAA Technical Report. US Department of Commerce. 32 pp

Farfante, I , y Kensley, B. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Mémoires du Muséum National D'Histoire Naturelle. Tome 175. Paris.233 pp

Food and Drug Administration. 1992. La situación del mercado norteamericano del Camarón. Boll. Oc. Garden Prod. INC. 9:(49). 14 pp.

- Fujii, T., y M. Nishida. 1997. High sequence variability in the mitochondrial DNA control region of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Sci 63(6): 906-910.
- Fuseya, R. y S. Watanabe. 1996. Genetic variability in the mud crab genus *Scylla* (Brachyura: Portunidae) Fisheries Sci. 62 (5) 705-709.
- Goswami, U., Dallal, S., y S. Goswami. 1986. Preliminary studies on prawn, *Penaeus merguensis* from selection of broodstock in genetic improvement programs. Aquac. 53: 41-48.
- Gould, J., y R. Johnson. 1972. Geographic variation. Ann. Rev. of Ecol. and Syst. 3: 457-498
- Harman, H. 1976. Modern factor analysis. Third Edition. The University of Chicago Press. Chicago. 488 pp
- Harrison, G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. TREE. Cambridge. 4(1):198
- Hedgecock, D., L. Tracey y K., Nelson. 1982. Biochemical genetics. In the biology of Crustacea Acad. Press. (2):297-313.
- Huxley, J. 1972. Problems of relative growth. Dover Publications, Inc. New York. 313 pp
- Ibáñez, A. 1995. Algunos aspectos de la dinámica de poblaciones de *Mugil cephalus* (Linnaeo, 1758) y *M. curema* (Valenciennes, 1836) (Pisces: Mugilidae) en la Laguna de Tamiahua, Veracruz. Tesis de Doctorado. UNAM. Facultad de Ciencias. 216 pp
- Ibáñez, A. y J. Leonart. 1996. Relative growth and comparative morphometrics of *Mugil cephalus* L. and *M. curema* V. in the Gulf of Mexico. Sci. Mar. 60 (2-3): 361- 368.

Iguchi, K., Tanimura, Y., Takeshima, H., y M Nishida 1999. Genetic variation and geographic population structure of Amphidromous Ayu *Plecoglossus altivelis* as examined by mitochondrial DNA sequencing. Fisheries Sci. 65 (1):63-67.

Isebrands, J. y T. Crow. 1975. Introduction to uses and interpretation of principal component analysis in forest biology. USDA For. Serv. Gen Tech. Rep. 19 pp

Kaplan, J. 1990. Les polymorphismes de restriction (RFLP). Biologie Moleculaire et Medecine. Delpeche M. Paris. 170-180 pag

Kitani, H. 1991. Relative growth of Penaeid postlarvae as a useful tool for identification. Nippon Suisan Gakkaishi 58(12): 2211-2217.

Kitani, H. 1993. Morphology of postlarvae of the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. Nippon Suisan Gakkaishi 59 (2): 223-227.

Kitani, H. 1993. Morphology of postlarvae of the yellowleg shrimp *Penaeus californensis*. Nippon Suisan Gakkaishi 58(12): 2211-2217.

Kitaura, J., G. Yamamoto, y M. Nishida. 1998. Genetic variation in populations of the Diamond-shaped squid *Thysanoteuthis rhombus* as examined by mitochondrial DNA sequence analisis. Fisheries Sci. 64(4): 538-542.

Klein, B., D. Sellos y A. VanWormhoudt. 1998. Genomic organization and polymorphism of a Crustacean trypsin multi-gene family. Gene 216: 123-129.

Klinbunga, S., D., Penman y B. McAndrew. 1998. A preliminary study of ribosomal DNA polymorphism in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Mar. Biotechnol. 6:186-188.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Labacena, M E., M. Torres y G. Espinosa. 1994. Variabilidad y distancia genética en especies de *Penaeus*. Revista de Investigaciones Marinas 80-87 pp

Lawrence, A 1991. Comparison of morphological and molecular phylogeny of the Decapoda. Memorias Queensland Museum 31:101-108.

Lawrence, G. 1982. The biology of Crustacea. Vol 1. Systematics, the fossil record and biogeography. Vol. 2 Embryology, morphology and genetics. Academic Press. New York. 319 pp.

Lessa, E y G., Applebaum. 1993. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. Molec Ecol. 2:119-129

Lester, L. 1979. Population genetics of penaeid shrimp from the gulf of Mexico. J. Hered (70): 175-180.

Lester, L. y M. Pante. 1992. Genetics of *Penaeus* species. In: Marine shrimp culture. Principles and practices. Arlo W. Fast & L. James Editors.

Lewontin, R. 1966. On the measurement of relative variability. Syst. Zool. 15: 131-142

Looney, W. y B., Stanley. 1989. Exploratory repeated measures analysis for two or more groups. The American Statistician 43 (4): 220-225.

Machado, E. 1993. Mitochondrial 16S-rRNA gene of two species of shrimps: sequence variability and secondary structure. Crust. 65 (3): 279-286.

Machado, E. 1996. Partial sequence of the shrimp *Penaeus notialis* mitochondrial genome. Sciences de la vie. C. R. Acad. Sci. Paris. 86: 319-473.



- Machado, E. 1997. Génome mitochondrial de la crevette *Litopenaeus setiferus*. Reflexion sur la phylogénie des Arthropodes. Thèse Docteur en Sciences de l'Université Paris XI Orsay. Francia. 200 pp
- Maniatis, T., Fritsch, E. y J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 545 pp
- Marcus, L. Bello y A. Valdecasas. 1993. Contributions to morphometrics Museo Nat. de Ciencias Naturales. CSLC. 264 pp
- Martínez, R. 1993. Camaronicultura. Bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones Peneidos. 1ª. Ed. AGT Editor. México. 233 pp
- McKay, S., R., Delvin y M. Smith. 1996. Phylogeny of Pacific salmon and trout based on growth hormone type-2 and mitochondrial NADH deshydrogenase subunit 3 DNA sequences. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53: 1165-1176.
- Media Cybernetics. 1994. Image-Pro Plus V.I.I. Windows. Silver Spring, MD. New York.
- Mitton, J. B. y M. C. Grant. 1984. Associations among protein heterozygosity growth rate, and developmental homeostasis. Annu. Rev. Ecol. Syst. 15: 479-499.
- Moira, M. y R. Danzmann. 1998. Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting Can. J. Fish. Aquat. Sci. 55: 1553-1563.
- Molvary, M., Kores, P. y S. Darwin. 1993. Inexpensive digital data acquisition for morphometric study. Taxon (42): 393-397.

Morán, P., D. Dightman, R., Waples y L., Park . 1997. PCR-RFLP analysis reveals substantial population-level variation in the Pacific salmon *Oncorhynchus ssp.* Molec. Mar. Biol. and Biotech. 6 (4). 315-327.

Morelock, J. y W. Bryant. 1971. Campeche canyon sediments Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente 10 (2). 35-38

Mulley, J. C. y B. D., Latter. 1981. Genetic variation and evolutionary relationship within a group of certain species of penaeid prawns. Evol. 34 (5): 904-916.

Palumbi, S., y J., Benzie. 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. Molec. Mar. Biol. and Biotech. 1 (1). 27-34.

Pérez-Enriquez, R. y N. Taniguchi. 1999. Genetic structure of red sea bream *Pargus major* population off Japan and the Southwest Pacific, using microsatellite DNA markers Fisheries Sci. 65 (1): 23-30

Perrotta, R., A. Aubone y F. Sánchez. 1990. Estudio comparado de los caracteres morfométricos y merísticos de la caballa (*Scomber japonicus* Houttuyn 1782) del sur de Brasil y del área marplatense (Mar Argentino). Sci. Mar. 54 (1): 47-53.

Pielou, C. 1984. The interpretation of ecological data. Wiley-Interscience. New York. 263 pp

Primavera, J., Prado, F. y L. Leбата. 1998. Morphometric relationship of length and weight of gigant tige: prawn *Penaeus monodon* according to life stage, sex and source. Aquac. (164): 67-75.

- Regier, J. y J., Shults. 1997. Molecular phylogeny of the mayor Arthropod groups indicates polyphyly of crustaceans and a new hypothesis of origin of hexapods. Mol. Biol. Evol. 14(9): 902-913.
- Rigaa, A., D., Cellos y M. Monnerot. 1997. Mitochondrial DNA from scallop *Pecten maximus*: an unusual polymorphism detected by restriction fragment length polymorphism analysis. Heredity 79: 380-387.
- Ritvo, G., Samocha, T., Lawrence, A. y W., Neill. 1998. Growth of *Penaeus vannamei* on soil<sup>18</sup> from various Texas shrimp farms, under laboratory conditions. Aquac. 163: 101-110.
- Rodríguez, J., Morenza, M., y A. Pérez. 1982. Relaciones largo-edad en unidades pesqueras de camarón rosado y blanco del área de Manzanillo. Rev. Cub. Inv. Pesq 7 (2): 78-95.
- Rohlf, J., y L., Marcus. 1993. A revolution in morphometrics. TREE. 8 (4): 129-132.
- Silberman, D., S., Sarver y P. Walsh. 1994. Mitochondrial DNA variation and population structure in the spiny lobster *Panulirus argus*. Mar. Biol. (120): 601-608.
- Somers, K. 1986. Multivariate allometry and removal of size with principal components analysis. Syst. Zool. 35(3): 359-368
- Sunden, S. y S. Davis. 1991. Evaluation of genetic variation in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone). A comparison with three natural populations. Aquac. (97): 131-142.
- Tassanakajon, A., P., Jarayabhand y V. Boonsaeng. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn *Penaeus monodon* in Thailand. Molec. Mar. Biol. and Biotech. 6 (2): 110-115.

Thorpe, R. 1976. Biometric analysis of geographic variation and racial affinities. Biol. Rev. (51): 407-452

Thorpe, R. 1987. Geographic variation: a synthesis of cause, data, pattern and congruence in relation to subspecies, multivariate analysis and phylogenesis. Bull. Zool. 54: 3-11

Yáñez, A. y J., Day. 1982. Ecological characterization of Terminos Lagoon, a tropical lagoon-estuarine system in the Southern Gulf of Mexico. Oceanologic Act. No. Esp. 431-440

Yáñez, A., y P. Sánchez 1983. Environmental behavior of Campeche sound ecological system of Terminos Lagoon Mexico: Preliminary results. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. 10 (1): 117-136.

Yáñez, A., Lara, L., Chavance, P. y D. Hernández. 1983. Environmental behavior of Terminos Ecological system, Campeche, Mexico. An. Inst. Cienc. Del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. 10 (1):137-176.

Yeserinac, S., Loughed, D. y P. Handford. 1992. Measurement error and morphometric studies: statistical power and observer experience. Sys. Biol. 41(4): 471-482.

Van Whormhoudt, A., Boureau, G. y G. LeMoullac. 1995. Amylase polymorphism in Crustacea Decapoda: electrophoretic and immunological studies. Bioch. Syst. and Ecol. 2(23):139-149.

Van Whormhoudt, A., y D., Sellos. 1996. Cloning and sequencing analysis of three Amylase cDNAs in the shrimp *Penaeus vannamei* Crustacea Decapoda: Evolutionary aspects. J. Marine. Evol. 42: 543-551.

Yokoyama, S. 1998. Morphometric analysis and Tagging experiments for stock discrimination of Cresthead flounder *Pleuronectes schreniki* around Hokkaido. Fisheries Sci. 64(3). 373-378.

Zar, H. 1996. Bioestatistical Analysis. Prentice Hall. New Jersey. 662 pp

## IV Apéndices

### APÉNDICE 1

#### Aislamiento del ADN

#### Protocolo utilizando CTAB

- a) Homogeneizar una muestra de 10 mg de tejido en 600  $\mu$ l de tampon CTAB,
- b) Adicionar 20  $\mu$ l de de proteinasa K (10mg/ml),
- c) Incubar al menos 30 min a 60°C.
  
- d) Adicionar 630  $\mu$ l de cloroformo alcohol isoamídico (96/4)
- e) Agitar durante 2 min
- f) Centrifugar 10 a 15000 g
- g) Recuperar la fase acuosa  
(se repite dos veces del inciso d al g)
  
- h) Adicionar 2 volúmenes de etanol 100 % mas AcNa 3M (30  $\mu$ l por 600  $\mu$ l de etanol)
- i) Agitar 2 min
- j) Centrifugar 10 min a 15000g
- k) Secar la alicuota y se resuspende en 25  $\mu$ l de TE 0.1x

#### Tampon CTAB

Tris Hcl pH 8 100 mM

EDTA pH 8 20 mM

NaCl 1.4 M

CTAB 2%

$\beta$  mercaptoetanol 0.2 %

TE pH 8.0

10 mM Tris Cl (pH 8)

1 mM EDTA (pH 8)

## APÉNDICE 2

### PCR

Protocolo de amplificación utilizado

Componente	Volumen ( $\mu$ l)	
H <sub>2</sub> O	16	
dNTP	2	
Oligo 1	2	
Oligo 2	2	
ADN	3	(siempre en concentración de 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)
Mg	1	
Tampon 10x	5	
H <sub>2</sub> O	18.5	
Taq I	0.5	(EuroTaq II de <i>Eurobio</i> )

Para la amplificación se utilizó un termociclador Appligene Crocodile II.

El programa utilizado para la amplificación de CO y 16 S fue:

94°C 1'30  
 48°C 1'30 (esta temperatura difiere para cada fragmento y cada especie)  
 72°C 5'  
 40 ciclos  
 94°C 1'30  
 48°C 1'30  
 72°C 10'  
 1 ciclo

En el caso de la amilasa el programa protocolo utilizado fue el de Taq Expand Boehringer que se detalla enseguida:

94°C 2'  
 1 ciclo  
 94°C 15''  
 58°C 30''  
 68°C 5'  
 10 ciclos  
 94°C 15''  
 58°C 30''  
 68°C 60'  
 8 ciclos

94°C 15''  
 58°C 30''  
 68°C 70''  
     8 ciclos  
 94°C 15''  
 58°C 30''  
 68°C 8'  
     8 ciclos  
 94°C 15''  
 58°C 30''  
 68°C 10'  
     8 ciclos

### **Precipitación**

El producto de la PCR es precipitado adicionando 5 µl de AcNa 5M, pH 8; y 150 µl de alcohol 100%, se agita y se incuba al menos por 30 min a -20 °C, se centrifuga durante 10 min, se recupera con cuidado el precipitado y se lava tres veces con alcohol 75%, se seca completamente y se resuspende en TE.

### **Electroforesis en geles de agarosa 1.2%**

Gel (para 100ml)  
 1.2 gr de Agarosa  
 2 ml de Tampon TAE 50x  
 3 µl de Bromuro de Etidio

Tampon TAE 50x (para 1 litro)  
 242 gr de Tris  
 57.1 ml de Acido Acético  
 100 ml de EDTA 0.5M a pH 8

El tampon para la electroforesis  
 980 ml de H<sub>2</sub>O  
 20 ml de TAE 50x  
 30 µl de Bromuro de Etidio



## Marcadores

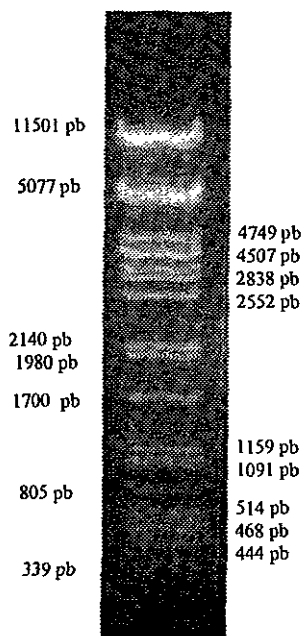
### Marcador Pst 1

Para preparar el marcador se digiere con la enzima de restricción Pst 1 una muestra de ADN del fago Lambda.

50  $\mu\text{g}$  de ADN  
 20  $\mu\text{l}$  de tampon H 10x (Promega)  
 20  $\mu\text{l}$  de enzima Pst 1 (Promega)  
 2 hrs a 37°C  
 150  $\mu\text{l}$  de glicerol  
 150  $\mu\text{l}$  TE  
 100  $\mu\text{l}$  de solución colorante (Maniatis, 1982)

Para tener una solución final en una concentración de 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

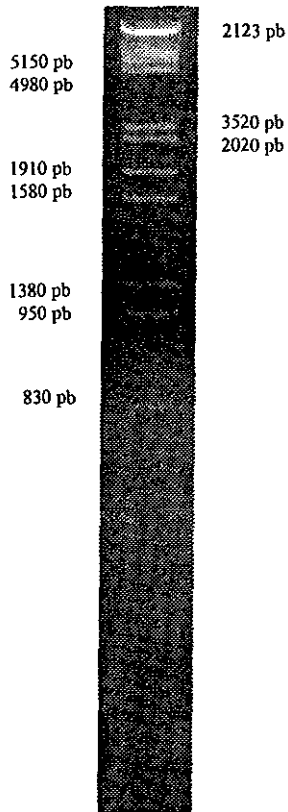
Talla de los fragmentos (pares de bases)



El marcador,  $\lambda$ / Hind III

Este marcador tiene una doble digestión con EcoR I

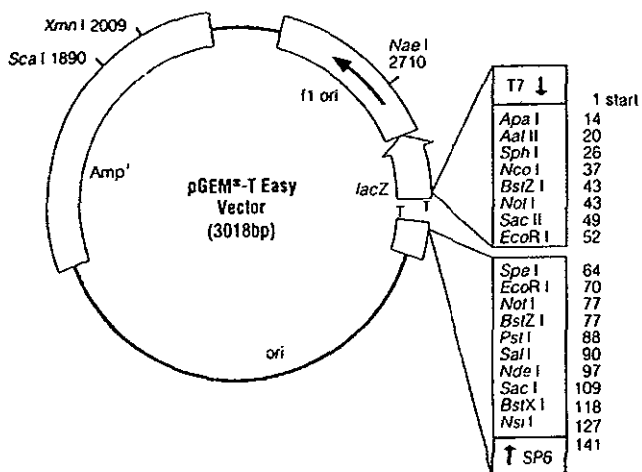
Talla de los fragmentos (pares de bases)



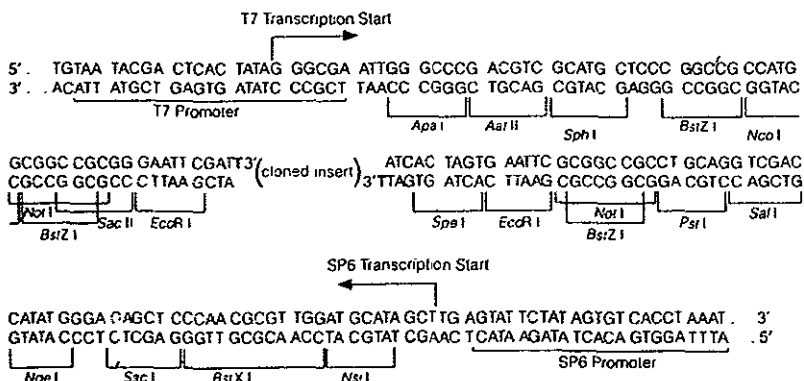
## APÉNDICE 3

### Clonación

Se utilizó el sistema de vectores pGEM-T Easy, como método para clonar los productos de la PCR.



Mapa circular del Vector.



El promotor y la secuencia del vector pGEM-Easy.

### Recuperación del ADN Plasmídico

Las colonias se incuban en 3.5 ml de SOB en un medio con antibiótico (ampicilina. 100  $\mu$ g/ml) durante toda la noche a 37 °C, se centrifuga para recuperar las alicuotas, las cuales son resuspendidas en 200  $\mu$ l de STET, se adicionan 50  $\mu$ l de lisozimas (10 mg/ml de STET). Después de dos minutos en agua hirviendo se recupera el sobrenadante que se precipita con 350  $\mu$ l de isopropanol y se lava la alicuota tres veces con etanol 75%, después de secar la alicuota se resuspende en 100  $\mu$ l de agua.

Para liberar el fragmento de ADN del plásmido se hace una digestión de 20  $\mu$ l de la extracción utilizando dos enzimas, 1  $\mu$  de EcoR I  $\mu$  en presencia de 2  $\mu$ l de RNasa y del tampon correspondiente (Promega). La digestión se interrumpe con 7  $\mu$ l de solución colorante, se hace un gel control en un gel de agarosa 1% con un tampon de TEA (Maniatis, 1982).

### Secuenciación

El método comienza con la desnaturalización del ADN con NaOH, las muestras se incuban a 37 °C, después el ADN es naturalizado con NaCl.

En una segunda etapa el " primer " se fija a la muestra durante 10 min a 37 °C. Los oligos marcados son incorporados sobre la hebra de ADN adicionando <sup>35</sup>S-dATP en presencia de DTT, de dNTP y de la ADN polimerasa.

En una última fase en cuatro tubos diferentes, la concentración de cada desoxinucleótido es aumentada y un didesoxinucleótido trifosfato es adicionado. La síntesis de ADN continua hasta que todos los fragmentos son terminados por un didesoxinucleótido (que no contiene el grupo 3' hidroxilado lo cual impide la elongación), entonces se obtienen los fragmentos de diferente talla en cada tubo.

La reacción se detiene adicionando EDTA y formamida; se desnaturaliza con 75 °C y se depositan las muestras sobre un gel de acrilamida (5%) urea de 0.4 mm de espesor, 320 x 400 mm (anexo 1), posteriormente al corrimiento el gel es fijado con ácido acético (7%)-etanol (20%), se lava con 200 ml de etanol al 20%; y se deja secar (SLAB gel Dryer, modelo SE 1160, Hoeffe Scientific instruments) durante una hora, las secuencias se leen por autoradiografía

## APÉNDICE 4

### RFLPs

El protocolo de digestión seguido fue el siguiente:

Componente	Volumen ( $\mu$ l)
ADN	5
H <sub>2</sub> O	8.3
Tampon	1.5
Enzima	2 unidades

Las muestras se incubaron durante dos horas en el caso de Alu I y Rsa I a 37 °C y para Taq I a 65 °C.

La reacción se detiene adicionando 5  $\mu$ l de azul.

El gel agarosa 2% para la electroforésis es el mismo que se utilizó en la PCR solo que se adicionan 2 gr de agarosa.

## APÉNDICE 5

El programa de PCR para amplificar el gen de la amilasa se realizó a 56°C por 35 ciclos. Las cantidades de reactivos y muestras siguen el mismo protocolo antes descrito en el anexo 2. Los oligos utilizados fueron:

PV17

5'TCAACACGGATTTCTTCAAGGC3'

PV20R

5'ATG GCT TCG CCA CCT ATG AAT3'

Para el marcaje con la sonda

Componente	Volumen (μl)
sonda	6 (60 pmoles)
Tampon 10x	2
ATP	10
PNK	2

Las muestras se corrieron en un gel de secuencia (ya se ha descrito las características en el anexo 3), se utilizó como marcador la secuencia de la Glucosidasa 12R.