

ESTIMACION DE LA VARIABILIDAD GENETICA EN UNA POBLACION
NATURAL Y UNA CAUTIVA DEL CAMARON BLANCO (*Penaeus vannamei*) DE
LA REGION DE TUMACO MEDIANTE LA TECNICA DE ELECTROFORESIS DE
ALOENZIMAS MULTILOCUS

FLOR JOHANA DELGADO CHACON
NANCY ADRIANA REYES SOLARTE

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
PROGRAMA DE QUIMICA
SAN JUAN DE PASTO
2006

ESTIMACION DE LA VARIABILIDAD GENETICA EN UNA POBLACION
NATURAL Y UNA CAUTIVA DEL CAMARON BLANCO (*Penaeus vannamei*) DE
LA REGION DE TUMACO MEDIANTE LA TECNICA DE ELECTROFORESIS DE
ALOENZIMAS MULTILOCUS

FLOR JOHANA DELGADO CHACON
NANCY ADRIANA REYES SOLARTE

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial
para optar el título de Químico

Director

Msc. JESUS ADRIANO ROMO RAMOS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
PROGRAMA DE QUIMICA
SAN JUAN DE PASTO
2006

Nota de aceptación

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, 14 marzo 2006

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”

“Artículo 1 del acuerdo No. 234 de Octubre 11 de 1966, emanada por el honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño”

AGRADECIMIENTOS

A Dios por el don de la vida.

A mis padres y hermanos por sus sacrificios y apoyo constante.
Johana Delgado

A mis padres, Jesús y Herminia y a mis hermanos Claudia y Jesús por confiar en mi y darme la oportunidad de ser una profesional.
Nancy Reyes

Al Msc. Jesús Adriano Romo Ramos por su trabajo como director de esta investigación.

A los profesores Alvaro Burgos y Eliana Oviedo por su colaboración como jurados de nuestro trabajo de investigación.

A los profesores y laboratoristas del Departamento de Química de la Universidad de Nariño por su colaboración.

A Jaime Gutiérrez y Rodolfo Rendón por su colaboración en la etapa de muestreo.

A todos nuestros compañeros y especialmente a Elkin Belalcazar por su apoyo y acertados consejos en el desarrollo de esta investigación.

DEDICATORIA

A Jorge Chacón por ser mi mayor motivación para llegar a ser una profesional.

A mi padre, Hernando por su apoyo.

A mi madre por ser mi mejor amiga.

A mis hermanos, Edwin y Jesica por estar conmigo en todo momento.

Y a mis familiares por confiar en mi.

Johana Delgado

A mis padres, Herminia Solarte y Jesús Reyes por su apoyo integral y por todos sus sacrificios.

A mis hermanos Jesús David y Claudia Alicia por su compañía.

Y a mi bebé y a su padre por formar parte importante de mi vida.

Nancy Reyes.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION	19
1. OBJETIVOS	21
1.1. OBJETIVO GENERAL	21
1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
2. ANTECEDENTES	22
3. MARCO TEORICO	24
3.1. Características del camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> .	24
3.2. Camarón de cultivo	25
3.3. Camaronicultura en Colombia	26
3.4. Bases genéticas de la acuicultura	27
3.5. Genética de poblaciones	27
3.6. Variabilidad genética	28
3.7. Marcadores genéticos	31
3.8. Aloenzimas	32
3.9. Electroforesis de aloenzimas	32
4. METODOLOGIA	35
4.1. Muestreo	35
4.1.1. Población natural	36
4.1.2. Población de cultivo	36
4.1.3. Descripción del sitio de muestreo	36

4.2. Análisis morfométrico	36
4.3. Electroforesis de proteínas	36
4.3.1. Preparación del material biológico	36
4.3.2. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida	37
4.3.3. Corrida electroforética	39
4.3.4. Condiciones de corrida	40
4.4. Teñido	41
4.4.1. Proteínas totales	41
4.4.2. Amilasa	41
4.4.3. Peroxidasa	41
4.4.4. Glutamato Deshidrogenasa	42
4.4.4. Lactato Deshidrogenasa	42
4.4.5. Aspartato Deshidrogenasa	43
4.5. Lectura de Geles	44
4.6. Estimación de los parámetros genéticos	44
4.6.1. Número promedio de alelos por locus (A)	44
4.6.2. Frecuencias alélicas de aloenzimas para cada loci-polimorfo por población.	44
4.6.3. Los valores de heterocigosidad esperada ($H_{exp.}$) y corregida ($H_{n.b.}$).	44
4.6.4. El estadístico índice de fijación de Wright según adecuación Weir y Cockerhan	45
4.6.5. Distancia genética de Nei (1978)	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
5.1. Análisis morfométrico	46

5.2. Electroforesis de proteínas	47
5.2.1. Aspectos importantes en el desarrollo de la técnica MLEE	47
5.2.2. Movilidades electroforéticas de los sistemas enzimáticos	48
5.2.2.1. Proteínas Totales (Pt-1 y Pt-2)	48
5.2.2.2. Amilasa (Ami-1 y Ami-2)	48
5.2.2.3. Peroxidasa	48
5.2.2.4. Glutamato Deshidrogenasa	49
5.2.2.5. Lactato Deshidrogenasa (Ldh-1 y Ldh-2)	49
5.2.2.6. Aspartato Deshidrogenasa	50
5.3. Estimación de parámetros genéticos	50
5.3.1. Variabilidad genética	50
5.3.2. Diversidad genética dentro y entre poblaciones	51
5.3.2.1. Frecuencias alélicas	51
5.3.2.2. Polimorfismo o tasa de polimorfismo Pj	53
5.3.2.3. Heterocigocidad Esperada	54
5.3.2.4. El estadístico índice de fijación de Wright	55
5.3.2.5. Distancias genéticas de Nei	56
6. CONCLUSIONES	58
7. RECOMENDACIONES	59
BIBLIOGRAFIA	60
ANEXOS	65

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Sistemas loci-enzimaticos a estudiar en los diferentes tejidos del camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	37
Tabla 2. Volúmenes para la preparación del gel separador a diferente porcentaje de dureza.	38
Tabla 3. Volúmenes para la preparación del gel concentrador al 5% de acrilamida.	38
Tabla 4. Volúmenes empleados para la aplicación de muestra en cada sistema enzimático	40
Tabla 5. Promedios de peso y talla de las muestras de <i>Penaeus vannamei</i>	46
Tabla 7. Frecuencias alélicas y Heterocigosidades esperadas bajo la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg ($H_{exp.}$) y heterocigosidades corregidas para la inclinación de muestreo ($H_{n.b}$) por locus para la población natural.	51
Tabla 8. Frecuencias alélicas y Heterocigosidades esperadas bajo la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg ($H_{exp.}$) y heterocigosidades corregidas para la inclinación de muestreo ($H_{n.b}$) por locus para la población de cultivo.	52
Tabla 9. Valores de variabilidad genética de las dos poblaciones estudiadas en <i>Penaeus vannamei</i> .	55
Tabla 10. Índice estadístico de fijación de Wright para cada locus en <i>Penaeus vannamei</i> .	56

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1. Camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	24
Figura 2. Ubicación geográfica de la zona de muestreo de la población natural y de cultivo del camarón <i>Penaeus vannamei</i> .	35
Figura 3. Diagrama de preparación de los geles de poliacrilamida	39
Figura 4. Cámara electroforética SE 250 Mighty Small II de la Universidad de Nariño	39
Figura 5. Diagrama la metodología llevada a cabo en la Electroforesis de aloenzimas Multilocus	43
Figura 6. Actividad enzimática de las proteínas totales en músculo de <i>Penaeus vannamei</i> en geles de poliacrilamida	48
Figura 7. Actividad enzimática de Amilasa en hepatopancreas y ojos de <i>Penaeus vannamei</i> en geles de poliacrilamida.	48
Figura 8. Actividad enzimática de Peroxidasa en hepatopancreas y ojos de <i>Penaeus vannamei</i> en geles de poliacrilamida.	49
Figura 9. Actividad enzimática de GDH en músculo de <i>Penaeus vannamei</i> en geles de poliacrilamida	49
Figura 10. Actividad enzimática de LDH en músculo de <i>Penaeus vannamei</i> en geles de poliacrilamida	49
Figura 11. Actividad enzimática de ASD en músculo de <i>Penaeus vannamei</i> en geles de poliacrilamida	50

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Tinción de proteínas totales	41
Esquema 2. Tinción de Amilasa	42
Esquema 3. Tinción de Peroxidasa	42
Esquema 4. Tinción de GDH	42
Esquema 5. Tinción de LDH	42
Esquema 6. Tinción de ASD	43
Esquema 7. Número total de alelos por locus para las poblaciones	50

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo A. Peso y talla de las muestras de camarones de la población natural	65
Anexo B. Peso y talla de las muestras de camarón de la población de cultivo	66
Anexo C. Matriz de Alelos para la población natural	67
Anexo D. Matriz de Alelos para la población de cultivo	68

ABREVIATURAS

A. Número promedio de alelos por locus.
ADN. Ácido desoxiribonucleico
Ami. Amilasa
ASD. Aspartato deshidrogenasa
Fis. Deficiencia o el exceso de heterocigotos promedio en cada población.
Fst. Grado de diferenciación génica entre poblaciones en función de las frecuencias alélicas.
Fit. Deficiencia o el exceso de heterocigotos promedio en un grupo de poblaciones.
GDH. Glutamato Deshidrogenasa
Hexp. Heterocigosidad esperada bajo la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg
Hn.b. Heterocigosidad corregida para la inclinación de muestreo.
IQF. Ultracongelación individual
ISSRs. Inter-secuencias repetitivas simples
LDH. Lactato deshidrogenasa
mA. Miliamperios
MLEE. Electroforesis de Aloenzimas Multilocus
MTT. Dimetiltiazol tetrazolio
NAD. α -nicotinamida adenina dinucleotido
PA. Persulfato de amonio
PAGE. Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR. Reacción en cadena de la polimerasa
Per. Peroxidasa
Pj. Polimorfismo o tasa de polimorfismo
PMS. Metosulfato de fenazina
Pt. Proteínas totales
RAPD. Amplificación al azar de ADN polimorfico
RFLP. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
TEMED. N,N,N',N',- tetrametiletilendiamina
V. Voltaje

RESUMEN

Se estudió la variación genética de una poblaciones natural y una de cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei* de la región de Tumaco mediante la técnica de Electroforesis de aloenzimas Multilocus MLEE. Este análisis mostró que las dos poblaciones poseen una alta variación genética. Los resultados muestran un valor de heterocigosidad de 0.1951 para la población natural y 0.1761 para la de cultivo considerando los seis sistemas enzimáticos analizados. El polimorfismo es del 24 y 21% para las dos poblaciones respectivamente, semejante a los reportados para esta especie.

El valor de F_{st} de 0.06739 presentó diferencias significativas, lo que indica que no existe un flujo génico importante entre ambas poblaciones comparadas por tanto hay una diferenciación genética considerable entre las poblaciones.

Los valores de diversidad genética de Nei (G_{st}) fueron de 0,036 para la población natural y 0.0349 para la de cultivo indicando que el proceso de domesticación ha modificado la estructura genética de la población de cultivo. El valor de la Distancia genética de Nei $D = 0.1476$, demuestra diferencias significativas entre las dos poblaciones.

ABSTRACT

We study the in one natural population and one of white shrimp *Penaeus vannamei* in región of Tumaco through technique Electrophoresis of proteins MLEE. This analysis show that both populations have high. The results show heterozygosity from 0.1951 for natural population and 0.1761 for captive population considering the six enzymetic systems analized. The polymorphism is 24 y 21 % for both populations respectively, similar to those reported for this kind.

The F_{st} value from 0.06739 show significative differences, what indicates that it does not exists genetic flow important between both populations compared for so much there is a genetic variability considerable between the populations.

The Nei genetic variability values (G_{st}) were from 0.036 for natural population and 0.0349 for captive population indicating that the process of domestication has modified the genetic structure from captive population. The Nei genetic distance value $D = 0.1476$ demonstrate significative differences between both populations.

GLOSARIO

ALOENZIMAS: Isoenzimas producto de diferentes alelos en el mismo locus. Isoenzimas son formas separables de aloenzimas pero funcionalmente similares codificadas por uno o más loci.

DIVERSIDAD GENÉTICA: es la variación de los genes dentro de la especie, e decir es la mezcla de genes contenidos dentro de los individuos.

GEN-ALELO: es la unidad básica, tanto física como funcional de la herencia y transmite información de una generación a la siguiente – Alelo, cualquiera de las formas alterna de un gen que puede existir en un locus específico.

FRECUENCIA ALELICA: es el concepto utilizado para cuantificar la variabilidad genética, se define como una medida de la presencia de un alelo dado en una población.

FLUJO GENICO: es el paso y establecimiento des los genes característicos de una población en el acervo genético de otra mediante la hibridación y el retrocruzamiento naturales o artificiales.

ELECTROFORESIS: La electroforesis es la migración a distinta velocidad, de moléculas cargadas en solución debido a la aplicación de un campo eléctrico.

FENOTIPO: descripción de todos los caracteres de un individuo respecto a su morfología, fisiología, relaciones ecológicas y comportamiento.

GENÉTICA DE POBLACIONES: cuantificación de la variabilidad mediante la descripción de los cambios en al frecuencia alélica, a través del tiempo, respecto a un carácter en particular.

GENOTIPO: es la descripción del conjunto de genes que hereda un individuo de sus progenitores.

LOCUS: posición que ocupan los genes a lo largo del cromosoma en orden lineal.

MARCADORES GENETICOS: caracteres hereditarios que permiten diferenciar a un individuo de otro.

POBLACIÓN: grupo de individuos que comparten un acervo genético común y tiene la posibilidad de aparearse.

INTRODUCCION

El sector camaronero ha tenido un desarrollo alto durante los últimos 20 años a nivel mundial. Como resultado de esto, países como Tailandia, Indonesia, Vietnam, China, India, Ecuador, México, Colombia, Perú y Panamá han reforzado su producción camaronera tanto para consumo interno como para exportación.

La acuicultura representa uno de los sectores de mayor crecimiento de la economía actual. La captura de lotes silvestres en muchas especies acuáticas, incluyendo los camarones peneidos, está por encima de los máximos rendimientos sostenibles¹. Actualmente existen trabajos en los que se hace selección para el aumento de caracteres importantes como tasa de crecimiento o resistencia a enfermedades en los camarones peneidos, especialmente en las especies *Penaeus vannamei* y *P. stylirostris*.

El desarrollo de la camaronicultura ha dado lugar a nuevas problemáticas: como la aparición de nuevas enfermedades, incluyendo el “virus de mancha blanca y amarilla”, que en *Penaeus vannamei* causó mortalidades superiores al 70%², la necesidad de alcanzar mayores rendimientos con una menor impacto sobre los recursos naturales, la reducción de las poblaciones silvestres por la sobreexplotación y la destrucción de los hábitats naturales, los cuales han demostrado la vulnerabilidad de esta industria. Por tanto la necesidad y oportunidad para el mejoramiento genético para estas especies son enormes.

En la Costa Pacífica Colombiana se han encontrado varias especies del camarón marino del género *Penaeus* como el *P. stylirostris*, *P. vannamei*, *P. occidentalis*, *P. californiense*, siendo la especie *P. vannamei* la que presenta mejores características de manejo en los procesos de cultivo en cautiverio³. Esta especie es muy apreciada por los acuicultores dadas sus excelentes condiciones de crecimiento y supervivencia y además por su valor en el mercado.

La región de Tumaco es muy rica en estas especies de camarones, de los cuales no se tienen datos sobre su variabilidad genética. Considerando los anteriores aspectos se plantea obtener un conocimiento inexistente hasta la fecha sobre estimación de parámetros genéticos, para el camarón *Penaeus vannamei* en la región de Tumaco, para lo cual se utilizará la Técnica de Electroforesis de Aloenzimas Multilocus ya que ésta ha sido muy utilizada en estudios de caracterización y variabilidad genética de muchas especies animales y vegetales

¹ ALONSO, B.M., JOO, L. Y ESPINOSA, G. Análisis Electroforético y caracterización bioquímica de las esterasas del músculo en *Penaeus notialis* y *Penaeus schmitti*. 1987, 21, 74.

² LIGHTNER, D. V. Disease of cultured penaid shrimp. In Crustacean Acuaculture . Boca Ratón, Florida. 1992, 289, 540.

³ DAVIS, D.J. Electroforesis parte II. Ann N. Y. Academia Sci 121. 1964, 402, 687.

en los que se ha logrado muy buenos resultados; además sigue siendo una técnica muy importante en estos estudios principalmente por su rapidez y bajo costo, no requiere un equipo sofisticado, es un procedimiento rápido para desarrollar en gran escala y en un gran número de loci diferentes dispersos en todo el genoma y que pueden ser teñidos simultáneamente.⁴

En esta investigación se encontró que existe una alta variación genética en las dos poblaciones y que existe un polimorfismo del 100% debido a que sólo se tuvo en cuenta los loci polimorficos por tanto entre las dos poblaciones no hay diferencias en cuanto a la diversidad genética.

Entre las dos poblaciones no existe un flujo génico importante y son dos grupos poblacionales totalmente diferentes debido a su ubicación geográfica, a sus condiciones y a la barrera física existente entre ellas.

⁴ WARD, R Y GREWE, P. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. Molecular Genetics in Fisheries. Chapman and Hall, edits. London. 1995, 29, 346.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Estimar la variabilidad genética de una población natural y una cautiva del camarón blanco *Penaeus vannamei* de la región de Tumaco mediante la Técnica de Electroforesis de Aloenzimas Multilocus (MLEE).

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Realizar un análisis morfométrico comparativo de las poblaciones muestreadas para determinar sus características específicas.

Estandarizar la Técnica de Electroforesis de Aloenzimas Multilocus con geles de poliacrilamida para la especie *Penaeus vannamei*.

Determinar mediante la técnica MLEE los parámetros genéticos como número de alelos por locus, frecuencias alélicas, heterocigosidad, índice de Wright y distancia genética de Nei; en dos poblaciones de camarón blanco *Penaeus vannamei*, una procedente de un sitio natural y otra de un sitio de cultivo.

Determinar el polimorfismo presente en las poblaciones: natural y de cautiverio del camarón blanco *Penaeus vannamei* teniendo en cuenta los diferentes sistemas enzimáticos a estudiar.

Realizar un estudio comparativo de la variabilidad genética entre dos poblaciones: natural y cautiva, del camarón blanco *Penaeus vannamei*, utilizando aloenzimas como marcadores

2. ANTECEDENTES

La electroforesis de proteínas se ha utilizado mucho en estudios de caracterización de variabilidad genética de muchas especies animales^{5,6} y vegetales, dando buenos resultados, sobre todo en la identificación de variantes como marcadores del genoma⁷.

Avise⁸ y Queller⁹, utilizaron la electroforesis de proteínas en estudios intraespecíficos de poblaciones y de especies estrechamente relacionadas.

Richardson, et al¹⁰, utilizaron esta técnica para determinar si los individuos de una muestra son sacados de una gran población apareada al azar con frecuencias genotípicas en equilibrio, o si comprende una reunión de muestras de unidades distintas genéticamente.

Algunos estudios realizados en poblaciones de camarón han mostrado resultados discrepantes en cuanto a variabilidad y diferenciación genética. Una buena cantidad de trabajos se basan en la técnica de isoenzimas en los cuales se ha observado en general bajos niveles de variación genética. Dentro de las especies estudiadas se encuentran: *Farfantepenaeus aztecus*¹¹, *Fenneropenaeus chinensis*¹², *Farfantepenaeus duorarum*¹³, *Penaeus monodon*¹⁴, *Fenneropenaeus merguensis*, *Litopenaeus schmitti*¹⁵, *Penaeus vannamei*¹⁶, *Farfantepenaeus californiensis*¹⁷, *P. stylirostris*.

⁵ LESTER, L.J. Population genetics of Peneids shrimps from de Gulf of México. J. Hered. 1979, 175, 480.

⁶ GARCIA, D.K., FAGAR, M.A., RHOADES, L. y ALCÍVAR-WARREN A. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. 1994, 270, 349.

⁷ KING, J.D Y OHTA, T.H. Polyallelic mutational equilibrium. Genetics. 1975, 79, 215

⁸ AVISE, J.C. Molecular Markers, natural history and evolution. 1994, 109, 214.

⁹ QUELLER, D.C., STRASSMAN J.E. y HUGHES C.R. Microsatellites and kinship. Elsevier Science publishers. Ltda. 1993, 21, 54.

¹⁰ RICHARDSON, B.U., BAVERSTOCK, P.R. Y ADAMS, M. A handbook for animal systematics and population studies. Academic Press. New York. 1986, 87, 258.

¹¹ LESTER, L.J. Op. Cit., p.34

¹² TAM, Y.K, Y CHU, K.H. Eletrophoretic study on the phylogenetic relation shirimps of some species of *Penaeus* and *metaPenaeus* from the south China sea. Journal crustacea biology. 1993, 697,705.

¹³ LESTER, L.J Y PANTE M.J. Genetcs of *Penaeus* species. 1992, 29, 152.

¹⁴ MULLER, J.C Y LATER, B.D. Genetic variation and evolutionary relation shrimps within a group of thirty species of *Penaeid* prawns. 1980, 904, 1916.

¹⁵ ESPINOSA, G.U., BECKER, U., BORELL, Y., ROMO, J., DIAZ, R., AZANZA, J. Y DE DIOS, R. Variación genética y morfológica en poblaciones naturales y cautivas de camarón blanco *Litopenaeus schimitti* en Cuba. 2002, 778, 984.

¹⁶ LESTER, L.J. Op. Cit., p. 38

¹⁷ DE LA ROSA-VELEZ, J., ESCOBAR-FERNANDEZ, R. CORREA, F. Genetic structure of two commercial *Penaeids* from the gulf of California, as revealet be allozyme variation. 2000, 674, 883.

Los trabajos de electroforesis en camarones, han sido importantes, para evaluar la variabilidad genética de las poblaciones y se han constituido en una herramienta muy importante en trabajos de mejoramiento genético en el desarrollo de la camaronicultura. Sin embargo, al evaluar el grado de variabilidad genética en el género *Litopenaeus* con aloenzimas, se demuestra que este ha sido bajo en estudios intra como interespecíficos.

Algunos trabajos en especies de camarones como el de Garcia¹⁸, encuentran en *L. vannamei* que de trece loci analizados siete fueron polimorficos. Los bajos niveles de polimorfismo mostrados por las aloenzimas, han llevado a los autores a utilizar técnicas como RFLP, RAPD y en los últimos años marcadores mini y microsátélites, que son capaces de mostrar mayor variabilidad y mejor caracterización de las poblaciones de camarones. Pero la existencia de una base de datos utilizando aloenzimas en muchas especies representa una forma mas práctica de información genética con base en datos de ADN¹⁹. La electroforesis de proteínas sigue siendo una técnica muy importante en el estudio de variabilidad genética y caracterización de poblaciones, principalmente por su rapidez y bajo costo²⁰.

El mejoramiento genético en la industria camaronera colombiana ha tenido algunos avances, especialmente los logrados por el Centro de Investigación de la Acuicultura en Colombia, CENIACUA, que ha establecido un centro de semillas mejoradas de camarón blanco de *Penaeus vannamei* que surte a varios países de la región Latinoamérica²¹.

¹⁸ GARCIA, D.K., FAGGART, M.A., RHOADES, L. Y ALCIVAR-WARREN. Op. Cit. p. 147.

¹⁹ PARK, L. Y MORAN, P. Developments in molecular genetics techniques in fisheries. London. 1995, 1, 22.

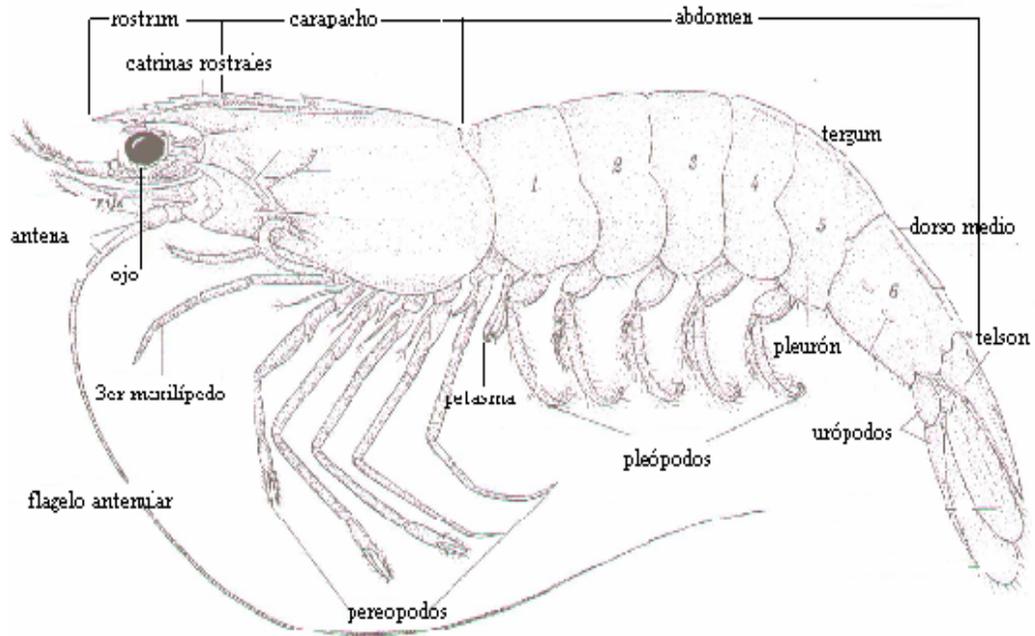
²⁰ WARD, R Y GREWE, P. Op. Cit. p. 213

²¹ Colciencias. Agenda y novedades. www.Colciencias.Com. Septiembre 18 del 2003.

3. MARCO TEORICO

3.1. CARACTERÍSTICAS DEL CAMARÓN BLANCO *Penaeus vannamei*

Figura 1. Camarón blanco *Penaeus vannamei*



La especie *Penaeus vannamei* es conocida regionalmente como camarón blanco del Pacífico, nativa de la costa oeste del Océano Pacífico, desde México hasta las costas del Perú. Se lo encuentra en aguas costeras en profundidades desde 0 hasta 72 metros, en fondos fangosos, en aguas estuarinas en las etapas de post-larva y juveniles, y en aguas marinas en su vida adulta.

Los camarones son animales invertebrados pertenecientes al grupo de los crustáceos, dentro de los crustáceos la especie *Penaeus vannamei* pertenece a la subclase de los Malacostráceos, del orden de los decápodos, de la familia de los Peneidos y del género *Penaeus*, *Aristeomorpha*²². Crecen por medio de mudas sucesivas a lo largo de su ciclo de vida, y presentan metamorfosis durante su primera fase de vida llamada fase larval. Son omnívoros, se alimentan con algas, restos de plantas y varios tipos de animales como gusanos, moluscos y pequeños crustáceos. Toleran altos rangos de temperatura y salinidad, copulan en aguas estuarinas o generalmente en aguas someras, durante la madrugada. La hembra

²² ALVARADO. R, COVEL. C, FRIEDEL. H Y RINGUELET, R. Enciclopedia El mundo de los animales. Madrid. 1989. 129.

adulta puede liberar entre 150000 y un millón de huevos al iniciar la postura. Los huevos se van al fondo y eclosionan en 24 horas y las larvas pasan por los estadios de nauplio, protozooea y mysis, posteriormente al estadio de post-larva y juveniles, hasta la edad adulta.

3.2. CAMARÓN DE CULTIVO

El proceso de domesticación selecciona a los camarones mejor adaptados al ambiente artificial en el que crecen y permite establecer programas de mejoramiento genético, con el objetivo de incrementar el crecimiento y sobrevivencia de los organismos, así como, aumentar su resistencia a las enfermedades²³.

Los camarones se crían en grandes estanques, de por lo menos un metro de profundidad, y los diques se construyen a mano o empleando maquinaria de excavación. El sitio suele estar situado en un estuario o cerca de la costa, para asegurar una fuente cercana de agua salada. Un estanque de camaronicultura puede situarse sobre planicies salinas costeras o en sitios excavados luego de talar artificialmente un manglar. En cuanto a sus características biológicas, el cultivo de camarón se realiza en dos grandes procesos: producción de semilla y engorde. Al primero se le denomina hatchery y comprende el desarrollo de las diversas fases de larva y post-larvas. Ocurre en un laboratorio que utiliza tanques de 8 a 15 toneladas de capacidad, donde se siembran de 80 a 150 nauplios por litro de agua de mar, con una sobrevivencia entre 50% y 70%.

El proceso de engorde comprende el crecimiento del camarón hasta llegar al tamaño comercial que es de 10 a 20 gramos, usualmente de 12 a 14 gramos. Este tamaño es alcanzado en 95 a 120 días a partir de la siembra; el ciclo puede realizarse de una a tres veces por año, dependiendo de las condiciones climáticas. La fase larval tiene una duración de 20 a 22 días y se inicia después que los huevos previamente fecundados y liberados por la hembra, eclosionan y salen los nauplios. Este estadio tiene 5 subestadios, dura aproximadamente dos días, y se alimenta de las reservas que tenía en el huevo. Luego se transforma en zoea que tiene tres subestadios, que duran entre cuatro y cinco días, durante los cuales el animal es exclusivamente fitófago, es decir, consume básicamente microalgas. La siguiente fase es la mysis que tiene tres subestadios, dura aproximadamente cuatro días. Son herbívoros y carnívoros ya que se alimentan con algas y con animales más pequeños que ellos, principalmente de artemia salina. Finalmente aparece la post-larva, forma a partir de la cual el animal ya no se transforma sino solamente crece.

Las fincas de la Costa Caribe cosechan en promedio entre los 98 y 120 días, hasta cuando el camarón pese entre 12 y 17 gramos. El producto se lleva vivo a la planta de preproceso o beneficiadero donde se separa de cualquier elemento

²³ LIGHTNER, D. V. Op. Cit. p. 167.

ajeno al camarón, y se carga inmediatamente a unas tinajas con hielo, las cuales son transportadas a las plantas de proceso donde es clasificado y seleccionado de acuerdo a su talla y calidad.

El camarón es empacado entero o sin cabeza, según las preferencias de sus compradores. La congelación se hace a - 45 °C garantizándose una total frescura, que puede durar cerca de dos años. El camarón entero se congela en la modalidad IQF (ultracongelación individual) o semi-IQF (en bloque sin agua)²⁴.

3.3. CAMARONICULTURA EN COLOMBIA

En general, los principales productos comercializados a nivel internacional son los camarones, salmones y moluscos. El camarón es en valor, el principal producto pesquero comercializado y representa 20% del valor total de los productos pesqueros en el comercio internacional.

Los precios internacionales del camarón registran una significativa volatilidad y una tendencia a la baja, en términos reales, a partir de finales de la década del 70. Las fluctuaciones han obedecido en buena medida a que la producción mundial de camarón ha sido muy inestable, en razón a la gran cantidad de fenómenos naturales y sanitarios que la afectan. La demanda también ha tenido un importante impacto, ya que en las épocas de recesión económica el consumo de bienes suntuarios, o de altos precios, se resiente rápidamente tal como ha sucedido con el camarón en Japón. Entre 1989 y 2001 los precios del camarón han registrado una tendencia moderadamente decreciente: disminuyeron al 0.58% promedio anual.

La industria cultivadora de camarón en Colombia, produce cerca de 8.000 toneladas en 2.700 hectáreas, y exporta cerca de US\$60 millones, con incrementos anuales de la producción en los últimos años, del orden del 10% y de las exportaciones del 15%. Colombia en la actualidad lidera la productividad de la industria en los sistemas de cultivo semi-intensivos, alcanzando productividades de 3.500 kilos/Ha/Año, y sobrevivencias del orden del 60%, porcentaje alto en comparación con el internacional, gracias a la utilización de la semilla producida bajo los sistemas de ciclo cerrado. En este sentido se puede asegurar que esta actividad ya logró su madurez industrial y está preparada para estructurar su nuevo crecimiento. La camaronicultura se enfrenta a amenazas de índole sanitaria que pueden ser contrarrestadas con investigación y desarrollo tecnológico. En este sentido, se han identificado avances en el mejoramiento genético de la semilla del camarón y en el sistema de producción biosegura²⁵.

²⁴ Ibid., p. 225.

²⁵ Cadena de camarón de cultivo. www.colombiacompite.gov.co

Entre las principales industrias camaroneras Colombianas se puede mencionar: AGROCALAO Ltda (Itaguí Antioquia); AGROMARINA Y BALBOA TUMACO Ltda., AGROSOLEDAD S.A (Cartagena); AGROTIJOS S.A, AQUACULTIVOS DEL CARIBE S.A , ACUACULTURA DEL MAR "AQUAMAR S.A", CARTAGENA DE ACUACULTURA S.A, VIKINGO DE COLOMBIA S.A, POST-LARVAS DEL PACIFICO, PRODUMAR (Colciencias 2003)²⁶.

3.4. BASES GENÉTICAS DE LA ACUICULTURA

En términos generales, se puede decir que la acuicultura persigue como meta la domesticación de especies para elevar su productividad. En la fase de precultivo las actividades se enfocan a la búsqueda e identificación de "stocks" de especies y poblaciones susceptibles de ser explotadas, así como la selección de organismos fundadores para la granja acuícola. En forma paralela se debe recabar la información necesaria respecto de las condiciones ecológicas y de la biología fundamental de las especies a utilizar.

En esta etapa, debe tenerse en cuenta que ciertas características o cualidades genéticas que esta claramente entendidas y bien documentadas en animales domesticados, son aún relativamente desconocidas en especies acuáticas y que en general, los organismos marinos y estuarinos se conservan sin alteraciones, por efecto de la selección artificial y su repertorio genético refleja únicamente la acción de la selección natural operada en ambientes naturales.

Desde el punto de vista genético, esta fase es con mucho, la que requiere mayor investigación por parte de los genetistas para el esclarecimiento de la identificación correcta de las especies y la búsqueda de los caracteres que pueden ser aprovechados en la producción artificial²⁷.

3.5. GENÉTICA DE POBLACIONES

Una población puede definirse como el conjunto de individuos que pueden intercambiar libremente y entre todos ellos material genético a través del proceso reproductivo y generar una descendencia fértil²⁸. Muchos organismos forman naturalmente subpoblaciones como manadas, rebaños, colonias u otro tipo de agregación, los cuales se desarrollan en hábitats naturales en donde se presentan zonas favorables alternadas con áreas desfavorables. Estas áreas favorables pueden llegar a sufrir desarreglos en su organización debido a agentes naturales

²⁶ Colciencias. Op. Cit. p. 29

²⁷ Ibid., p. 230

²⁸ VÁZQUEZ, A. Ecología y Formación Ambienta. 1993, 64, 211.

como fuegos, inundaciones y pueden producir diferencias y subdivisiones en las poblaciones²⁹.

Los procesos evolutivos se presentan en las poblaciones, porque los cambios ocurren en el genoma de la especie, el cual está constituido por el material genético colectivo de toda la población. Los cambios evolutivos sólo se manifiestan después de ciertos periodos, ya que las variaciones de una generación a otra son pequeñas³⁰. Se entiende por diferenciación genética a la adquisición de frecuencias alélicas que varían entre las subpoblaciones. Las diferencias genéticas pueden ser el resultado de la selección natural, favoreciendo diferentes fenotipos en diferentes subpoblaciones, pero también puede resultar de procesos aleatorios en la transmisión de alelos de una generación a la siguiente. Este fenómeno es conocido como deriva genética³¹.

La genética de poblaciones estudia la herencia en grupos de individuos, a través de los patrones de variación genética que pueden existir dentro de un grupo y como estos patrones cambian o evolucionan a través del tiempo. Las variaciones en una población son transmitidas a la siguiente generación a través de la reproducción cuando los gametos se unen para formar los cigotos. La frecuencia genética se predice de acuerdo a el enunciado de la Ley de Hardy-Weinberg³². Esta ley sostiene que “las proporciones genotípicas permanecen constantes de una generación a la siguiente en una población que posee los siguientes criterios: apareamiento al azar, estar libre de mutaciones, tener un tamaño grande, con el cual cambios al azar en las frecuencias alélicas no son significativas, no tener migraciones y que en ella no ocurra la selección natural”³³. Si se produce una desviación en la frecuencia genómica se deberá a una presión selectiva en la población o a la existencia de procesos de migración, mutación o deriva genética³⁴.

La cantidad de variación heredable dentro de una población es importante por varias razones. Es determinante para medir el potencial para que se realicen cambios evolutivos y adaptativos. A través de esta variación se puede llegar a identificar las fuerzas evolutivas y como afectan las poblaciones, incrementando o decreciendo dicha variación. Además, el surgimiento de nuevas especies dependerá de la cantidad de variación genética dentro de la población³⁵.

²⁹ HARTL, D.L Y CLARK, A.G.. Principles of Population Genetics. Associates, Massachusetts.1997, 110.

³⁰ STURTEVANT, A.H.A. History of Genetic. 2001, 187, 690.

³¹ HARTL Y CLARK. Op. Cit. p. 115.

³² STURTEVANT, A.H.A. Op. Cit. p. 94

³³ RYMAN, N. Genetic Population Structure. 1997, 210, 538.

³⁴ STURTEVANT, A.H.A. Op. Cit. p. 136

³⁵ GRIFFITHS, A.J., GELBART, W.M. MILLER, J.H y LEWONTIN, R.C. Modern Genetic Analysis. 1999, 301, 612.

3.6. VARIABILIDAD GENÉTICA

Desde el punto de vista genético, la variabilidad genética es el atributo más importante en una población y constituye el material sobre el cual actúa la selección natural. A mayor variabilidad se incrementan las probabilidades de que una población enfrente exitosamente los cambios en su ambiente. En un stock de cultivo, el hombre también actúa sobre la variabilidad genética seleccionando los fenotipos que determinan algún carácter de importancia comercial; pero, si no se tiene un manejo adecuado de los reproductores puede deteriorarse la variabilidad genética del stock cultivado.

El deterioro genético aumenta con la disminución del tamaño poblacional y ocurre principalmente por dos causas: endogamia y deriva génica³⁶.

Hartl y Clark³⁷ definen la diversidad o variabilidad genética como “la variedad de diferentes genes en una población reproductiva, dentro de una especie o dentro de todas las especies encontradas en un área dada” y por ende, la capacidad a responder tanto a cambios de índole ambiental como a transformaciones dadas por algún tipo de selección, ya sea natural o generada con algún propósito. Al evaluar esta variabilidad a través de estudios de poblaciones silvestres se ha llegado a la caracterización e identificación de grupos base para especies que tienen una importancia comercial, determinando la presencia de stock de poblaciones con los cuales se pueden crear esquemas de manejo del recurso y mejorar a largo plazo la sostenibilidad³⁸.

Estos estudios de poblaciones de animales son una herramienta útil para los programas de conservación, que en los últimos años han tomado un gran auge. La importancia de la biodiversidad y su conservación quedó patente a partir de la cumbre de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo realizada en Río de Janeiro en 1992. La pérdida de diversidad genética merma nuestra capacidad para mantener y mejorar la producción pecuaria y reduce la aptitud para hacer frente a nuevas condiciones ambientales³⁹.

Adicionalmente, el monitoreo de la diversidad genética es esencial para poder mejorar los programas de selección con el fin de mostrar que tan bien las poblaciones domésticas representan las variaciones naturales de las especies. Los datos de diversidad genética pueden proveer información a cerca de alelos

³⁶ LABASENA, M.E., TORRES, M. Y ESPINOSA, G. Variabilidad y distancia genética en especie de *Penaeus*. Revista de investigación. Vol 1. Marzo 15. 1994, 36, 60.

³⁷ HARTL, D.L., y CLARK A.G. Op cit. p. 201.

³⁸ PHILIPP, D.P., J.M. EPIFANIA, y M.J.. Point/counterpoint: conservation genetics and current stocking practices- are they compatible? Aquatic Fisheries Sciences. 1993, 15, 369.

³⁹ www.fao.org/

raros, decrecimiento de la heterocigosidad e incremento en los niveles de entrecruzamiento dentro de los programas de cría^{40,41}.

En algunos países, las poblaciones silvestres de camarón han sido afectadas por la explotación pesquera, la actividad camaronera y eventos naturales. En estudios realizados se ha observado la disminución de la población de reproductores de camarón. También se ha encontrado que fenómenos como la Niña están relacionados con dicha disminución, desestabilizando las poblaciones naturales de camarón. Lo anterior, unido a la incidencia de enfermedades en animales de cultivo⁴² conducen a la necesidad de establecer una industria más estable desde el punto de vista productivo. Por lo cual se ha impulsado la implementación de programas de mejoramiento genético en camarón.

Para lograr un programa genético con buenas probabilidades de éxito es necesario generar una estructura genética y una variabilidad amplia en las poblaciones base de selección. La implementación de programas adecuados permitiría desarrollar stocks domésticos libres de enfermedades o resistente a ellas^{43,44}. Para ello es necesario tener poblaciones stock de animales silvestres cuya caracterización, en cuanto a variabilidad y estructura genética se ha conocida y así poder tener material disponible para aumentar variabilidad genética en el caso que se encuentre una disminución de ésta durante el programa de mejoramiento. Además, la caracterización y determinación de la estructura de los camarones silvestres apoyaría el sector pesquero al crear programas de optimización del recurso al identificar poblaciones y optimizar el recurso.

⁴⁰ SUNDEN, S.L.Y DAVIS, S.K. Evaluation of genetics in a domestic population of *Penaeus Vannamei* (Boone): A comparison with three natural populations. *Aquaculture*. 1991, 131, 772.

⁴¹ LESTER. J. L. Op. Cit. p. 35

⁴² LIGHTNER, D. V. Op. Cit. p. 230

⁴³ WYBAN, J.A., J.S. SWINGLE, J.N. SWEENEY, y G.D. Specific pathogen-free *Penaeus vannamei*. 1993, 39, 145.

⁴⁴ CARR. W.K, FJALESTAD, D. GODIN, J. SWINGLE, J. SWEENEY, y GJEDREM, T. Genetic variation in weight and survival in a population of specific pathogen-free shrimp. 1996, 114, 526.

La variabilidad genética puede estimarse aplicando técnicas como RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), ADN mitocondrial, Multilocus y minisatélites, RAPD (amplificación al azar de ADN polimorfo) y Loci microsatélite. Se ha observado pérdida de variación genética a través de la técnica de aloenzimas multilocus en camarones^{45,46} pero no es muy claro si esta pérdida de variación espacial en muchos estudios refleja una alta dispersión de las especies o una baja sensibilidad de la técnica^{47,48}.

Sin embargo, estudios con aloenzimas⁴⁹ han demostrado diferenciación genética a grandes escalas. Además hasta la fecha, la mayoría de los análisis desarrollados en Peneidos han sido documentados utilizando aloenzimas. De esta forma, las aloenzimas pueden utilizarse como marcadores genéticos de individuos y poblaciones, y sirven de herramienta para el estudio de la estructura genética de las poblaciones de camarones.

3.7. MARCADORES GENÉTICOS

A mediados del siglo XX surge el concepto de marcador genético para aquellos caracteres hereditarios que permiten diferenciar a un individuo de otro, los que pueden ser expresados como un rasgo físico o por diferencias demostrables en algunos de los constituyentes del organismo (enzimas y proteínas).

Todo marcador genético es controlado por un gen localizado en un cromosoma determinado. Los genes se sitúan a lo largo del cromosoma en un orden lineal, donde cada uno ocupa una posición conocida como su "locus", y las formas alternativas que se presenten para cada gen en un mismo locus se denominan alelos. Cada cromosoma contiene solo un alelo para cada locus particular, por lo que solamente dos alelos podrán estar involucrados en la formación de una característica específica en un organismo: uno proveniente del cromosoma materno y el otro aportado por el cromosoma paterno⁵⁰. Cuando el individuo presenta el mismo alelo se considera homocigoto para ese carácter, mientras que cuando son diferentes es considerado heterocigoto.

⁴⁵ TAM, Y.K, Y CHU, K.H. Op. Cit. p. 351

⁴⁶ BALL, A, LEONARD S., y. CHAPMAN, W.R.. Characterization of (GT)_n microsatellites .from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). 1998, 1251,1253.

⁴⁷ HEDGECOCK, D.. SHLESER R.A, y. NELSON, I.C. Genetics. 1982, 283, 403.

⁴⁸ BENZIE, J.A.H.. Genetic improvement of prawns. 1998, 201, 425.

⁴⁹ BENZIE, J.A.H., FRUSHER, S. y. BALLMENT, E. Geographical variation in allozyme frequencies of *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda) populations in Australia. Australian Journal of Marine and Freshwater Research. 1992, 715, 925.

⁵⁰ THOMPSON, J. S Y THOMPSON, M. W. Genética Médica. 1975, 36, 1120.

Para que un carácter sea considerado como marcador genético debe cumplir con las Leyes de Mendel, debiendo presentar una amplia variabilidad en la población en estudio, o lo que es igual presentar polimorfismo⁵¹.

Se considera como un buen marcador genético a aquel que, en la misma localización genómica, tiene variación entre diversos animales dentro de la misma especie⁵². Esto permite que se pueda seguir la diversidad genética entre las familias y las poblaciones, establecer las líneas de pedigrís centradas alrededor de la expresión deseada de ciertos rasgos y determinar linajes verticales y horizontales.

Los métodos moleculares han sido parte esencial de las herramientas de la Biología evolutiva, para conseguir deducciones sobre la descendencia. Para estudios recientes de poblaciones o de parentesco, se han usado una gran variedad de marcadores de segregación genética: aloenzimas, RFLP, (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), ADN mitocondrial, multilocus y locus simples minisatélites, RAPD (amplificación al azar de DNA polimórfico) y loci microsatélites más recientemente. La calidad de información que brindan los marcadores genéticos, depende de cómo los productos pueden ser marcados consistente y objetivamente, de cómo reflejan la variación genética y de si son representativos. El primer requerimiento es que las bandas deben ser marcadas consistentemente y puedan ser comparables⁵³.

3.8. ALOENZIMAS

En los estudios genéticos, generalmente lo que se detecta son las aloenzimas. Las isoenzimas son formas separables de aloenzimas pero funcionalmente similares, codificados por uno o más loci. Las isoenzimas que son productos de diferentes alelos en el mismo locus (lugar que ocupa un gen en el cromosoma) son llamadas aloenzimas.

El polimorfismo bioquímico o genético de las proteínas se refiere a diferentes tipos de una misma molécula, que difieren en su composición de aminoácidos y que son controlados por alelos diferentes. Estos se detectan mediante bandas con distintas movilidades mediante la electroforesis lo que constituye un determinado fenotipo, y se designan por letras; a para la banda rápida, b para la lenta. Se utilizan soportes como acetato de celulosa, papel o geles de agar, almidón o poliacrilamida, para correr los preparados de las muestras y detectar las bandas

⁵¹ POLANSKI, H.F. Applications of Genetic Marker Typing in disputed parentage cases. Principles of Transfusion Medicine. 1991, 124, 547.

⁵² JIMÉNEZ, P. y COLLADA, C. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. 2000, 237, 870.

⁵³ QUELLER, D.C., STRASSMAN J.E. y HUGHES C.R. Microsatellites and kinship. Elsevier Science publishers. Ltda. 1993, 21.

por medio de diferentes tinciones histoquímicas características para cada sistema enzimático⁵⁴.

Cuando todos los individuos de una población tienen la misma banda, la hipótesis más sencilla es que un locus monomórfico simple codifica la proteína y todos los individuos son homocigotos para un mismo alelo. Cuando los individuos muestran diferencias, los fenotipos usualmente se conforman con el patrón de bandas esperado sobre la base de la expresión codominante de los alelos en un locus simple y el número de subunidades de las proteínas en estudio. Los fenotipos heterocigóticos presentan un número variable de bandas dependiendo de las características de la enzima activa⁵⁵.

3.9. ELECTROFORESIS DE ALOENZIMAS

El estudio moderno de la variación a nivel de los genes comenzó en los años 60 con el desarrollo de una metodología para cuantificar la variación proteica en loci génicos únicos⁵⁶. Recibe el nombre de electroforesis de aloenzimas, debido a que este método es utilizado para la examinación de variaciones de un locus particular. Las isoenzimas son las diferentes formas de una proteína codificadas para varios alelos de un locus. El proceso de electroforesis de aloenzimas comienza con la separación de estas en un campo eléctrico en un medio sólido, ya sea un gel de almidón, acetato de celulosa o acrilamida de acuerdo al tamaño y forma de las mismas. El revelado puede ser por tinción o generando una catálisis de la enzima al utilizar un sustrato específico⁵⁷.

La electroforesis es la migración a distinta velocidad, de moléculas cargadas en solución debido a la aplicación de un campo eléctrico. La técnica electroforética más utilizada por los bioquímicos es la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) la cual requiere de un equipo simple y relativamente no muy costoso y permite separar mezclas complejas⁵⁸.

El estudio electroforético de proteínas es una herramienta muy valiosa y a la vez muy sencilla, en que las muestras: macerados de tejidos, suero, saliva e incluso organismos completos pueden analizarse, muchas veces sin tratamiento previo. Ha sido adaptada muy bien para el estudio de poblaciones, es de bajo costo, no requiere un equipo sofisticado, es un procedimiento rápido para desarrollar en

⁵⁴ KING, J.D Y OHTA, T.H. Polyallelic mutational equilibrium. *Genetics*. 1975, 243.

⁵⁵ BEROVIDES, V. y ALFONSO, M. *Biología Evolutiva*. 1995, 114, 680.

⁵⁶ KREITMAN, M., y AKAHI, H. Molecular evidence for natural selection. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1995, 403, 422.

⁵⁷ HOELZEL, A.R. *Molecular Genetic Analysis of Populations, a Practical Approach*. 1998, 236, 612.

⁵⁸ LUQUE, E. *Bioquímica estructural*. Universidad de Nariño. Pasto. 1995, 245, 268.

gran escala y en un gran número de loci diferentes dispersos en todo el genoma y que pueden ser teñidos simultáneamente⁵⁹.

La técnica de electroforesis de proteínas tiene ciertas limitaciones. Su resolución no es siempre adecuada para detectar diferencias entre poblaciones o individuos⁶⁰ debido a la redundancia en el código de DNA que dicta la secuencia proteica, donde todos los cambios en un gene pueden no resultar en un cambio en la carga neta de la proteína expresada. Así muchas variantes genéticas no pueden ser detectadas por electroforesis de proteínas. Además, está limitada a detectar los cambios genéticos que afectan genes que expresan proteínas sensibles a tintes histoquímicos⁶¹. Estos genes constituyen solo un pequeño porcentaje del genoma total de un organismo. Alrededor del 29% de las mutaciones que ocurren en el genoma no se pueden detectar por los cambios en la secuencia de aminoácidos⁶². Otra limitación es que se requiere de tejido fresco o congelado, y más material que muchos métodos de ADN⁶³.

Los trabajos de electroforesis en camarones, han sido importantes, para evaluar la variabilidad genética de las poblaciones y se han constituido en una herramienta importante en trabajos de mejoramiento genético en el desarrollo de la camaronicultura. Sin embargo, al evaluar el grado de variabilidad genética en el género *Litopenaeus* con aloenzimas, se demuestra que este ha sido bajo en estudios intra como interespecíficos.

En peneidos se han realizado diversos estudios sobre la variabilidad de algunos caracteres morfométricos, en varias especies de *Penaeus*, con el fin de seleccionar stocks de descendencia que presenten un mayor desarrollo del abdomen o cola para especies de mejora genética u otros caracteres que ofrezcan posibilidades en acuicultura. El análisis de los caracteres se ha realizado por electroforesis⁶⁴.

⁵⁹ PASDAR, M., PHILIP, D.P., Y WHITT, G.S. Linkage relationships of nine enzyme loci sunfishes (*Iepomis*; centrarchidae). *Genetics*. 1984, 435, 1446.

⁶⁰ GRANT W. S. Y UTTER, F. M. Biochemical genetic variation in walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) and population structure in the southern Bering Sea and Gulf of Alaska. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1980, 1093, 1100.

⁶¹ MORIZOT, D. C. y SCHMIDT, M. E. Starch gel electrophoresis and histochemical visualization of proteins. *Electric and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management*. U.S.A. 1990, 25, 218.

⁶² NEI, M. Estimation of heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 1978, 583.

⁶³ ESTOUP, A., ROUSSET, F., MICHALAKIS, Y., COURNUET, J. M., ADRIAMANGA, M. y GUYOMARD, R. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: un case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Conserv. Biol.* 1998, 339, 553.

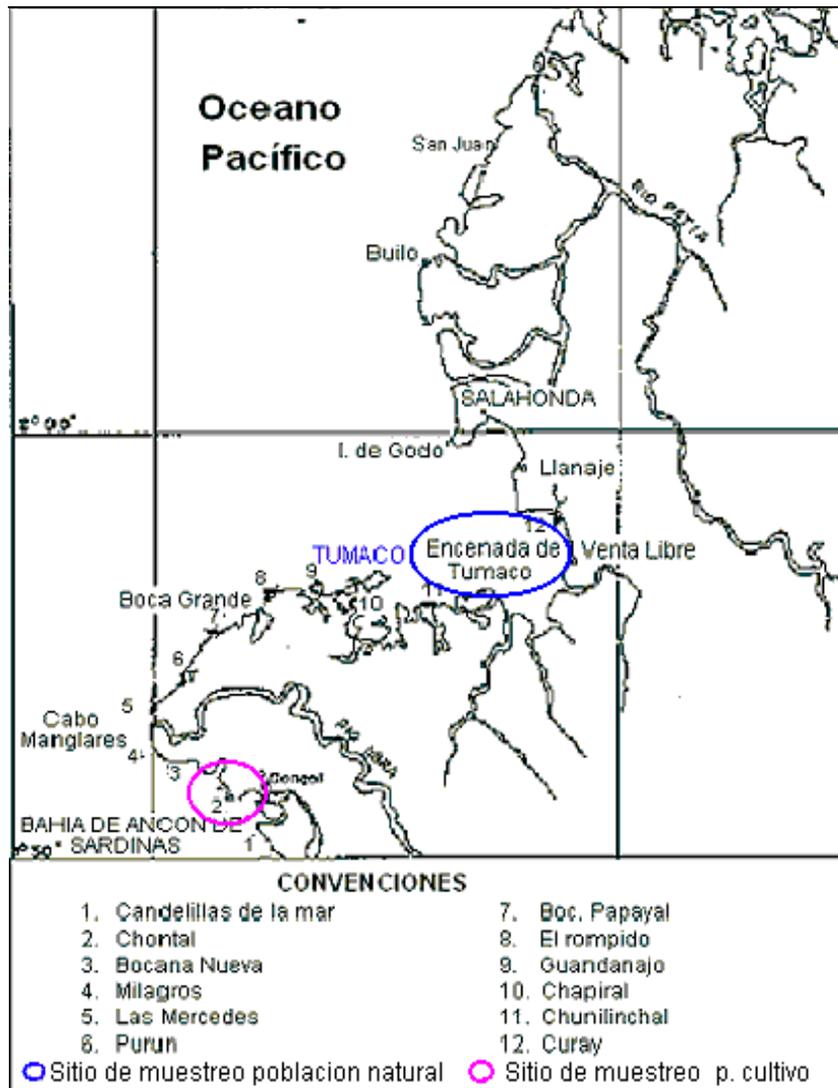
⁶⁴ MARTINEZ CORDOBA, L. R. Op. Cit. p. 49

4. METODOLOGÍA

4.1. MUESTREO

El muestreo se realizó al azar en los meses de mayo y septiembre del 2005, dentro del cual se obtuvo un total de 80 ejemplares.

Figura 2. Ubicación geográfica de la zona de muestreo de la población natural y de cultivo del camarón *P. vannamei*.



4.1.1. Población natural. Inicialmente se capturaron durante cuatro días en el mes de mayo, 28 individuos de *Penaeus vannamei* de la población natural en la ensenada de la Bahía de Tumaco Nariño por arrastre de lanchas pesqueras pertenecientes al Puerto marítimo de Tumaco Nariño, después en una segunda captura en el mes de septiembre fue posible obtener durante dos días, 12 camarones para lograr un total de 40 muestras de la población natural. Estos ejemplares así obtenidos se introdujeron en bolsas adhesivas y se transportaron en hielo hasta el Laboratorio de la Universidad de Nariño donde se les realizó inmediatamente el análisis morfométrico para posteriormente obtener las muestras de tejido muscular, ojos y hepatopáncreas requeridas.

4.1.2. Población de cultivo. En el mes de septiembre se capturaron 40 ejemplares *Penaeus vannamei* de las piscinas pertenecientes a la camaronera "Balboa" de Tumaco Nariño y fueron congelados para ser transportados a los laboratorios de la universidad, en donde se realizó el análisis morfométrico y se obtuvo de estos las muestras necesarias. Estos individuos tenían 11 semanas de haberse sembrado por tanto no se encontraban en su máximo peso (16g),

4.1.3. Descripción del sitio de muestreo. Tumaco, municipio colombiano del departamento de Nariño, localizado sobre una isla de origen aluvial, con una altura de 2 m y una temperatura cuyo promedio es de 28 °C. Esta población se encuentra a 304 km de Pasto, capital departamental. La base económica de la región la constituye en primer lugar la explotación forestal, seguida de la actividad agropecuaria, la minería, el comercio, la pesca industrial y la actividad portuaria, ya que se trata del segundo puerto más importante que tiene el país en el océano Pacífico⁶⁵.

El sitio de muestreo escogido para la captura de los individuos de la población natural esta ubicado aproximadamente a una distancia de 4 Km del puerto marítimo conocido como la Ensenada de Tumaco. Los individuos de la población de cultivo se obtuvieron de la finca de la camaronera Balboa situada en la vereda El Chontal, que se encuentra ubicada a 15 minutos de Tumaco. Esta finca cuenta con seis piscinas rectangulares de aproximadamente 6 hectáreas y se abastece de agua de mar proveniente de canales de donde se la bombea.

4.2 Análisis morfométrico

El análisis morfométrico que se les realizó a los 80 ejemplares consistió en medir: peso total, peso del cefalotórax y del abdomen con exoesqueleto; largo total, del abdomen y del cefalotórax, número de diente rostrales, de pleópodos y de pereópodos.

⁶⁵ TAVERA, H. En cercanías de Tumaco crudos indicios de contaminación. AUPEC-Univalle. Cali Colombia.1999. www. Ciencia al día.

4.3 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

4.3.1. Preparación del material biológico. Se tomaron 0.3g de músculo abdominal y por separado todo el hepatopáncreas y los ojos de cada uno de los camarones para colocarlos dentro de tubos eppendorf de 1.5ml para homogenizar con 0.5ml de buffer tris ácido fosfórico (4.46/0.27M) pH 6.7-7 utilizando un agitador mecánico.

Antes de cada aplicación de muestra en la cámara de electroforesis se centrifugó a 15000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C en la centrifuga IEC MultiRF de la Universidad de Nariño. El precipitado se guardó en el freezer a -20°C para posteriores extracciones.

4.3.2. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida. La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis discontinua con geles de poliacrilamida no desnaturizantes, con un gel concentrador y otro separador, según la metodología descrita por Davis⁶⁶. Se analizaron seis sistemas enzimáticos, todos referidos como polimorficos.

Tabla 1. Sistemas loci-enzimaticos a estudiar en los diferentes tejidos del camarón blanco *P. vannamei*

Nombre común	Clasificación*	Abreviatura	Locus	Tejido
Glutamato Deshidrogenasa	1.4.1.2	GDH	Gdh	Músculo
Amilasa	3.2.1.1	Ami	Ami-1 y Ami-2	Hepatopáncreas y ojos
Peroxidasa	1.11.1.7	Per	Per	Hepatopáncreas y ojos
Lactato Deshidrogenasa	1.1.1.27	LDH	Ldh-1 y Ldh-2	Músculo
Proteínas Totales		Pt	Pt-2 y Pt-3	Músculo
Aspartato Deshidrogenasa	1.5.1.15	ASD	Asd	Músculo

* El Comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) describe cada tipo de enzima caracterizada y le suministra un número de la EC (Comisión de la enzima) <http://us.expasy.org>

Además de estos seis sistemas enzimáticos se ensayo con dos más, Alanina y Malato deshidrogenasa encontrando que son monomórficas para la especie *Penaeus vannamei*.

Para la preparación de los geles, primero se acondicionaron los vidrios del equipo de electroforesis, los cuales deben ser lavados con detergente y con bastante agua destilada, por ultimo se secan y se limpian por el lado donde va ir el gel con un algodón impregnado de etanol absoluto. Una vez secos totalmente se procedió

⁶⁶ DAVIS, B. J. Electroforesis, parte 2. 1964, 402, 421

a armar el “sándwich” en el molde para dos geles. Luego se procedió a preparar los geles, comenzando con el gel separador que va en la parte inferior del “sándwich”:

Gel separador:

Solución A: buffer del gel separador tris-HCl 0.4M. PH 8.8

Solución B: solución stock de acrilamida-bisacrilamida 29.2-0.8%

PA: persulfato de amonio 10%

TEMED

De acuerdo al tipo de proteína que se quiera revelar, se trabajó con diferente dureza del gel variando el porcentaje de acrilamida y bisacrilamida. Para determinar las condiciones electroforéticas óptimas con que se trabajó, nos basamos en los estudios realizados en *Penaeus schmitti*⁶⁷, encontrando que la dureza que proporcionó mejores resultados fue del 7.5% para proteínas totales y del 9% para los demás sistemas enzimáticos:

Tabla 2. Volúmenes para la preparación del gel separador a diferente porcentaje de dureza.

Reactivos/Dureza	7.5%	9%
Solución A	1.8ml	3ml
Solución B	1.5ml	1.8ml
Agua	2.7ml	1.2ml
PA	30µl	30µl
TEMED	6.8µl	6.8µl
Volumen Total	6ml	6ml

Las cantidades de cada uno de los reactivos se adicionaron en un vaso de precipitados en el orden indicado y se mezclaron con un agitador magnético para evitar la producción de burbujas y para que el gel separador quede totalmente homogéneo. Una vez preparado se adicionó al “sándwich” de tal forma que quede aproximadamente a una altura de 6 cm del borde inferior, se dejó polimerizar en la oscuridad durante 30 minutos y se lavó con agua destilada para retirar los residuos que quedaron sin polimerizar.

Gel concentrador 5%:

⁶⁷ ESPINOSA, G., U. BÉCQUER, Y. BORRELL, ROMO, J. R. DÍAZ, J. AZANZA, y De DIOS, R. Variación genética y morfológica en poblaciones naturales y cautivas de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en Cuba. 2002, 778.

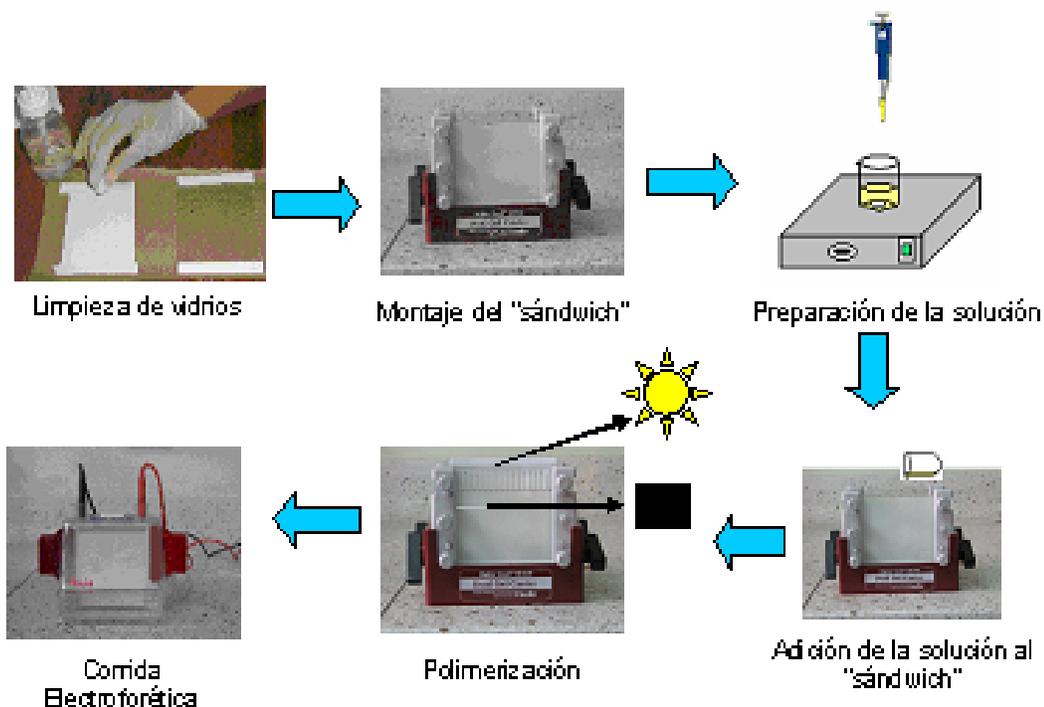
Solución C: buffer del gel concentrador⁶⁸. Tris/HCl. 0.125M PH 6.8
 Solución E. Rivoflavina 0.06%

Tabla 3. Volúmenes para la preparación del gel concentrador al 5% de acrilamida.

Solución	C	B	E	Agua	PA	TEMED	Volumen Total
cantidad	0.81ml	0.43ml	0.376ml	0.376ml	10 μ l	2 μ l	2ml

Esta solución se adicionó encima del gel separador, hasta alcanzar el borde superior. Se colocó el peine, para formar los pozos. Después se dejó gelificar en presencia de luz durante 30 minutos. Una vez polimerizado se extrajo el peine con cuidado para no dañar los pozos. Se lavó con agua para retirar los residuos no polimerizados.

Figura 3. Diagrama de preparación de los geles de poliacrilamida



⁶⁸ EVANS, C. L. Y TORRE, F. J. SDS-Polyacrylamide gel Electrophoresis of Snake Venoms. 1983, 356, 1011.

4.3.3. Corrida electroforética. Se colocaron los geles en la cámara electroforética SE 250 Mighty Small II de tal forma que queden soportados en el fondo y asegurados con las grapas.

Figura 4. Cámara electroforética SE 250 Mighty Small II de la Universidad de Nariño.



Se adicionó el tampón de la cámara: tampón tris/glicina (0.05-0.042M) pH 8.3-8.7 dentro y fuera de los vidrios que contienen los geles y se retiran con una jeringa las burbujas que puedan formarse en medio de estos.

Después se realizó una pre-corrída de los geles sin muestras a 25mA durante 30 minutos para que el persulfato amónico utilizado en la polimerización migre por delante de las muestras y así evitar que las desnaturalice como también para que migren otros iones que puedan interferir en la corrida.

Tanto la pre-corrída y las corridas electroforéticas se realizaron bajo refrigeración (4°C) para prevenir la desnaturalización de las muestras y para que los geles no se sequen.

Después de la pre-corrída se sacó la cámara del refrigerador para aplicar en cada pozo las muestras preparadas con glicerol y azul de bromofenol para proporcionar densidad a la muestra y marcar el frente de corrida. La cantidad de muestra aplicada no fue igual para todos los sistemas enzimáticos que se analizaron, encontrando que los volúmenes adecuados de muestra dependen de la enzima que va a revelar:

Tabla 4. Volúmenes empleados para la aplicación de muestra en cada sistema enzimático

ENZIMA	CANTIDAD DE MUESTRA(μ l)	AZUL DE BROMOFENOL(μ l)	VOLUMEN TOTAL APLICADO(μ l)
GDH	9	1	10
AMI	9	1	10

PER	14	2	15
PT	9	1	10
LDH	12	2	14
ASD	12	2	14

Para realizar las corridas de Amilasa y Glutamato deshidrogenasa fue necesario hacer una dilución muestra-buffer de muestra 1:100 antes de realizar la aplicación para disminuir la concentración de estas enzimas y lograr una buena resolución de las bandas. Además de las muestras de camarones en cada uno de los geles se aplicó una muestra de hígado como patrón de referencia.

4.3.4. Condiciones de corrida. El voltaje en el gel concentrador fué de 80 a 100V y una corriente de 25mA. Al pasar el frente por el gel separador, se eleva el voltaje a 250V, con una corriente de 35mA. La corrida se realizó durante dos horas aproximadamente de tal forma que el frente de corrida quede a un centímetro del borde inferior del gel. Luego se sacó los geles cuidadosamente y se colocaron en recipientes para proceder a la tinción. El buffer de la cámara se reutilizó para dos corridas más.

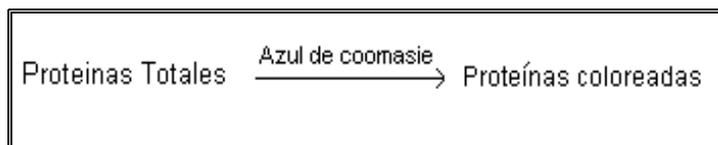
Cada muestra se corrió por triplicado para cada una de las enzimas analizadas, con el fin de asegurar la reproducibilidad de la técnica.

4.4. TEÑIDO

Para visualizar las bandas correspondientes a los diferentes sistemas enzimáticos a estudiar, se incubaron los geles con soluciones de teñido específicas para cada sistema:

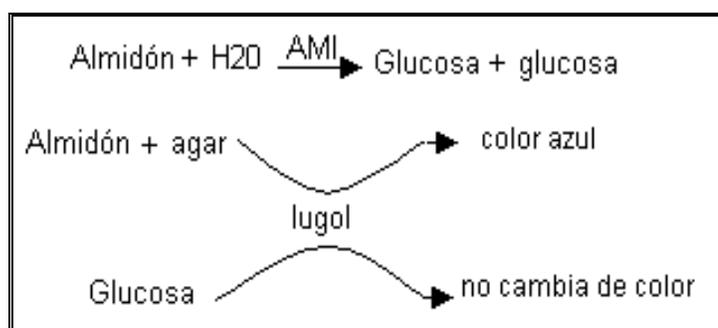
4.4.1. Proteínas totales. Para la tinción de esta proteínas se sumergió el gel en una solución de desteñido (40% metanol, 10% ácido acético y 50% agua) hasta que desapareció el frente de corrida. Cuando el gel quedó totalmente transparente se retiró esta solución y se adicionó el azul de coomasie (azul de coomasie 0.4%, en etanol:agua 1:1 y ácido tricloroacético 12.5% en proporción 1:10). Las bandas aparecieron aproximadamente al término de una hora, en este momento se retiró el azul de coomasie y se adicionó solución de desteñido durante diez minutos.

Esquema 1. Tinción de proteínas totales



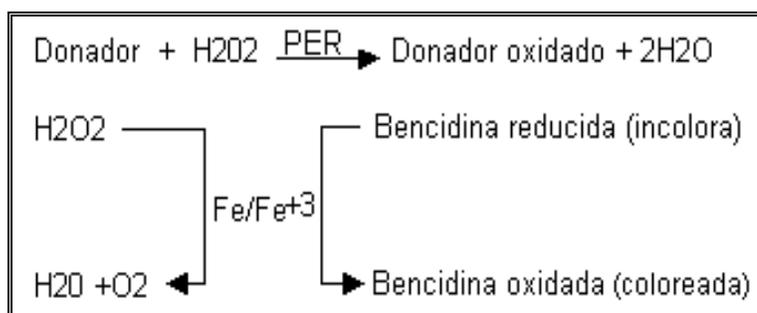
4.4.2. Amilasa. Se incubó el gel en buffer fosfato pH 6 (NaH_2PO_4 0.05M ajustando con Na_2HPO_4 0.2M) durante 10 minutos, luego se retiró el buffer y se adicionó una solución de agar:almidón al 1% en buffer fosfato pH 6, la cual se llevó previamente a ebullición y se dejó enfriar a 40°C para ser utilizada. La capa de agar:-almidón se dejó actuar por 30 minutos, luego se retiró y se lavó el gel con agua destilada. Para revelar las bandas se adicionó lugol en ácido acético 10:1.

Esquema 2. Tinción de Amilasa



4.4.3. Peroxidasa. Se adicionó una solución recién preparada de bencidina hidroclicórica al 0.02% y peróxido de hidrógeno al 0.2% en proporciones iguales.

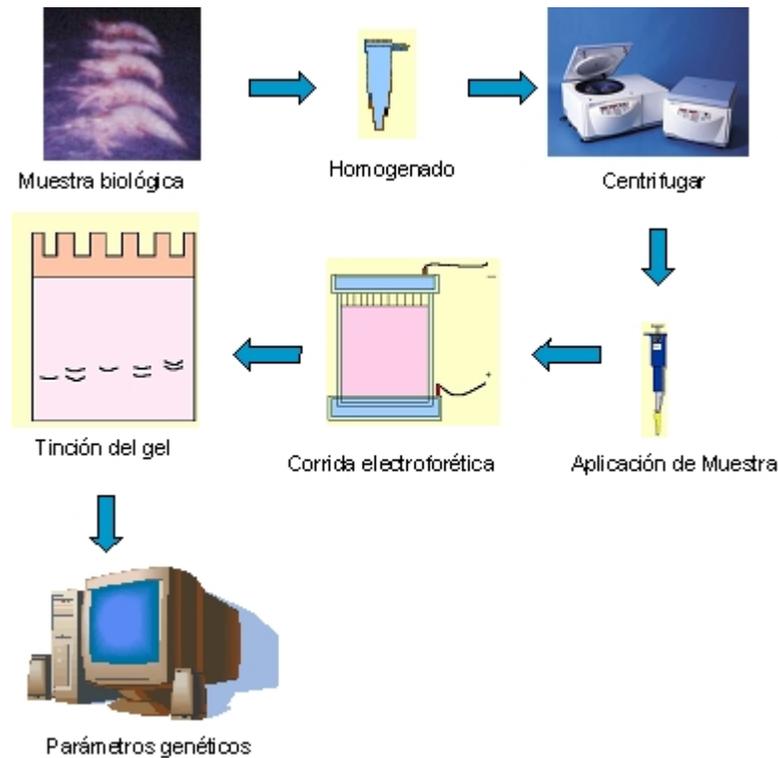
Esquema3. Tinción de Peroxidasa



4.4.4. Glutamato Deshidrogenasa. Se disolvió 23 mg de glutamato en buffer fosfato pH 7 (0.075M Na_2HPO_4 y 0.056M NaH_2PO_4) y se adicionó esta solución al gel. Después se agregó en el siguiente orden 154.2μl de MTT 1%, 96.6 μl de PMS 1% y 386.5μl de NAD 1%. Se realizó la tinción dentro de una estufa a 37°C en oscuridad hasta que aparecieron las bandas.

Para detener la tinción se procedió lavando el gel con agua destilada en abundancia para arrastrar toda la solución de tinción hasta eliminarla. Después se mantuvo sumergido el gel en agua destilada hasta la lectura de las bandas.

Figura 5. Diagrama de la metodología llevada a cabo en la Electroforesis de aloenzimas Multilocus



4.5. LECTURA DE LOS GELES

Las bandas que aparecieron sobre el gel después de la tinción enzimática se apreciaron visualmente con facilidad. Las diferentes movilidades electroforéticas se identificaron asignando números enteros en orden creciente desde la banda que más corrió. En ausencia de banda por falta de actividad enzimática se asignó el cero.

4.6. ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS GENÉTICOS

Con la información obtenida se estimaron los parámetros genéticos, siguiendo las metodologías tradicionales de la genética cuantitativa establecida para estos fines⁶⁹.

⁶⁹ FALCONER, D Y MACKAY. Introduction to quantitative genetics. 1996, 2110, 4646.

4.6.1. Número promedio de alelos por locus (A).

$$A = (1/k) \sum n_j.$$

Donde k = número de loci y n_j = número de alelos detectados por locus. Esta medida brinda información complementaria a la información sobre polimorfismo. Requiere únicamente el conteo del número de alelos por locus y el cálculo del promedio⁷⁰.

4.6.2. Frecuencias alélicas de aloenzimas para cada loci polimorfo por población. Este parámetro es una medida de la presencia de un alelo en una población y se calcula mediante la fórmula:

$$P(A) = [2(AA) + (Aa)/2n].$$

Dos veces el número de genotipos homocigotos con ese alelo porque los homocigotos portan cada uno dos copias del mismo alelo, más el número de genotipos heterocigotos con ese alelo porque los heterocigotos portan solamente una copia de un alelo particular, dividido por dos veces el número total de individuos en la muestra porque cada individuo porta dos alelos por locus⁷¹.

4.6.3. Polimorfismo o tasa de polimorfismo. Mide la presencia de más de un alelo por locus. La frecuencia de los alelos de un locus debe ser menor o igual a 0.95.

$$P_j = q \leq 0.95$$

4.6.4. Los valores de heterocigosidad esperada (H_{exp}) y corregida ($H_{n.b.}$).

$$H_{exp} = 1 - \sum q^2$$

Donde q = frecuencia alélica. La heterocigosidad promedio de todos los loci es una estimación del grado de variabilidad genética en la población.

4.6.5. El estadístico índice de fijación de Wright según adecuación Weir y Cockerham⁷² (1984). Este parámetro permite medir la diferenciación genética entre poblaciones. Puede ser estimado como la correlación de pares de alelos entre individuos dentro de una subpoblación. Es útil para estudiar la estructura genética de las poblaciones de una misma especie. Tiene un intervalo teórico de 0 a 1, donde un número cercano a 1 indica una subdivisión entre las poblaciones

⁷⁰ LYNCH, M y MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. 2002, 241.

⁷¹ Ibid., p. 251.

⁷² WEIR, B. C. Y COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. 1984, 1358, 1370.

comparadas. En el uso del estimado F_{st} algunas veces resultan valores levemente negativos, que no son diferentes en significación que cero⁷³. Su cálculo es como sigue:

$$F_{st} = H_t - H_s / H_t$$

donde, $H_t = 2(q - q^2)$

q = frecuencia promedio del iemo alelo

4.6.6. Distancia genética de Nei⁷⁴ (1978). Las distancias genéticas son interpretadas como el número promedio de sustituciones del codón por locus, corregidos para múltiples aciertos, a partir del momento de separación de dos poblaciones⁷⁵ y pueden tomar valores entre cero e infinito.

Los parámetros mencionados anteriormente se obtuvieron con el paquete estadístico GENETIX v. 4.01 de 1998⁷⁶.

⁷³ SUNDEN, S.L.Y DAVIS, S.K, .Op. cit. p. 520.

⁷⁴ NEI, M. Op. Cit. 114.

⁷⁵ AVISE, J.C. Op. Cit. p. 158.

⁷⁶ BELKIR, K., BORSA, P., GOUDET, J., CHIKNI, L., Y BONHOMME, F. GENETIX, logiciel sous Window TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier (France). 1998

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Con el análisis morfométrico realizado a las muestras de camarón blanco *Penaeus vannamei* en la población natural y en la de cultivo se observaron las características mas relevantes en esta especie: poseen un color blanquecino, antenas de color rojo, un rostro corto con dientes en el borde dorsal y uno o dos en el borde ventral y diez patas en el cefalotórax.

Este análisis permitió obtener la siguientes información promedio:

Tabla 5. Promedios de peso y talla de las muestras de *Penaeus vannamei*

ANALISIS MORFOMETRICO		
PROMEDIOS	POBLACION NATURAL	POBLACION DE CULTIVO
Peso Total (g)	31.24 ± 1.2	8.91 ± 10.9
Peso del cefalotorax(g)	10.42 ± 0.6	3.32 ± 8.8
Peso del abdomen(g)	20.45 ± 0.9	5.57 ± 7.5
Largo Total (cm)	17.3 ± 0.9	12 ± 2.5
Largo del abdomen(cm)	10.75 ± 1.4	10 ± 2.5
Largo del cefalotorax(cm)	6.55 ± 1.1	2 ± 1.9

La muestras de la población natural y la de cultivo se diferencian entre si en el peso y la talla. El peso y el largo promedio de la población de cultivo es menor que el de la población natural debido a que las de cultivo tenían 11 semanas de haberse sembrado por tanto estos ejemplares no alcanzaron el peso máximo (12-17g) mientras que la muestra de la población natural fue muy heterogénea ya que el tiempo de crecimiento de estos es indefinido.

En trabajos realizados en la costa Ecuatoriana con *Penaeus vannamei* se ha encontrado que estos tienen un peso promedio de 45,8 g ±15,8 g⁷⁷ que está por encima del obtenido en esta investigación debido a que los muestreos se hicieron de manera aleatoria.

⁷⁷ FRESNEDA, R.A. "Determinación de la estructura poblacional de *Litopenaeus vannamei* mediante ISSRs a lo largo de la costa ecuatoriana". Guayaquil. Ecuador. 2003, 15, 69.

5.2. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

5.2.1. Aspectos importantes en el desarrollo de la técnica MLEE. Para llevar a cabo la técnica de Electroforesis de Aloenzimas Multilocus es necesario tener en cuenta aspectos dentro del procedimiento:

- Los vidrios que sostienen el gel deben estar completamente limpios antes de ser utilizados para evitar interferencias que afecten los resultados y para facilitar el desmonte del gel después de la corrida y realizar la tinción.
- Los reactivos deben ser de carácter analítico, se deben conservar en refrigeración y el persulfato de amonio debe ser preparado en el instante en que se va a usar.
- Las soluciones para obtener los geles deben prepararse en el momento en que se van a verter a los vidrios, estas soluciones deben agitarse muy bien para lograr un gel uniforme.
- El buffer de la cámara debe renovarse continuamente para lograr una corriente eléctrica y un voltaje óptimos y para garantizar que el frente de corrida alcance la distancia adecuada.
- La aplicación de las muestras debe realizarse con mucho cuidado para evitar la contaminación de un pozo con otro, y con la mayor rapidez posible para impedir que la muestra se difunda en el buffer de cámara.
- Las tinciones deben realizarse siguiendo estrictamente la metodología descrita para asegurar la aparición de las bandas.

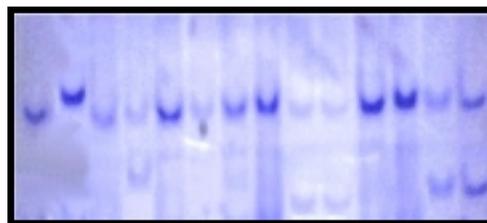
5.2.2. Movilidades electroforéticas en los sistemas enzimáticos

5.2.2.1. Proteínas Totales (Pt-1 y Pt-2). Se analizaron dos loci para este sistema enzimático Pt-1 y Pt-2 los cuales mostraron dos bandas con diferentes movilidades para la población natural y hasta diez bandas para la población de cultivo, de las cuales solo dos mostraron variación.

Figura 6. Actividad enzimática de las proteínas totales en músculo de *Penaeus vannamei* en geles de poliacrilamida



Muestras de población natural. En el último carril derecho muestra de referencia.



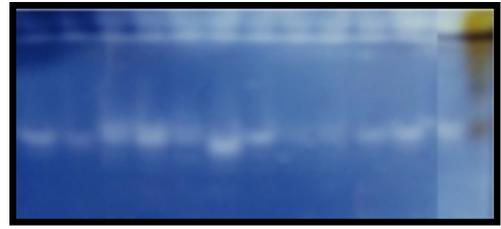
Muestras de población de cultivo. En el último Carril derecho muestra de referencia.

5.2.2.2. Amilasa (Ami-1 y Ami-2). Para este sistema enzimático se analizaron dos loci Ami-1 y Ami-2 los cuales mostraron dos bandas con diferentes movilidades en la población natural y cinco para las muestras de cultivo de las cuales sólo dos mostraron variación.

Figura 7. Actividad enzimática de Amilasa en hepatopancreas y ojos de *Penaeus vannamei* en geles de poliacrilamida.



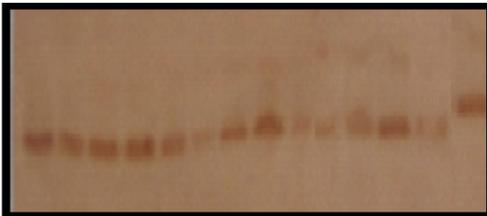
Muestras de población natural. En el último carril derecho muestra de referencia.



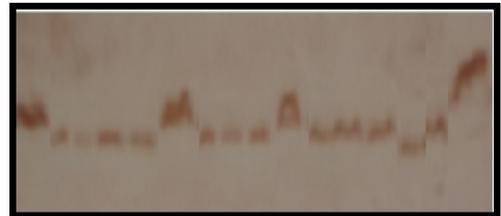
Muestras de población de cultivo. En el último Carril derecho muestra de referencia.

5.2.2.3. Peroxidasa. Se obtuvo solo una banda con diferentes movilidades tanto para la población natural como para la de cultivo indicando homocigosidad.

Figura 8. Actividad enzimática de Peroxidasa en hepatopancreas y ojos de *Penaeus vannamei* en geles de poliacrilamida



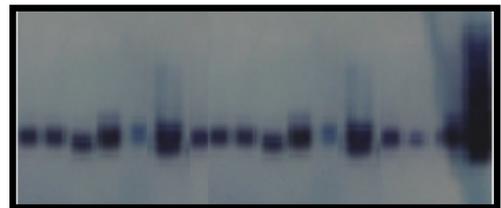
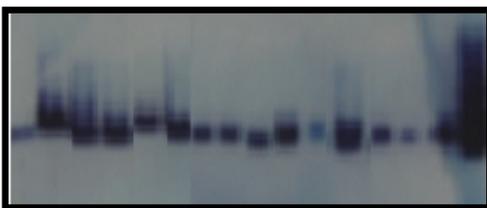
Muestras de población natural. En el último carril derecho muestra de referencia.



Muestras de población de cultivo. En el último Carril derecho muestra de referencia.

5.2.2.4. Glutamato Deshidrogenasa. Se obtuvo una sola banda con diferentes movilidades para ambas poblaciones lo que indica la homocigosidad de los alelos.

Figura 9. Actividad enzimática de GDH en músculo de *Penaeus vannamei* en geles de poliacrilamida

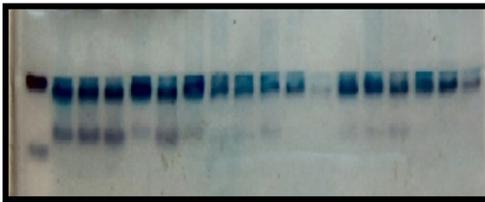


Muestras de población natural. En el último carril derecho muestra de referencia.

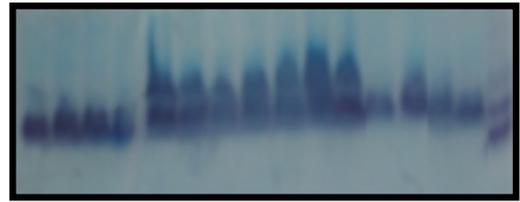
Muestras de población de cultivo. En el último Carril derecho muestra de referencia.

5.2.2.5. Lactato Deshidrogenasa (Ldh-1 y Ldh-2). Se analizaron dos loci para este sistema enzimático Ldh-1 y Ldh-2 los cuales mostraron dos bandas con diferentes movilidades tanto para la población natural como para de cultivo.

Figura 10. Actividad enzimática de LDH en músculo de *Penaeus vannamei* en geles de poliacrilamida



Muestras de población natural. En el último carril izquierdo muestra de referencia.



Muestras de población de cultivo. En el último Carril derecho muestra de referencia.

5.2.2.6. Aspartato Deshidrogenasa. Se obtuvo una banda con varias movilidades indicando homocigosidad de los alelos.

Figura 11. Actividad enzimática de ASD en músculo de *Penaeus vannamei* en geles de poliacrilamida



Muestras de población natural. En el último carril derecho muestra de referencia.



Muestras de población de cultivo. En el último Carril derecho muestra de referencia.

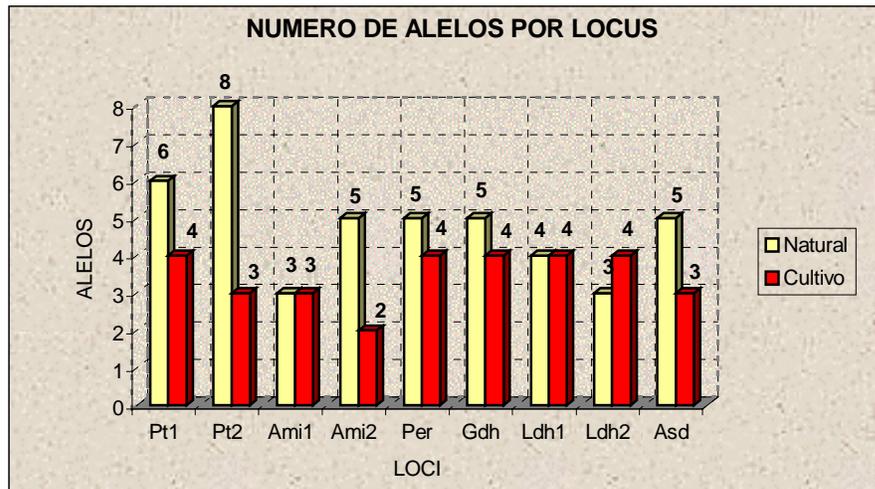
5.3. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS

5.3.1. Variabilidad genética. El análisis genético abarcó el estudio de 9 loci enzimáticos que codifican para 6 enzimas, todos los cuales son polimórficos y presentaron suficiente actividad y definición en los diferentes tejidos analizados.

Con los datos obtenidos de la lectura de los geles se construyeron las matrices de las dos poblaciones en estudio (anexo C y D). Los perfiles generados fueron

introducidos en el software Genetix versión 4.01 generando los siguientes resultados:

Gráfica 1. Número total de alelos por locus para la población natural y de cultivo.



La población de cultivo presentó un número mayor de alelos en el locus Ldh-2 y la natural mostró un mayor número de alelos para los loci Pt-1, Pt-2, Ami-2, Per, Gdh y Asd. En los loci Ami-1 y Ldh1 se encontró el mismo número de alelos para las dos poblaciones.

El número promedio de alelos por locus para la población natural fue 4.89 y para la de cultivo fue de 3.44. Como la población natural posee un valor promedio de alelos mayor esto permite tener una idea preliminar acerca de que el polimorfismo será mayor que en la de cultivo.

5.3.2. Diversidad genética dentro y entre poblaciones

5.3.2.1. Frecuencias alélicas. Las frecuencias alélicas obtenidas indican la proporción de todos los alelos presentes en el gen que codifica cada una de las isoenzimas. Además sirve como base para la determinación del polimorfismo presente en una población.

Tabla 7. Frecuencias alélicas y Heterocigosidades esperadas bajo la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg⁷⁸ ($H_{exp.}$) y heterocigosidades corregidas para la inclinación de muestreo ($H_{n.b.}$) por locus para la población natural.

FRECUENCIAS ALELICAS DE LA POBLACION NATURAL

⁷⁸ STURTEVANT, A.H.A. Op. Cit. p. 114

ALELOS/LOCUS	Pt-1	Pt-2	Ami-1	Ami-2	Per	Gdh	Ldh-1	Ldh-2	Asd
1	0.200	0.200	0.125	0.100	0.125	0.075	0.200	0.286	0.175
2	0.075	0.025	0.375	0.225	0.225	0.525	0.225	0.429	0.125
3	0.125	0.025	0.500	0.125	0.225	0.125	0.400	0.286	0.300
4	0.325	0.125		0.400	0.250	0.175	0.175	0.000	0.200
5	0.200	0.250		0.150	0.175	0.100			0.200
6	0.075	0.150							
7		0.150							
8		0.300							
Hexp.	0.566	0.807	0.594	0.741	0.790	0.663	0.719	0.653	0.784
Hn.b.	0.573	0.817	0.601	0.751	0.800	0.671	0.728	0.677	0.794

Tabla 8. Frecuencias alélicas y Heterocigosidades esperadas bajo la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg⁷⁹ (Hexp.) y heterocigosidades corregidas para la inclinación de muestreo (Hn.b) por locus para la población de cultivo.

FRECUENCIAS ALELICAS DE LA POBLACIÓN DE CULTIVO									
ALELOS/LOCUS	Pt-1	Pt-2	Ami-1	Ami-2	Per	Gdh	Ldh-1	Ldh-2	Asd
1	0.600	0.075	0.750	0.350	0.225	0.325	0.400	0.047	0.263
2	0.225	0.225	0.175	0.650	0.400	0.275	0.350	0.095	0.342
3	0.150	0.700	0.075	0.000	0.150	0.125	0.150	0.285	0.395
4	0.025	0.000		0.000	0.225	0.275	0.100	0.571	0.000
5	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000			0.000
6	0.000	0.000							
7		0.000							
8		0.000							
Hexp.	0.787	0.454	0.401	0.455	0.716	0.728	0.685	0.580	0.778
Hn.b.	0.797	0.460	0.406	0.460	0.725	0.737	0.694	0.594	0.788

En el sistema de proteínas totales, el locus Pt-1 mostró seis alelos en la población natural siendo el más frecuente el alelo 4 y la de cultivo presentó cuatro alelos de los cuales el más frecuente fue el alelo 1. En el locus Pt-2 aparecieron ocho alelos en la población natural siendo el alelo ocho el más frecuente y la de cultivo presentó tres alelos en donde el alelo 3 tiene mayor frecuencia.

En el sistema de amilasa, el locus Ami-1 mostró tres alelos; en la población natural el más frecuente fue el alelo 3 y en la de cultivo el alelo 1. Para Ami-2 se encontró cinco alelos en la población natural siendo más frecuente el alelo 4 y la de cultivo mostró dos alelos de los cuales el dos fue el más frecuente.

⁷⁹ Ibid., p. 115.

En la enzima Peroxidasa el alelo más frecuente fue el 4 de cinco que presentó la población natural. En la de cultivo el alelo más frecuente fue el 2 de cuatro.

La enzima Glutamato deshidrogenasa, Gdh presentó cinco alelos siendo el 2 el más frecuente en la población natural, la de cultivo mostró cuatro alelos de los cuales el 1 fue el de mayor frecuencia.

En el sistema Lactato deshidrogenasa, el locus Ldh-1 mostró cuatro alelos en la población natural y de cultivo siendo los más frecuentes el 3 y el 1 respectivamente. El locus Ldh-2 presentó tres alelos siendo el 2 el de mayor frecuencia en la población natural y la de cultivo mostró cuatro alelos de los cuales el 4 fue el más frecuente.

En la enzima Aspartato deshidrogenasa la población natural presentó cinco alelos y la de cultivo tres siendo mas frecuente el alelo 3.

5.3.2.2. Polimorfismo o tasa de polimorfismo P_j . Teniendo en cuenta que todos los loci analizados presentaron más de un alelo por locus se considera que todos son polimorficos ya que para que un gen sea polimorfico en una población debe existir más de un alelo, además la frecuencia de uno de sus alelos debe ser menor o igual a 0.95. $P_j = q \leq 0.95$ ⁸⁰.

Con los datos de frecuencias alélicas y número promedio de alelos por locus se encontró que el porcentaje de polimorfismo en la población natural fue mayor que en la de cultivo lo cual coincide con lo esperado. Esta afirmación se explica con base a dos aspectos: el primero es la relación entre el genotipo y el fenotipo, ya que por estar estrechamente asociados las proteínas conforman la estructura de los organismos lo que significa que son responsables de lo que vemos, el fenotipo.

El segundo aspecto es la dependencia de la variación genética con la historia y el medio ambiente, es decir que se espera que una población natural por estar expuesta a un mayor número de factores presente mayor polimorfismo como respuesta a los cambios generados en su entorno. Las poblaciones de cautiverio también están expuestas a estos factores sin embargo, en este lugar se puede hacer un mayor control de ellos.

En la Bahía de Tumaco los factores más relevantes que han influido en la diversidad genética son la sobreexplotación, la destrucción y contaminación de los hábitats naturales como la ocurrida el 3 de julio de 1998 donde fueron vertidos al Océano Pacífico 18 mil barriles de crudo tras una ruptura en el Oleoducto Transandino Ecuatoriano. Un informe demuestra que aún existen altas concentraciones del material, especialmente en la población de El Rompido, el puerto de Cabo Manglares y el estero denominado La Bocana, al sur de Tumaco.

⁸⁰ LYNCH, M y MILLIGAN, B.G. Op. Cit. p. 169.

También se ha notado una disminución notable de especies que eran tradicionales en la zona costera, como por ejemplo el camarón tití, el camarón tigre, el camarón blanco, el pargo rojo, la jaiba, peces como la lisa, la sierra y el canchimala. En este tipo de accidentes se sabe que usualmente se ven afectados desde huevos y larvas hasta animales adultos, pero es necesario un estudio más detallado para conocer la magnitud exacta del daño⁸¹.

Un estudio realizado por Fresneda⁸² con *P. vannamei* en la costa Ecuatoriana reporta un porcentaje de polimorfismo entre 50 y 85,1% utilizando ISSRs. Estudios realizados en *L. vannamei*, *P. monodon* y *L. Schmitti* utilizando RAPDs^{83,84,85,86,87,88} reportaron 39% y 77% de bandas polimórficas. Tassanakajon⁸⁹ et al, reportaron 57.1% y Espinosa⁹⁰ et al, reportan un 87,5% de polimorfismo. En esta investigación se obtuvo un polimorfismo del 100% ya que se trabajó con loci polimórficos sin tener en cuenta los monomórficos, por tanto no se puede comparar este valor con los de otros estudios, sin embargo se espera que resultados de polimorfismo con estudios en los cuales se utilizan isoenzimas sea menor que utilizando marcadores de ADN porque estas son marcadores presumiblemente sujetas a selección natural por lo cual su polimorfismo es más bajo que los ISSRs que son marcadores neutrales. Además en investigaciones como las de Lester⁹¹, Muller y Latter,⁹² Harris et al⁹³, Sunden y Davis⁹⁴, Benzie et al⁹⁵, García et al⁹⁶, De la Rosa-Vélez et al⁹⁷, Sugama et al⁹⁸, en las cuales utilizaron isoenzimas se observan porcentajes de polimorfismo inferiores (menores del 50%) que en el caso de ISSRs.

⁸¹ TAVERA, H. Op. Cit. p. 2

⁸² FRESNEDA, R.A. Op. Cit. 28.

⁸³ LESTER, J. L. Op. Cit. p. 54

⁸⁴ MULLER, J.C, y LATTER, B.D.Op. cit. p.616.

⁸⁵ HARRIS , S.E.G., DILLION, R.T., SANDIFER, P.A. y LESTER. L.J. Electrophoresis of isozymes in cultured *Penaeus vannamei*. 1990, 330, 332.

⁸⁶ SUNDEN, S. L Y DAVIS, S. K. Op. Cit. p. 2.14

⁸⁷ BENZIE, J. A, BALLMENT, E. Y FRUSHER, S. Op. Cit. p. 300

⁸⁸ GARCÍA, D. K, FAGGAR, M.A, RHOADES, L. Y ALCIVAR-WARREN. Op. Cit. p. 294

⁸⁹ TASSANAKAJON, A., JARAYABHAND, P. y BOONSAENG, V. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 1997. 110-115.

⁹⁰ ESPINOSA, G.U., BECKER, U., BORELL, Y., ROMO, J., DIAZ, R., AZANZA, J. Y DE DIOS, R. Op. Cit. p. 540.

⁹¹ LESTER, L.J. Op cit. p. 356.

⁹² MULLER, J.C Y LATER, B.D. Op. Cit. p. 967.

⁹³ HARRIS , S.E.G., DILLION, R.T., SANDIFER, P.A. y LESTER. L.J. Op. Cit. p. 270.

⁹⁴ SUNDEN, S.L.Y DAVIS, S.K. Op. Cit. p. 211.

⁹⁵ BENZIE, J.A.H., FRUSHER, S. y. BALLMENT, E. Op. Cit. 533.

⁹⁶ GARCIA, D.K., FAGGART, M.A., RHOADES, L. y ALCÍVAR-WARREN A. Op. Cit. p. 308.

⁹⁷ DE LA ROSA-VELEZ, J., ESCOBAR-FERNANDEZ, R. CORREA, F. Op. Cit. p. 763.

⁹⁸ SUGAMA, K. BENZIE, J.A.H y BALLMER, E. Genetic variation and population structure of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Indonesia. 2002, 37, 205.

5.3.2.3. Heterocigosidad Esperada. Los rangos de heterocigosidad estuvieron entre 0.6632 y 0.8104 para la población natural y entre 0.4662 y 0.7154 para la población de cultivo, lo que indica que existe una alta probabilidad de que, en un locus único, cualquier par de alelos, escogidos al azar de la población sean diferentes entre si y por tanto se considera que existe una alta heterocigosidad en ambas poblaciones. Además estos valores son una estimación del grado de variabilidad genética en cada población.

Tabla 9. Valores de variabilidad genética de las dos poblaciones estudiadas en *Penaeus vannamei*

Población	HETEROCIGOSIDAD MEDIA			A
	Hexp.	Hn.b	P(0.95)	
Natural	0.7258 (0.0745)	0.7368 (0.0736)	1	4.89
Cultivo	0.5826 (0.1230)	0.5908 (0.1246)	1	3.84

En la Tabla 9 se observa que la proporción de loci polimorfos P (donde la frecuencia del alelo más común es 0.95), tiene un valor de 1 porque todos los loci analizados en ambas poblaciones fueron polimorficos. También se observan los valores de variabilidad genética para las poblaciones estudiadas, destacándose la población natural como la de mayor variabilidad (Hn.b = 0.7368), con promedio de 4.89 alelos por locus (A), mientras que la población de cultivo muestra menor variabilidad.

Rangos de heterocigosidad reportados por Espinosa⁹⁹ et al, para isoenzimas (0,26 y 0,35) y Fresneda¹⁰⁰ (entre 0,14 y 0,28) son valores altos, como los encontrados en esta investigación. Por otra parte, los valores encontrados de heterocigosidad son más alto que los encontrados por Labacena¹⁰¹ et al, con $He < 0.2$, lo mismo que con lo encontrado por Mato¹⁰² con 7 loci ($He < 0.3$), ya que en el presente trabajo solo se trataron loci polimórficos en cuyo caso el valor de heterocigosidad no es completamente confiable por no tomar en cuenta los loci tanto polimórficos como los monomórficos para estimar frecuencias alélicas¹⁰³.

La heterocigosidad es importante en poblaciones naturales, debido a su característica de aportar un gran espectro de genotipos para responder adaptativamente a cambios en las condiciones del medio. Adicionalmente

⁹⁹ ESPINOSA, G.U., BECKER, U., BORELL, Y., ROMO, J., DIAZ, R., AZANZA, J. Y DE DIOS, R. Op. Cit. p. 549.

¹⁰⁰ FRESNEDA, R. A. Op. Cit. p.30.

¹⁰¹ LABASENA, M.E., TORRES, M. Y ESPINOSA, G. Op. Cit. p. 48.

¹⁰² MATO, J. L. Distancia y variabilidad genética entre poblaciones de *Penaeus schmitti*. Univ. de La Habana. 1992, 24, 28.

¹⁰³ HARTL, D.L., y CLARK A.G. Op. Cit. p. 325.

individuos con mayores heterocigosidades, por lo general, son superiores en fertilidad y resistencia de enfermedades¹⁰⁴ (Beardmore et al., 1997).

5.3.2.4. El estadístico índice de fijación de Wright. Los estadísticos F (Fis, Fit y Fst) permiten el análisis de estructura en poblaciones subdivididas. También se pueden emplear para medir la distancia genética entre las subpoblaciones, un concepto que se fundamenta en la idea de que aquellas subpoblaciones que no presentan apareamiento entre si tendrán frecuencias alélicas diferentes a las de la población total. El índice estadístico involucrado Fst mide el grado de diferenciación génica entre poblaciones en función de las frecuencias alélicas.

Tabla 10. Índice estadístico de fijación de Wright para cada locus en *Penaeus vannamei*.

ESTADISTICO Fst									Fst
Pt-1	Pt-2	Ami-1	Ami-2	Per	Gdh	Ldh-1	Ldh-2	Asd	
0.170	0.328	0.365	0.251	0.025	0.071	0.057	0.244	0.067	0.181

El índice de Fijación Fst promedio indica que no existe un flujo génico importante entre ambas poblaciones comparadas ya que valores de Fst entre 0,15 a 0,25 indican una gran diferenciación poblacional.

El valor de Fst 0.181 encontrado en este estudio es comparable con otros realizados en *F. californiensis* (Fst =0,182), *L. stylirostris* (Fst = 0,372)¹⁰⁵ y *F. notialis* (Fst =0,13)¹⁰⁶ con los cuales se llegó a la conclusión de la existencia de una divergencia entre poblaciones de las especies mencionadas. En cambio en otras especies de Peneidos se han reportado baja o nula diferenciación poblacional. Espinosa¹⁰⁷ encontraron Fst entre 0,005 y 0,050 a través de isoenzimas y microsatélites en poblaciones de *L. schmitti*¹⁰⁸ y en *Pandalus borealis* reportan Fst sobre todos los locus de 0,01.

La principal razón encontrada para definir las dos poblaciones es la presencia de una barrera física importante entre ellas, que impide el flujo genético. Sin embargo la diferenciación no es muy grande (valores mayor a 0.25) debido a que los

¹⁰⁴ BEARDMORE, J.A., MAIR, G.C. y LEWIS, R.I.. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. 1997, 829-839.

¹⁰⁵ DE LA ROSA-VELEZ. Op. Cit. p. 154

¹⁰⁶ GARCÍA-MACHADO, E., A. ROBAINAS, G. ESPINOSA, M., J. PÁEZ, N., y MONNEROT, M. Allozyme and mitochondrial DNA variation in Cuban populations of the shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea: Decapoda). 2001, 701 ,707.

¹⁰⁷ ESPINOSA. Op. Cit. p. 231

¹⁰⁸ SÉVIGNY, J.M., SAVARD, L. y PARSONS, D.G. Genetic characterization of the northern shrimp, *Pandalus borealis*, in the northwest Atlantic using electrophoresis of enzymes. Journal of Northwest Fisheries Sciences. 2000, 161, 175.

progenitores de las población de cultivo han sido adaptados de ejemplares de diferentes poblaciones naturales de la misma zona.

5.3.2.5. Distancias genéticas de Nei¹⁰⁹ (1978). La distancia genética encontrada al comparar las dos poblaciones en estudio indicó ser alta con un valor de 0.612. Fresneda¹¹⁰ reporta una distancia genética de 0,028 entre las localidades de Nicaragua y Atacames (Norte de la costa Ecuatoriana). El valor obtenido comparado con este es superior indicando que existen diferencias significativas entre las dos poblaciones estudiadas, debido a que estas se ubican en sitios geográficos diferentes separados por una barrera física que impide el flujo genético y a las características del hábitat de cada una de las poblaciones.

¹⁰⁹ NEI, M. Op. Cit. p. 569.

¹¹⁰ FRESNEDA, R. A. Op. Cit. p. 32.

6. CONCLUSIONES

Se estandarizó la Técnica de Electroforesis de Aloenzimas Multilocus para el camarón blanco *Penaeus vannamei*, determinando las condiciones óptimas para revelar la actividad enzimática de cada sistema.

Utilizando la técnica de Electroforesis Aloenzimas Multilocus fue posible realizar la caracterización genética de *Penaeus vannamei* de una población natural y una de cultivo de Tumaco (N).

A través de MLEE se encontró una alta diversidad genética, con heterocigidades y polimorfismos altos en ambas poblaciones de *Penaeus Vannamei*.

No existen diferencias significativas en la diversidad genética entre las dos poblaciones.

De acuerdo a los valores obtenidos mediante los cálculos del Índice de Fijación (F_{st}) no existe un flujo génico entre las poblaciones en estudio, lo que indica la existencia de dos grupos poblacionales totalmente diferentes como resultado de la presencia de una barrera física existente entre ellas donde no hay un libre flujo genético entre las poblaciones.

Se encontró una distancia genética alta entre las dos poblaciones indicando que existe una variabilidad genética apreciable entre ellas.

Una de las características importantes que debe tener un marcador molecular es su reproducibilidad, la cual se pudo observar en los movilidades obtenidas de las muestras por triplicado analizadas en el presente estudio (66%).

7. RECOMENDACIONES

El bajo número de sistemas enzimáticos analizados no permite inferir conclusiones definitivas, por lo que es importante trabajar con una mayor cantidad de ellos.

Teniendo en cuenta que en general la técnica de Electroforesis de aloenzimas Multilocus ha mostrado limitaciones en cuanto al número de loci analizados y a la baja diversidad genética en comparación con marcadores de ADN, se sugiere utilizar la técnica de microsatelites ISSR por su rapidez y fácil manejo además presentan una alta variabilidad y densidad de mapeo haciendo a ésta técnica superior a otros marcadores en investigación de variación genética.

Es importante también y trascendental obtener ejemplares de otras poblaciones naturales y cautivas para establecer diferencias genéticas confiables entre ellas, como también trabajar con un tamaño muestral mayor, para evitar sesgos en los resultados.

BIBLIOGRAFIA

- ALONSO, B.M., JOO, L. Y ESPINOSA, G. Análisis Electroforético y caracterización bioquímica de las esterasas del músculo en *Penaeus notialis* y *penaeus schmitti*. 1987, 21, 74p.
- ALVARADO. R, COVEL. C, FRIEDEL. H Y RINGUELET, R. Enciclopedia El mundo de los animales v.2. Barcelona Madrid. 1989. 129,139p
- AVISE, J.C. Molecular Markers, natural history and evolution. 1994. 109, 214p.
- BALL, A, LEONARD S., y CHAPMAN, W.R.. Characterization of (GT)_n microsatellites .from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). 1998. 1251,1253p.
- BAUTISTA, Carmen. *Crustaceos*. Tecnología de cultivo. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España. 1991.
- BEARDMORE, J.A., MAIR, G.C. y LEWIS, R.I.. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. 1997. 829-839.
- BELKIR, K., BORSA, P., GOUDET, J., CHIKNI, L., Y BONHOMME, F. GENETIX, logiciel soud Window TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier (France). 1998
- BENZIE, J.A.H.. Genetic improvement of prawns. 1998. 201, 425p.
- BENZIE, J.A.H., FRUSHER, S. y BALLMENT, E. Geographical variation in allozyme frequencies of *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda) populations in Australia. Australian Journal of Marine and Freshwater Research. 1992. 715, 925p.
- BEROVIDES, V. y ALFONSO, M. Biología Evolutiva. Ed. pueblo y Educación. 1995, 680p.
- CADENA DE CAMARÓN DE CULTIVO. www.colombiacompite.gov.co
- CARR. W.K, FJALESTAD, D. GODIN, J. SWINGLE, J. SWEENEY, y GJEDREM, T. Genetic variation in weight and survival in a population of specific pathogen-free shrimp. 1996. 114, 526p.
- CARVALHO, G.R. y HAUSEN, L. Molecular genetics and stock concept in fisheries. *Revista Fish. Biología*. Fish. 4. 1994. pp 351-373.

COLCIENCIAS. Agenda y novedades. www.Colciencias.com. Septiembre 18 del 2003.

DAVIS, B. J. Electroforesis, parte 2. 1964. 402, 421p.

DE LA ROSA-VELEZ, J., ESCOBAR-FERNANDEZ, R. CORREA, F. Genetic structure of two commercial *Penaeids* from the gulf of California, as revealed by allozyme variation. 2000. 674, 883p.

ESPINOSA, G.U., BECKER, U., BORELL, Y., ROMO, J., DIAZ, R., AZANZA, J. Y DE DIOS, R. Variación genética y morfológica en poblaciones naturales y cautivas de camarón blanco *Litopenaeus schimitti* en Cuba. 2002. 778, 984p.

ESTOUP, A., ROUSSET, F., MICHALAKIS, Y., COURNUET, J. M., ADRIAMANGA, M. y GUYOMARD, R. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: un case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). 1998 Mol. Ecol. 339-353, 553p.

EVANS, C. L. Y TORRE, F. J. SDS-Polyacrylamide gel Electrophoresis of Snake Venoms. 1983. 356, 1011p.

FALCONER, D Y MACKAY. Introduction to quantitative genetics. 1996. 2110, 4646p.

FAO, Species identification sheets. Shrimps and prawns www.fao.org/

FRESNEDA, R.A. "Determinación de la estructura poblacional de *Litopenaeus vannamei* mediante ISSRs a lo largo de la costa ecuatoriana". Guayaquil. Ecuador. 2003, 16, 69p.

GARCIA, D.K., FAGGART, M.A., RHOADES, L. y ALCÍVAR-WARREN A. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. 1994. 270, 349p.

GARCÍA-MACHADO, E., A. ROBAINAS, G. ESPINOSA, M., J. PÁEZ, N., y MONNEROT, M. Allozyme and mitochondrial DNA variation in Cuban populations of the shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea: Decapoda). 2001. 701, 707p.

GRANT, W. S. Y UTTER, F. M. Biochemical genetic variation in walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) and population structure in the southern Bering Sea and Gulf of Alaska. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1980, 1093, 1100p.

GRIFFITHS, A.J., GELBART, W.M. MILLER, J.H y LEWONTIN, R.C. Modern Genetic Analysis. 1999. 301, 612p.

- HARTL, D.L., y. CLARK A.G.. Principles of Population Genetics. Associates, Massachusetts, EE.UU.1997. 201, 451p.
- HARRIS , S.E.G., DILLION, R.T., SANDIFER, P.A. y LESTER. L.J. Electrophoresis of isozymes in cultured *Penaeus vannamei*. 1990. 330, 332p.
- HEDGECOCK, D.. SHLESER R.A, y. NELSON, I.C. Genetics. 1982, 283, 403.
- HOELZEL, A.R. Molecular Genetic Analysis of Populations, a Practical Approach. 1998. 236, 612p.
- JIMÉNEZ, P. y COLLADA, C. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. 2000. 237, 870p.
- KING, J.D Y OHTA, T.H. Polyallelic mutational equilibria. Genetics. 79. 1975.
- KREITMAN, M., y AKAHI, H. Molecular evidence for natural selection. Annual Review of Ecology Systematic 1995. 403, 422p.
- LABASENA, M.E., TORRES, M. Y ESPINOSA,G. Variabilidad y distancia genética en especie de *Penaeus*. *Revista de investigación*. Vol 1. Marzo 15. 1994. 36, 60p.
- LESTER, L.J. Population genetics of Peneids shrimps from de Gulf of México. J. Hered. 1979. 175, 480p.
- LESTER, L.J Y PANTE M.J. Genetics of *Penaeus* species. 1992. 29, 152p.
- LIGHTNER, D. V. Disease of cultured penaid shrimp. In *Crustacean Acuaculture* Boca Ratón, Florida: CRC Press. 1992. 289, 540p.
- LUQUE, E. Bioquímica estructural. Universidad de Nariño. Pasto. 1995. 245, 268p.
- LYNCH, M y MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. 1995, 205, 311p.
- MARTINEZ CORDOBA, L. R. Camaronicultura. Bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos. Centro de investigación Científicas y Tecnológicas de la universidad de Sonora. México. 1993. 210, 547p
- MATO, J. L. Distancia y variabilidad genética entre poblaciones de *Penaeus schmitti*. Trabajo de Diploma. Univ. de La Habana. 1992
- MORIZOT, D. C. y SCHMIDT, M. E. Starch gel electrophoresis and histochemical visualization of proteins. Electric and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management, D. H. Whitmore Ed. U.S.A. 1990. 218p.

- MULLER, J.C Y LATER, B.D. Genetic variation and evolutionary relation ships within a group of thirty species of *Penaeid* prawns. 1980. 904, 1916p.
- NEI, M. Estimation of heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. 1978. 583, 590p.
- PASDAR, M.,PHILIP, D.P., Y WHITT, G.S. Linkage relationships of nine enzyme loci sunfishes (*Iepomis*; *centrarchidae*). *Genetics*. 1984. 435, 1446p.
- PARK, L. Y MORAN, P. Developments in molecular genetics techniques in fisheries. *Molecular Genetis in Fisheries*. Chapman and Hall, edits. London. 1995. 1, 22p.
- PÉREZ, F. Generación y manipulación de la diversidad genómica en *Penaeus vannamei* para la acuicultura del Ecuador. 1999. 210, 415p.
- PHILIPP, D.P., J.M. EPIFANIA, y M.J.. Point/counterpoint: conservation genetics and current stocking practices- are they compatible? *Aquatic Fisheries Sciences*. 1993. 15, 369p.
- POLANSKI, H.F. Applications of Genetic Marker Typing in disputed parentage cases. *Principles of Transfusion Medicine*. 1991. 124, 547p.
- QUELLER, D.C.,STRASSMAN J.E. y HUGHES C.R. Microsatellies and kinship. Elsevier Sciencie publishers. Ltda. 1993. 21, 54p.
- RICHARDSON, B.U., BAVERSTOCK, P.R. Y ADAMS, M. A handbook for animal systematics and population studies. Academic Press. New York. 1986. 87, 258p.
- RYMAN, N. Genetic Population Structure. 1997. 210, 538p.
- SÉVIGNY, J.M., SAVARD, L. y PARSONS, D.G. Genetic characterization of the northern shrimp, *Pandalus borealis*, in the northwest Atlantic using electrophoresis of enzymes. *Journal of Northwest Fisheries Sciencies*. 2000. 161, 175p.
- SUGAMA, K. BENZIE, J.A.H y BALLMER, E. Genetic variation and population structure of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Indonesia. 2002. 37, 205p.
- SUNDEN, S.L.Y DAVIS, S.K. Evaluation of genetics in a domestic population of *Penaeus Vannamei* (Boone): A comparison with three naturals populations. *Aquaculture*. 1991. 131, 772p.
- STURTEVANT, A.H.A. History of Genetic. 2001. 187, 690p.

TAM, Y.K, Y CHU, K.H. Eletrophoretic study on the phylogenetic relation shrimps of some species of *Penaeus* and meta*Penaeus* from the south China sea. Journal crustacea biology. 1993. 697,705p.

TASSANAKAJON, A., JARAYABHAND, P. y BOONSAENG, V. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 1997. 110-115p.

TAVERA, H. En cercanías de Tumaco crudos indicios de contaminación. AUPEC-Univalle. Cali Colombia.1999. www. Ciencia al día. com. co

THOMPSON, J. S. y THOMPSON, M. W. Genética Médica, editorial salvat, 2° edición. 1975. 1120p.

VÁZQUEZ, A. Ecología y Formación Ambienta. 1993. 64, 211p.

WARD, R Y GREWE, P. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. Molecular Genetics in Fisheries. Chapman and Hall, edits. London. 1995. 29, 346p.

WEIR, B. C. Y COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution. 1984, 1358, 1370p.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating. 1965. 395, 420p.

WYBAN, J.A., J.S. SWINGLE, J.N. SWEENEY, y G.D. Specific pathogen-free *Penaeus vannamei*. 1993. 39, 145p.

ANEXOS

Anexo A. Peso y talla de las muestras de camarones de la población natural

POBLACION NATURAL						
Ejemplar	PESO (g)			LARGO (cm)		
	Total	Cefalotorax	abdomen	Total	Abdomen	Cefalotorax
1	26,65	7,15	19,05	17	11	6
2	23,8	8,4	15,4	15	8	7
3	65,59	26,9	38,69	20	10	10
4	23,11	7,89	15,22	13	8	5
5	34,98	12,2	22,78	18	10	8
6	33,9	12,68	21,22	18	10	8
7	29,5	9,3	20,3	17	9	8
8	27,27	8,83	18,44	17	8	9
9	39,92	19,82	20,1	17	9	8
10	26,48	8,3	18,18	16	8	8
11	32,55	10,81	21,74	19	10	9
12	42,5	15,33	27,17	20	10	10
13	23,9	7,26	16,64	17	10	7
14	26,6	9,3	17,3	16	6	10
15	27,2	7,96	19,24	17	10	7
16	15,96	5,56	10,4	14	7	7
17	15,17	5,17	10	15	8	7
18	66,19	55,48	10,71	24	15	9
19	27,33	8,85	18,48	17	11	6
20	19,98	5,33	14,65	17	11	6
21	28,11	10,4	17,71	17	11	6
22	34,79	11,9	0,23	19	13	6
23	34,55	13,65	20,9	19	13	6
24	39,06	14,24	24,82	20	13	7
25	20,47	9,97	18,5	17	10	7
26	29,16	8,46	20,7	17	11	6
27	23,16	7,43	15,73	15	8	7
28	27,52	9,23	18,25	17	12	5
29	32,55	4,24	28,31	20	16	4
30	27,56	1,1	26,46	18	10	8
31	37,76	10,8	26,96	21	15	6
32	42,5	4,3	38,2	17	12	5
33	21,1	1,94	19,16	11	8	3
34	26,6	1,17	25,43	14	11	3
35	42,45	15,05	27,4	16	11	5
36	23,8	7,24	16,56	14	11	3
37	39,92	14,64	25,28	22	16	6

38	42,45	4,3	38,15	20	16	4
39	19,98	5,33	14,65	17	12	5
40	27,52	8,81	18,71	17	12	5
x	31,24	10,42	20,45	17,3	10,75	6,55

Anexo B. Peso y talla de las muestras de camarón de la población de cultivo

CAMARONERA BALBOA						
Ejemplar	PESO (g)			LARGO (cm)		
	Total	Cefalotorax	Abdomen	Total	Abdomen	Cefalotorax
1	8,30	3,44	4,86	11	9	2
2	10,74	4,04	6,70	14	11	3
3	10,56	3,80	6,76	13	11	2
4	11,47	4,18	7,29	13	11	2
5	8,05	4,70	3,35	12	10	2
6	9,92	3,63	6,29	12	11	1
7	8,10	2,50	5,60	13	11	2
8	8,30	3,20	5,10	13	11	2
9	10,64	4,27	6,37	14	12	2
10	9,82	3,72	6,10	13	12	1
11	9,14	3,44	5,70	12	8	4
12	7,53	2,93	4,60	12	10	2
13	9,34	3,43	5,91	13	11	2
14	10,10	3,95	6,15	13	11	2
15	9,60	2,95	6,65	13	11	2
16	9,61	3,71	5,90	13	12	1
17	8,14	3,16	4,98	12	11	1
18	9,40	3,15	6,25	13	11	2
19	9,21	3,01	6,20	12	11	1
20	9,24	3,42	5,82	13	11	2
21	8,20	3,02	5,18	12	10	2
22	8,95	3,32	5,63	12	10	2
23	9,02	3,47	5,55	12	10	2
24	7,65	2,65	5,00	11	9	2
25	9,91	3,81	6,10	13	11	2
26	8,97	3,67	5,30	13	11	2
27	9,28	2,50	5,97	12	11	1
28	8,84	3,27	5,57	14	9	5
29	6,21	2,41	3,80	10	7	3
30	9,10	3,48	5,62	13	9	4
31	10,22	3,90	6,32	12	9	3
32	9,28	2,44	6,84	12	8	4
33	7,45	2,77	4,68	12	8	4
34	6,30	2,30	4,00	11	8	3
35	7,00	2,67	4,33	11	7	4
36	9,36	3,86	5,50	13	9	4

37	8,93	3,55	5,38	13	10	3
38	8,00	2,96	5,04	11	8	3
39	7,21	2,53	4,68	13	8	5
40	9,14	3,44	5,70	12	8	4
x	8,91	3,32	5,57	12	10	2

Anexo C. Matriz de alelos para la población natural

MATRIZ DE LA POBLACIÓN NATURAL								
Pt-1	Pt-2	Ami-1	Ami-2	Per	Gdh	Ldh-1	Ldh-2	Asd
003003	007007	003003	003003	004004	002002	002002	001001	004004
003003	007007	003003	003003	002002	002002	001001	001001	003003
004004	006006	003003	003003	005005	002002	002002	002002	005005
004004	004004	003003	003003	005005	002002	002002	002002	005005
004004	007007	003003	003003	005005	002002	002002	002002	004004
003003	008008	003003	004004	005005	002002	002002	002002	003003
004004	008008	003003	004004	005005	001001	001001	000000	001001
003003	007007	003003	004004	005005	001001	001001	000000	001001
004004	008008	003003	004004	005005	002002	003003	000000	001001
004004	008008	003003	004004	004004	002002	002002	000000	001001
004004	004004	003003	004004	004004	002002	003003	000000	003003
004004	004004	003003	004004	004004	001001	003003	000000	001001
004004	008008	003003	004004	004004	002002	003003	000000	002002
004004	008008	003003	004004	003003	002002	003003	000000	003003
004004	004004	003003	004004	004004	002002	003003	000000	003003
004004	004004	003003	004004	004004	002002	003003	000000	003003
003003	003003	003003	004004	004004	002002	003003	000000	003003
001001	001001	002002	004004	003003	004004	004004	000000	002002
001001	001001	002002	004004	003003	004004	004004	003003	004004
001001	001001	002002	004004	003003	004004	003003	003003	004004
001001	001001	002002	002002	003003	004004	003003	003003	003003
001001	001001	002002	002002	004004	004004	003003	001001	003003
002002	002002	002002	004004	003003	004004	003003	002002	003003
002002	007007	002002	002002	003003	002002	004004	003003	003003
002002	007007	002002	002002	004004	002002	003003	000000	003003
001001	001001	001001	001001	003003	002002	004004	000000	004004
001001	001001	001001	001001	003003	002002	003003	000000	002002
001001	001001	001001	001001	002002	002002	003003	000000	002002
005005	006006	001001	001001	002002	002002	003003	000000	004004
005005	006006	001001	002002	002002	005005	004004	000000	004004
004004	005005	002002	002002	001001	003003	002002	000000	002002

005005	006006	002002	002002	001001	003003	002002	000000	001001
005005	006006	002002	002002	001001	003003	004004	000000	004004
005005	006006	002002	002002	002002	003003	004004	000000	001001
005005	008008	003003	005005	002002	005005	002002	000000	005005
005005	008008	002002	005005	001001	005005	001001	000000	005005
006006	008008	002002	005005	001001	004004	001001	000000	005005
006006	008008	002002	005005	002002	005005	001001	002002	005005
006006	008008	003003	005005	002002	002002	001001	000000	005005
005005	008008	003003	005005	002002	003003	001001	001001	005005

Anexo D. Matriz de alelos para la población de cultivo

MATRIZ DE LA POBLACIÓN DE CULTIVO								
Pt-1	Pt-2	Ami-1	Ami-2	Per	Gdh	Ldh-1	Ldh-2	Asd
00002	003003	002002	002002	001001	001001	001001	001001	002002
001001	003003	002002	002002	001001	002002	002002	000000	002002
002002	003003	002002	002002	002002	002002	001001	002002	002002
002002	003003	002002	002002	002002	002002	003003	000000	002002
002002	003003	002002	002002	004004	002002	001001	003003	003003
001001	003003	002002	002002	001001	002002	001001	000000	002002
001001	002002	003003	002002	001001	002002	003003	000000	000000
001001	003003	003003	002002	001001	001001	003003	000000	000000
001001	002002	003003	002002	001001	001001	003003	000000	003003
001001	002002	001001	001001	001001	001001	001001	003003	003003
001001	003003	001001	001001	002002	002002	001001	003003	003003
001001	003003	001001	001001	002002	001001	001001	000000	003003
001001	003003	001001	001001	002002	002002	001001	000000	003003
001001	003003	001001	001001	002002	002002	001001	000000	003003
002002	003003	001001	001001	002002	001001	002002	000000	003003
002002	003003	001001	001001	002002	001001	002002	000000	003003
001001	001001	001001	001001	002002	002002	002002	000000	003003
003003	003003	001001	001001	002002	004004	002002	004004	002002
004004	003003	001001	001001	002002	004004	002002	004004	002002
001001	002002	001001	001001	002002	004004	002002	004004	002002
001001	003003	001001	001001	002002	004004	002002	004004	002002
003003	003003	001001	001001	002002	004004	003003	000000	002002
003003	003003	001001	001001	001001	004004	003003	000000	002002
002002	003003	002002	002002	001001	004004	002002	000000	001001
003003	003003	001001	002002	002002	004004	002002	004004	001001
002002	003003	001001	002002	004004	003003	002002	004004	001001

003003	003003	001001	002002	002002	003003	001001	000000	001001
003003	003003	001001	002002	003003	003003	002002	000000	001001
001001	002002	001001	002002	003003	004004	001001	004004	001001
001001	001001	001001	002002	004004	004004	004004	004004	003003
001001	001001	001001	002002	003003	003003	001001	004004	003003
001001	002002	001001	002002	004004	002002	004004	004004	001001
002002	003003	001001	002002	003003	004004	004004	004004	003003
001001	002002	001001	002002	003003	001001	001001	004004	003003
001001	002002	001001	002002	003003	001001	001001	003003	001001
001001	003003	001001	002002	004004	001001	001001	002002	001001
001001	003003	001001	002002	004004	001001	004004	003003	003003
001001	002002	001001	002002	004004	003003	001001	003003	002002
001001	003003	001001	002002	004004	001001	002002	000000	002002
001001	003003	001001	002002	004004	001001	002002	000000	001001