

Variabilidad y diferenciación genética en camarón blanco
Penaeus (Litopenaeus) vannamei de bajo y alto crecimiento

Genetic variability and differentiation in cultured white shrimp
Penaeus (Litopenaeus) vannamei with low and high growth

M Rivera-García, JM Grijalva-Chon*

Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora. Rosales y Niños Héroes s/n, Hermosillo 83000, Sonora, México. *E-mail: mgrijal@guayacan.uson.mx

Resumen

Con la finalidad de encontrar una relación entre la heterocigosis alozímica y el tamaño del camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* cultivado, se tomó una muestra al final de un cultivo experimental. La muestra consistió de 72 organismos pequeños con un peso promedio de 7.1 ± 1.35 g y 72 organismos mayores con peso promedio de 17.5 ± 1.34 g. Se analizaron diez sistemas enzimáticos. Dieciocho loci mostraron buena resolución para una interpretación genética. Sólo *EST-2**, *EST-3**, *EST-4**, *EST-5** y *PGM** fueron polimórficos. Los valores de variabilidad (heterocigosis media observada, promedio de alelos por locus y polimorfismo) para los camarones pequeños fueron de 0.029 ± 0.020 , 1.5 ± 0.20 y 22%, mientras que para los mayores fueron de 0.020 ± 0.010 , 1.7 ± 0.20 y 28%. No se encontraron diferencias significativas entre las heterocigosis de ambos tamaños de clase pero si tuvieron una diferente estructura genética poblacional. Todos los loci estuvieron fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg debido a una deficiencia de heterocigotos y altos valores de endogamia. Se obtuvo un valor de *Fst* de 1.6% y los loci *EST-2** y *PGM** mostraron diferencias en las frecuencias alélicas entre ambos tamaños de clase.

Abstract

To find a relationship between allozyme heterozygosity and body size in cultured white shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, a sample was taken at the end of an experimental culture; 72 small organisms of 7.1 ± 1.35 g average weights, and 72 large organisms of 17.5 ± 1.34 g average weights. Ten enzymatic systems were analyzed. Eighteen loci showed good resolution for genetic interpretation. Only *EST-2**, *EST-3**, *EST-4**, *EST-5**, and *PGM** were polymorphic. Variability values (mean observed heterozygosity, mean number of alleles per locus, and polymorphism) for small shrimp were 0.029 ± 0.020 , 1.5 ± 0.20 , and 22%, whereas for large shrimp were 0.020 ± 0.010 , 1.7 ± 0.20 , and 28%. No significant difference was found in heterozygosity for both size-classes. All loci were out of Hardy-Weinberg equilibrium because of a heterozygote deficiency and high inbreeding values. *EST-2** and *PGM** showed differences in allelic frequencies among both size-classes, and an *Fst* value of 1.6% was recorded. Both size-classes have a different genetic population structure. Because of the poor information of the analyzed loci and to corroborate that *EST-2** and *PGM** are involved in growth, it would be necessary to follow the inheritance of those loci in successive generations.

Key words: White shrimp, *Penaeus vannamei*, allozymes, genetic variability, growth.

Introducción

El crecimiento es uno de los componentes de la aptitud que se pueden relacionar a la heterocigosis. Otros componentes que se han reportado son la viabilidad, fertilidad, actividad locomotora, sobrevivencia, resistencia a enfermedades, velocidad de desarrollo y estabilidad (Allendorf y Lear, 1986, Zouros y Mallet 1989). El tamaño alcanzado por un grupo de organismos es un ejemplo de la variabilidad biológica y es el producto de una acción poligénica y de la interacción entre los genes y el ambiente (Klug y Cummings 1999). En un cultivo de camarón todos los organismos están expuestos a las mismas condiciones ambientales y el alimento está disponible en cantidades suficientes. Al final del cultivo, la población mostrará la típica curva normal de distribución de tamaños, en la que los extremos constituyen la minoría del grupo. Bajo tales condiciones es fundamental una investigación que permita determinar si

Introduction

Growth is one of the many fitness components that can be related to heterozygosity. Other components that have been reported are viability, fertility, locomotive activity, survival, resistance to illnesses, development speed, and stability (Allendorf and Leary 1986, Zouros and Mallet 1989). The size reached by a group of organisms is an example of the biological variability and it is the product of a polygenetic action and genes-environment interaction (Klug and Cummings 1999). In a shrimp culture, all organisms are exposed to the same environmental conditions and the food is available in sufficient quantities. At the end of the culture, the population will show the typical normal curve of size distribution, the extreme sizes constituting the minority of the group. Under such conditions, an investigation that allows determining whether a relationship exists between

existe una relación entre las tallas alcanzadas y el perfil genético asociado.

En moluscos se han realizado estudios de variabilidad genética (específicamente sobre la heterocigosis) y varios rasgos relacionados a la aptitud, como el crecimiento, reportándose asociaciones positivas (Zouros 1987, Gentili y Beaumont 1988, Koehn *et al.* 1988, Alvarez *et al.* 1989, Gosling 1989, Gaffney *et al.* 1990, Pogson y Zouros 1994, Wang *et al.* 2002). Sin embargo, en otros grupos de organismos, incluyendo algunos moluscos, la asociación no ha sido clara (Diehl y Koehn 1985, Allendorf y Leary 1986, Exadactylos *et al.* 1999, Jónsdóttir *et al.* 2002). Zouros (1987) menciona que aunque las investigaciones sobre la heterocigosis alozímica y su relación con el fenotipo apuntan en varias direcciones, el número de casos de correlaciones positivas iguala al número de casos en donde no existe correlación. Además, el número de casos que reportan una correlación negativa es mucho menor al número de casos que reportan correlaciones positivas.

Una población de baja variabilidad genética, con relación a otras de la misma especie, se considera que tendrá una capacidad inferior para hacer frente al ambiente (Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero 1989). El control de la diversidad genética es esencial para mejorar un programa de cultivo selectivo. Los datos obtenidos de un programa de cultivo pueden proporcionar información sobre alelos raros, disminución de la heterocigosis y los niveles elevados de consanguinidad. El control de la diversidad genética también permite mejorar a la especie en cultivo, tanto su tasa de crecimiento para obtener una mayor producción como su resistencia a enfermedades o a condiciones ambientales cambiantes (Lester 1983).

En cultivos experimentales de camarón se ha observado que una fracción de la población alcanza tallas significativamente mayores respecto al promedio y que esos organismos son más vigorosos, se estresan menos y presentan menor incidencia de enfermedades (com. pers. Martínez-Córdova y Aguirre Hinojosa). Por esta razón, es importante determinar si estos organismos tienen características genéticas distintivas. El objetivo de nuestro estudio fue explorar la relación entre las tallas extremas del camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone, 1931) cultivado, con la variabilidad genética, además de determinar la diferenciación genética entre esos tamaños de clase.

Materiales y método

Los nauplios utilizados para esta investigación provenían de un laboratorio comercial del sur de Sonora y no existe información sobre la variabilidad genética de estos organismos. El Centro Reprodutor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) llevó a cabo el cultivo hasta postlarva en sus instalaciones de Bahía de Kino, Sonora. En nuestras instalaciones (Unidad Experimental Kino) se llevó a cabo el cultivo de engorda en estanques de 400 m² con una densidad de siembra de 30 postlarvas m⁻², de acuerdo con Martínez-Córdova (1999). Cuando el camarón alcanzó la talla comercial de 15 g,

the sizes reached and the associated genetic profile is fundamental.

Studies about genetic variability (specifically heterozygosity) and several fitness-related features, such as growth, have been made in mollusks, reporting positive associations (Zouros 1987, Gentili and Beaumont 1988, Koehn *et al.* 1988, Álvarez *et al.* 1989, Gosling 1989, Gaffney *et al.* 1990, Pogson and Zouros 1994, Wang *et al.* 2002); however, in other groups of organisms, including some species of mollusks, the association has not been clear (Diehl and Koehn 1985, Allendorf and Leary 1986, Exadactylos *et al.* 1999, Jónsdóttir *et al.* 2002). Zouros (1987) mentions that although research on allozyme heterozygosity and its relationship with phenotype indicates several directions, the number of cases of positive correlation tends to equal the number of cases with absence of correlation. Furthermore, the number of cases that report a negative correlation is much smaller than the number of cases with positive correlation.

A population that presents low genetic variability, in relation to the others that compose the species, is considered to have an inferior capacity to face the environment (de la Rosa-Vélez and Rodríguez-Romero 1989). The control of genetic diversity is essential to improve a program of selective culture. The data obtained can provide information on uncommon alleles, diminished heterozygosity, and the increased levels of consanguinity in an aquaculture program. Controlling the genetic diversity also allows improving the species in culture, both in the growth rate to obtain bigger yields and in the resistance of the organisms to disease or changing environmental conditions (Lester 1983).

In experimental shrimp cultures it has been observed that a fraction of the population reaches sizes significantly larger than the mean, and that these organisms are stronger and show less stress and a lower incidence of diseases than the rest (Martínez-Córdova and Aguirre-Hinojosa pers. com.). For this reason, it is important to determine if these organisms have distinctive genetic characteristics. The objective of our study was to explore the relationship between the extreme size classes of cultured white shrimp with genetic variability and to determine the genetic differentiation between these size classes.

Material and methods

The nauplii used for this investigation came from a hatchery laboratory in southern Sonora (Mexico) and there is no existing information on the genetic variability of these organisms. The Centro Reprodutor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) grew the postlarval culture in their facilities at Kino Bay, Sonora. At our Kino Experimental Unit, the shrimp culture was done in 400-m² ponds with a density of 30 postlarvae m⁻², according to Martínez-Córdova (1999). When shrimp reached the average commercial size of 15 g at the end of July 2001, we selected 72 of the smallest organisms (7.10 ± 1.35 g) and 72 of the largest organisms

a finales de julio del 2001, se seleccionaron 72 de los organismos más pequeños (7.10 ± 1.35 g) y 72 de los más grandes (17.48 ± 1.34 g). La toma de la muestra fue al azar con respecto al sexo. Una prueba *t* de Student indicó que la diferencia estadística entre los dos tamaños de clase fue significativa ($P < 0.001$). Los organismos se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

Cefalotórax y abdomen se homogeneizaron en forma individual en 100 ml de TRIS HCl 0.1 M, pH 8.0, 0.1 g de NAD, 0.1 g de NADP y 1 g de polivinilpirrolidona (Grijalva-Chon *et al.* 1996). Los extractos protéicos se obtuvieron centrifugando los macerados a 5,000 *g* por 20 minutos a 4°C . Los sobrenadantes se almacenaron a -70°C . La electroforesis se realizó en geles de almidón al 10.5%, siguiendo los procedimientos descritos por Redfield y Salini (1980) y Aebersold *et al.* (1987). Se analizaron 10 sistemas enzimáticos (tabla 1) que

(17.48 ± 1.34 g). The gender selection was random. A Student's *t*-test indicated that the statistical difference between these two size classes was large ($P < 0.001$). The organisms were stored at -70°C until analysis.

Cephalothoraxes and abdomens were individually homogenized in 100 mL of 0.1 M Tris-HCl pH 8, 0.1 g of NAD, 0.1 g of NADP, and 1 g of polyvinylpyrrolidone (Grijalva-Chon *et al.* 1996). Protein extracts were obtained by centrifuging the macerates at 5000 *g* for 20 min at 4°C . Protein suspensions were stored at -70°C . Electrophoresis was done in 10.5% starch gel, following the procedures described by Redfield and Salini (1980) and Aebersold *et al.* (1987). We analyzed 10 enzymatic systems (table 1) reported as polymorphic in the literature (Harris *et al.* 1990, Sunden and Davis 1991, García *et al.* 1994, de la Rosa-Vélez *et al.* 1999), and 18 loci were revealed in an appropriate way.

Tabla 1. Sistemas enzimáticos y loci resueltos en camarón blanco *Penaeus vannamei* cultivado. E.C. = número de la Comisión de Enzimas (IUBNC 1984). Soluciones amortiguadoras: B = Tris-maleato, pH 7.4 (Selander *et al.* 1971); C = Tris-citrato II continuo, pH 8.0 (Selander *et al.* 1971); y G = Tris-versene-borato, pH 8.0 (Selander *et al.* 1971). Tinciones: 1 = Shaw y Prasad (1970), 2 = Schaal y Anderson (1974), 3 = Abreu-Grobois (1983) y 4 = Shaw y Koen (1968). Tejido: Ab = abdomen y Ct = cefalotórax.

Table 1. Enzyme systems and loci resolved in cultured white shrimp, *Penaeus vannamei*. E.C. = Enzyme Commission number (IUBNC 1984). Buffers: B = Tris-maleate, pH 7.4 (Selander *et al.* 1971); C = continuous Tris-citrate II, pH 8.0 (Selander *et al.* 1971); and G = Tris-versene-borate, pH 8.0 (Selander *et al.* 1971). Stains: 1 = Shaw and Prasad (1970), 2 = Schaal and Anderson (1974), 3 = Abreu-Grobois (1983), and 4 = Shaw and Koen (1968). Tissue: Ab = abdomen and Ct = cephalothorax.

Enzima	Locus	E.C.	Solución amortiguadora	Tinción	Tejido
Aspartato aminotransferasa	<i>AAT-1*</i>	2.6.1.1	C	2	Ab
	<i>AAT-2*</i>		C		Ab
Esterasa	<i>EST-2*</i>	3.1.1.1	G	1	Ct
	<i>EST-3*</i>		G		Ct
	<i>EST-4*</i>		G		Ct
	<i>EST-5*</i>		G		Ct
Fosfatasa ácida	<i>ACP-1*</i>	3.1.3.2	C	1	Ct
	<i>ACP-2*</i>		C		Ct
Fosfatasa alcalina	<i>AKP-1*</i>	3.1.3.1	C	4	Ct
	<i>AKP-2*</i>		C		Ct
Fosfoglucomutasa	<i>PGM*</i>	5.4.2.2	C	2	Ab
Glucosa-6-fosfato isomerasa	<i>GPI*</i>	5.3.1.9	C	1	Ct
Lactato deshidrogenasa	<i>LDH*</i>	1.1.1.27	G	1	Ab
Octanol deshidrogenasa	<i>ODH-1*</i>	1.1.1.73	G	1	Ab
	<i>ODH-2*</i>		G		Ab
	<i>ODH-3*</i>		G		Ab
Glutamato deshidrogenasa	<i>GDH</i>	1.4.1.3	G	2	Ab
Isocitrato deshidrogenasa	<i>IDH*</i>	1.1.1.42	B	3	Ab

la literatura reporta como polimórficos (Harris *et al.* 1990; Sunden y Davis 1991, García *et al.* 1994, Rosa-Vélez *et al.* 1999) y de los cuales 18 loci se revelaron apropiadamente.

Para los loci se siguió la nomenclatura de Shaklee *et al.* (1990). En los sistemas multilocus los loci se designaron empezando con 1 para el locus más cercano al ánodo. Los alelos se nombraron de acuerdo a su movilidad relativa con respecto al alelo más común, al cual se le dio un valor de 100. Los datos se analizaron con los programas Biosys-1 (Swofford y Selander 1981) y Genepop (Raymond y Rousset 1995). Las heterocigosis observada y esperada para todos los loci se calcularon de acuerdo a la fórmula insesgada de Nei (1978) y se realizó una prueba *t* de Student para valorar las diferencias significativas entre ellas. El número promedio de alelos por locus se calculó como la media aritmética de los alelos en el total de los loci revelados.

Se probó la hipótesis del Equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los loci variables por medio de análisis de χ^2 con y sin agrupación de fenotipos. Se utilizaron las correcciones de Lavenne y Yates para muestras pequeñas y continuidad. En todas las pruebas múltiples se utilizó el análisis secuencial de Bonferroni (Rice 1989). La deficiencia o exceso de heterocigosis se determinó por $D = (Ho-He)/He$ en donde *Ho* es la heterocigosis observada y *He* es la heterocigosis esperada.

Se calculó el índice de fijación (*F*) para estimar la desviación de las frecuencias fenotípicas esperadas (Nei 1978). También se calcularon el coeficiente de endogamia *Fis* y el índice de diferenciación genética *Fst* (Wright 1965). Para corroborar que los valores obtenidos fueran significativamente diferentes de cero, se probaron las hipótesis nulas de la siguiente manera: (a) $F = 0$, por medio de $\chi^2 = F^2N$ con $k-1$ grados de libertad, en donde *N* denota el número de individuos y *k* el número de alelos diferentes (Li y Horvitz 1953); (b) $Fis = 0$, por medio de $\chi^2 = Fis^2N(k-1)$ con $(k-1)/2$ grados de libertad (Li y Horvitz 1953); y (c) $Fst = 0$, por medio de $\chi^2 = 2Fst(k-1)$ con $(k-1)(s-1)$ grados de libertad y en donde *s* indica el número de tamaños de clase (Workman y Niswander 1970).

Para detectar desequilibrio por ligamiento (independencia genotípica) se realizaron análisis de χ^2 entre pares de loci polimórficos y una prueba exacta de Fisher para todos los datos (Weir 1996). La homogeneidad de las frecuencias alélicas se probó en los pares de loci polimórficos de las dos clases de tamaño utilizando la prueba *G* log-verosimilitud con la corrección de Yates para continuidad (Zar 1984). La distancia y similitud genética fueron calculadas de acuerdo con Nei (1978).

Resultados

Se detectaron 21 loci, de los cuales 18 mostraron suficiente actividad y consistencia en la resolución para ser interpretados genéticamente en la gran mayoría de los organismos analizados (tabla 1). De los 18 loci sólo cinco fueron polimórficos (*EST-2**, *EST-3**, *EST-4**, *EST-5** y *PGM**) en al menos un tamaño de clase aplicando el criterio del 0.95. Se descartó a

Loci nomenclature followed Shaklee *et al.* (1990). In multilocus systems, loci were designated beginning with 1 for the locus nearest to the anode. Alleles were named according to their relative mobility with respect to the most common allele, which was given a value of 100. Data were analyzed using Biosys-1 (Swofford and Selander 1981) and Genepop (Raymond and Rousset 1995). The observed and expected mean heterozygosity for all the loci were calculated according to the unbiased formula of Nei (1978), and a Student's *t*-test was applied to determine the significant differences between them. The average number of alleles per locus was calculated as the arithmetic mean of the alleles in the total of revealed loci.

The hypothesis of Hardy-Weinberg Equilibrium was proven for all the variable loci using χ^2 analyses with and without phenotype grouping. Both Lavenne and Yates corrections for small samples and continuity were used. A sequential Bonferroni procedure (Rice 1989) was used in all the sample tests. The heterozygote deficiency or excess was determined by $D = (Ho-He)/He$, where *Ho* is the observed heterozygosity and *He* the expected heterozygosity.

To determine the deviation of expected phenotypic frequencies, the fixation index (*F*) was calculated (Nei 1978). The inbreeding coefficient *Fis* and the genetic differentiation index *Fst* were also calculated (Wright 1965). To check that the values obtained were significantly different from zero, the null hypotheses were proven as follows: (a) $F = 0$ using $\chi^2 = F^2N$ with $k-1$ degrees of freedom, where *N* denotes the number of individuals and *k* the number of different alleles (Li and Horvitz 1953); (b) $Fis = 0$ using $\chi^2 = Fis^2N(k-1)$ with $(k-1)/2$ degrees of freedom (Li and Horvitz 1953); and (c) $Fst = 0$ using $\chi^2 = 2N Fst(k-1)$ with $(k-1)(s-1)$ degrees of freedom, where *s* indicates the number of size classes (Workman and Niswander 1970).

To detect linkage nonequilibrium (genotypic independence), χ^2 analyses among pairs of polymorphic loci were made and Fisher's exact test was applied to all data (Weir 1996). The homogeneity of allelic frequencies was proven in pairs of polymorphic loci of the two size classes, using the *G* log-likelihood with Yates' correction for continuity (Zar 1984). The genetic distance and similarity were calculated according to Nei (1978).

Results

A total of 21 loci were detected, of which 18 showed enough activity and consistency in resolution to be interpreted genetically in most of the organisms sampled (table 1). Of the 18 resolved loci only 5 were polymorphic (*EST-2**, *EST-3**, *EST-4**, *EST-5**, and *PGM**) in at least one size class, using the 0.95 criterion. Owing to the bad resolution of the zymograms (possibly because of enzymatic denaturation), *EST-1**, *ACP-3**, and *AKP-3** were discarded.

The genetic variation is shown in table 2. No significant differences were found either in the number of alleles per

*EST-1**, *ACP-3** y *AKP-3** debido a la mala resolución de los zimogramas (debida quizá a la desnaturalización enzimática).

La variabilidad genética se muestra en la tabla 2. Al comparar ambas clases de tamaño no se encontraron diferencias significativas en el número de alelos por locus ($P = 0.483$), ni en la heterocigosis esperada ($P = 0.392$) ni la observada ($P = 0.192$). El incremento en peso no tuvo correspondencia con un incremento en la heterocigosis observada. En los organismos grandes la heterocigosis observada fue menor que la esperada ($P = 0.031$), mientras que en los organismos pequeños la diferencia no fue significativa ($P = 0.052$). La similitud fue del 99% y la distancia genética insesgada del 2%. Los alelos *PGM*93* y *PGM*85* se presentaron sólo en los organismos mayores, mientras que *EST-4*115* se presentó sólo en los chicos (tabla 3). Los cuatro loci de esterasas fueron polimórficos en ambos tamaños de clase, mientras que *PGM** lo fue sólo en los organismos mayores. La heterocigosis observada por locus varió de 0.000 a 0.319 en los chicos y de 0.000 a 0.171 en los grandes. Todos los loci polimórficos estuvieron fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg después del análisis secuencial de Bonferroni (tabla 4). Los organismos mayores acumularon 17 fenotipos y los pequeños estuvieron representados por 16, incluyendo a *PGM*100/100*. Esta diferencia se basa en los fenotipos privados; dos en los chicos (*EST-3*91/102* y *EST-4*100/115*) y tres en los mayores (*EST-2*100/103*, *PGM*93/93* y *PGM*85/100*).

El desequilibrio de Hardy-Weinberg se reflejó en *D*, cuyos valores negativos son indicativos de una severa deficiencia de heterocigotos, y en los altos valores de *Fis* en todos los loci, producto de una alta endogamia. Se evidenció, a partir de *Fst*, una pequeña pero significativa ($P < 0.001$) diferenciación genética del 1.6% entre los tamaños de clase. Esta diferenciación se basó en la distribución de las frecuencias alélicas de *EST-2** y *PGM** y corroborada por la prueba *G* (tabla 5).

locus ($P = 0.483$) or in the expected ($P = 0.392$) and observed ($P = 0.192$) heterozygosity between small and large shrimp. The increase in weight does not correspond to an increase in observed heterozygosity. The observed heterozygosity in large shrimp was smaller than expected ($P = 0.031$), whereas in the small organisms the difference was not significant ($P = 0.052$). The similarity was 99% and the unbiased genetic distance was 2%. The alleles *PGM*93* and *PGM*85* were present only in large organisms, while *EST-4*115* only occurred in small shrimp (table 3). The four esterase loci were polymorphic in both size classes, but *PGM** was found only in the large ones. The observed heterozygosity per locus varied from 0.000 to 0.319 in small shrimp and from 0.000 to 0.171 in large ones. All the polymorphic loci were out of Hardy-Weinberg equilibrium after the sequential Bonferroni analysis (table 4). The large organisms accumulated 17 phenotypes and the small ones were represented by 16, including *PGM*100/100*. This difference is based on private phenotypes: two in small shrimp (*EST-3*91/102* and *EST-4*100/115*) and three in large shrimp (*EST-2*100/103*, *PGM*93/93*, and *PGM*85/100*).

The Hardy-Weinberg nonequilibrium was reflected in *D*, whose negative values are indicative of a severe heterozygosity deficiency, and the *Fis* showed high values in all loci, a product of high inbreeding. A small (but significant, $P < 0.001$) genetic differentiation of 1.6% was evidenced, by *Fst*, between the size classes. This differentiation is based on the distribution of allelic frequencies of *EST-2** and *PGM**, corroborated by the *G* test (table 5).

The test of independence among polymorphic loci pairs showed linkage nonequilibrium at *EST-3*/EST-4** ($P = 0.002$) and *EST-2*/EST-5** ($P = 0.018$) in small shrimp, and *EST-2*/EST-3** ($P = 0.025$) in large organisms. Taking into account the whole group of data, Fisher's exact test revealed that only *EST-3*/EST-4** ($P = 0.018$) and *EST-2*/EST-3** ($P = 0.020$) were not in equilibrium.

Tabla 2. Variación genética en dos clases de tamaño de camarón blanco cultivado. Error estándar en paréntesis. Un locus se considera polimórfico si la frecuencia del alelo mas común no excede 0.95. Camarón chico = 7.10 ± 1.35 g. Camarón grande = 17.48 ± 1.34 g.

Table 2. Genetic variation in two size classes of cultured white shrimp. Standard error in parentheses. A locus was considered polymorphic when the frequency of the most common allele did not exceed 0.95. Small shrimp = 7.10 ± 1.35 g. Large shrimp = 17.48 ± 1.34 g.

	Chicos	Grandes
No. de organismos	72	72
No. de loci examinados	18	18
No. de organismos por locus	69.3 (1.4)	69.0 (1.4)
No. de alelos por locus	1.5 (0.2)	1.7 (0.2)
No. de loci polimórficos	4	5
Porcentaje de loci polimórficos	22.2	27.8
Heterocigosis promedio por locus		
Esperada (<i>He</i>)	0.070 (0.037)	0.085 (0.037)
Observada (<i>Ho</i>)	0.029 (0.020)	0.020 (0.010)

Tabla 3. Frecuencias alélicas y heterocigosis en cinco loci polimórficos de camarón blanco cultivado chico y grande. *N* = número de individuos por locus.**Table 3.** Allelic frequencies and heterozygosity in five polymorphic loci of small and large cultured white shrimp. *N* = number of individuals per locus.

Locus	Alelos	Frecuencias alélicas	
		Chicos	Grandes
<i>EST-2*</i>	103	0.014	0.050
	100	0.478	0.629
	97	0.014	0.029
	94	0.493	0.293
	<i>He</i>	0.532	0.520
	<i>Ho</i>	0.319	0.171
	<i>N</i>	69	70
<i>EST-3*</i>	102	0.181	0.221
	100	0.732	0.743
	91	0.087	0.037
	<i>He</i>	0.427	0.401
	<i>Ho</i>	0.174	0.074
	<i>N</i>	69	68
<i>EST-4*</i>	115	0.007	0.000
	100	0.938	0.958
	95	0.056	0.042
	<i>He</i>	0.119	0.080
	<i>Ho</i>	0.014	0.000
	<i>N</i>	72	72
<i>EST-5*</i>	107	0.097	0.145
	100	0.896	0.823
	88	0.007	0.032
	<i>He</i>	0.189	0.304
	<i>Ho</i>	0.014	0.065
	<i>N</i>	72	62
<i>PGM*</i>	100	1.000	0.929
	93	0.000	0.063
	85	0.000	0.008
	<i>He</i>	—	0.135
	<i>Ho</i>	—	0.016
	<i>N</i>	70	63
Alelos privados		1	2

Tabla 4. Distribución fenotípica observada y esperada en cinco loci polimórficos de camarón blanco cultivado. Todos los loci estuvieron fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.001$).**Table 4.** Observed and expected phenotype distribution in five polymorphic loci of cultured white shrimp. All loci were out of Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.001$).

Locus Fenotipo	Chicos		Grandes	
	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
<i>EST-2*</i>				
94/94	23	16	15	6
94/97	0	1	0	1
94/100	22	33	11	26
94/103	0	1	0	2
97/97	1	<1	2	<1
97/100	0	1	0	3
97/103	0	<1	0	<1
100/100	22	16	38	28
100/103	0	1	1	4
103/103	1	<1	3	1
<i>EST-3*</i>				
91/91	0	<1	0	<1
91/100	11	9	5	4
91/102	1	2	0	1
100/100	45	37	48	37
100/102	0	18	0	22
102/102	12	2	15	3
<i>EST-4*</i>				
95/95	4	<1	3	<1
95/100	0	8	0	6
95/115	0	<1		
100/100	67	63	69	66
100/115	1	1		
115/115	0	0		
<i>EST-5*</i>				
88/88	0	0	0	<1
88/100	1	1	4	3
88/107	0	<1	0	1
100/100	64	58	49	42
100/107	0	13	0	15
107/107	7	1	9	1
<i>PGM*</i>				
85/85			0	0
85/93			0	<1
85/100			1	1
93/93			4	<1
93/100			0	7
100/100			58	54

La prueba de independencia entre pares de loci polimórficos mostró un desequilibrio por ligamiento en *EST-3*/EST-4** ($P = 0.002$) y *EST-2*/EST-5** ($P = 0.018$) en los camarones chicos y en *EST-2*/EST-3** ($P = 0.025$) en los mayores. Tomando en cuenta la totalidad del grupo de datos, la prueba exacta de Fisher reveló que sólo los pares *EST-3*/EST-4** ($P = 0.018$) y *EST-2*/EST-3** ($P = 0.020$) no estuvieron en equilibrio.

Tabla 5. Deficiencia y exceso de heterocigotos (*D*), índice de endogamia (*Fis*), índice de diferenciación genética (*Fst*) y significancia (*P*) de la prueba G para frecuencias alélicas en cinco loci polimórficos de camarón blanco cultivado. *** = $P < 0.001$.

Table 5. Heterozygote deficiency or excess (*D*), inbreeding index (*Fis*), genetic differentiation index (*Fst*), and significance (*P*) of the G test for allelic frequencies in five polymorphic loci of cultured white shrimp. *** = $P < 0.001$.

Locus	<i>D</i>		<i>Fis</i>	<i>Fst</i>	<i>P</i>
	Chicos	Grandes			
<i>EST-2*</i>	-0.401	-0.670	0.530***	0.030***	0.0026
<i>EST-3*</i>	-0.593	-0.817	0.699***	0.003	0.2017
<i>EST-4*</i>	-0.883	-1.000	0.930***	0.002	0.6007
<i>EST-5*</i>	-0.927	-0.788	0.840***	0.008	0.1701
<i>PGM*</i>		-0.882	0.881***	0.033***	0.0012
Promedio			0.685***	0.016***	0.0004

Discusión

No es raro que en un estudio de variabilidad alozímica sólo unos pocos loci sean polimórficos. Por ejemplo, Mulley y Latter (1980) encontraron que el 14% de los loci analizados fueron polimórficos en 13 especies de peneidos y Lester (1983) encontró dos loci polimórficos en 18 analizados en *P. vannamei*. Para buscar una mayor resolución a nivel de alozimas, la presente investigación se realizó utilizando los sistemas enzimáticos que la literatura reporta con loci polimórficos. Por esta razón, la presencia de cinco loci polimórficos es un resultado por debajo de nuestras expectativas iniciales. Esto puede explicarse ya que los organismos provienen de un linaje cultivado. La reproducción en ciclo cerrado implica una pérdida de variabilidad genética y un incremento considerable de la endogamia, ambos efectos verificados en este estudio.

Varios autores han reportado bajas heterocigosis en los peneidos a nivel de alozimas (Mulley y Latter 1980, Harris *et al.* 1990; Sunden y Davis 1991, Rosa-Vélez *et al.* 2000, Ramos-Paredes y Grijalva-Chon 2003). Esos valores (0.02–0.13) están basados en un gran número de loci, al menos 25 de acuerdo a la recomendación de Nei (1987). Por esta razón, nuestros valores de heterocigosis no son directamente comparables con los valores reportados en la literatura. Soto-Hernández (2002) analizó una población silvestre de camarón blanco y tres linajes de cultivo, y utilizó el mismo número de sistemas enzimáticos que en el presente estudio, difiriendo sólo en uno de ellos. Para la población silvestre, este autor obtuvo valores de $H_o = 0.056 \pm 0.026$, un polimorfismo del 53% y un promedio de 2.13 alelos por locus. Estos valores son mayores (en un orden de 100%) a los obtenidos en este estudio.

Otro rasgo importante encontrado es el desequilibrio por ligamiento entre los loci de las esterasas. Esto implica que las copias de estos genes no están lo suficientemente separadas unas de otras en los cromosomas para que sean heredadas independientemente. Esta carencia de independencia en las esterasas también se ha reportado en camarones blancos de

Discussion

It is not uncommon for only a few loci to be polymorphic in a study of allozyme variability. For example, Mulley and Latter (1980) found that 14% of analyzed loci were polymorphic in 13 penaeid species, and Lester (1983) found two polymorphic loci of 18 analyzed in *P. vannamei*. To look for a large resolution at the allozyme level, our research was done using the enzymatic systems reported to be polymorphic loci in the literature. Consequently, the presence of five polymorphic loci is a result below our initial expectations. This can be explained considering that the organisms analyzed come from a hatchery strain. A closed-cycle reproduction implies a loss of genetic variability and a considerable increase in inbreeding, both effects verified in the present study.

Several authors have reported low heterozygosities at the allozyme level in penaeid shrimp (Mulley and Latter 1980, Lester 1983, Harris *et al.* 1990, Sunden and Davis 1991, de la Rosa-Vélez *et al.* 2000, Ramos-Paredes and Grijalva-Chon 2003). These values (0.02–0.13) were based on the analysis of a large number of loci, at least 25 according to the recommendation of Nei (1987). For this reason, our heterozygosity values are not directly comparable with those reported in the literature. Soto-Hernández (2002) analyzed a wild population of white shrimp and three hatchery strains based on the same number of enzymatic systems as ours, differing only in one. For the wild population, this author obtained values of $H_o = 0.056 \pm 0.026$, a polymorphism of 53% and an average of 2.13 alleles per locus. These values are higher (~100%) than those obtained in our study.

Another important feature found in our study is the linkage nonequilibrium among esterase loci. This implies that copies of these genes are not far enough away from each other in the chromosome to be inherited independently. This lack of independence in esterases was also reported for hatchery and wild white shrimp (Soto-Hernández 2002), and for wild blue shrimp *P. stylirostris* (Ramos-Paredes 2001).

linaje de cultivo y en silvestres (Soto-Hernández 2002), y en el camarón azul *P. stylirostris* (Ramos-Paredes 2001).

Se han realizado investigaciones en diferentes especies (crustáceos, moluscos y peces) para explorar si hay alguna correlación o asociación positiva entre el crecimiento y la heterocigosis. La mayoría de estos estudios se han enfocado a moluscos, con correlaciones positivas, negativas y no significativas (Zouros 1987). El que diversos estudios no hayan encontrado una correlación positiva entre la heterocigosis y el crecimiento indica que la asociación no es universal y que puede depender de otros factores. Las relaciones también pueden ser inconsistentes (Diehl y Koehn 1985, Mallet *et al.* 1986). Maqueda-Cornejo (1990) y Torre-Cueto (1991) no encontraron una correlación significativa entre el tamaño y la heterocigosis alozímica en poblaciones silvestres de *P. stylirostris* y el camarón café *P. californiensis*. La búsqueda de una relación positiva entre la heterocigosis y el crecimiento ha llegado al punto de tratar de encontrar genotipos específicos que puedan ser considerados como causales de tal respuesta (Gosling 1989, Naevdal *et al.* 1992, Garcia *et al.* 1994, Garcia *et al.* 1996) pero aún no hay estudios concluyentes con evidencias convincentes.

La interacción genotipo-ambiente influye en el crecimiento de los organismos (Kjartansson *et al.* 2001, Jónsdóttir *et al.* 2002), sin embargo, en un típico cultivo semi-intensivo de camarón todos los organismos están sujetos a las mismas condiciones básicas (calidad de agua y alimento), de tal forma que las grandes diferencias en el crecimiento se deben de relacionar a una base genética y a la interrelación genotipo-ambiente. En otras palabras, la constitución genética de los organismos mayores los hace responder en una forma diferente a los organismos pequeños bajo las mismas condiciones de cultivo.

La ausencia de una diferencia significativa entre la heterocigosis de ambos tamaños de clase no implica una identidad a nivel genético. La distribución de las frecuencias alélicas de *EST-2** y *PGM** demostró que ambos tamaños de clase son genéticamente diferentes. Esto se corroboró por medio de *Fst*, el cual indicó una pequeña (pero significativa) diferenciación genética. Existen dos posibles explicaciones. Una posibilidad es que el laboratorio de producción de larvas o el CREMES hayan mezclado organismos de diferentes orígenes, lo que daría como resultado un progenie no homogénea. Esta posibilidad se puede descartar ya que ni el laboratorio larvario ni el CREMES realizan este tipo de práctica (com. pers. Lango-Alemán). Los organismos analizados en este estudio son parte de un linaje comercial originario de Venezuela. El esquema de reproducción de este linaje involucra el uso de 8,000 reproductores que son seleccionados al final de los cultivos del mismo linaje en las granjas camaroneras comerciales. De esta forma, se obtienen diariamente 25 millones de nauplios, con una sobrevivencia del 80% en postlarva 12 (com. pers. Lango-Alemán).

La otra posibilidad es, suponiendo un pie de cría homogéneo, que la diferencia genética observada esté vinculada a la tasa de crecimiento y gobernada por los genes responsables del

Considerable research has been done on different species (crustaceans, mollusks, and fish) to determine whether there is some correlation or positive association between growth and heterozygosity. Most of these studies have focused on mollusks, with positive, negative, and nonsignificant correlations (Zouros 1987). Not finding positive heterozygosity-growth correlations in many studies indicates that the association is not universal and may depend on other conditions. The relationship can be inconsistent (Diehl and Koehn 1985, Mallet *et al.* 1986). Maqueda-Cornejo (1990) and de la Torre-Cueto (1991) did not find a significant correlation between size and allozyme heterozygosity in wild populations of *P. stylirostris* and yellowleg shrimp, *P. californiensis*. The search for a positive heterozygosity-growth relationship has reached the point of trying to find specific genotypes, which can be considered causal for such a response (Gosling 1989, Naevdal *et al.* 1992, Garcia *et al.* 1994, Garcia *et al.* 1996), but there are still no conclusive studies with convincing evidence.

Genotype-environment interaction influences the growth of the organisms (Kjartansson *et al.* 2001, Jónsdóttir *et al.* 2002); however, in a typical semi-intensive shrimp culture, all organisms are subjected to the same basic conditions (water quality and food), such that the large differences in growth should be related to a genetic base and to the genotype-environment interrelation. In other words, the genetic constitution of the large organisms makes them respond in a different way than the small organisms under the same culture conditions.

The absence of a significant difference among the heterozygosity of both size classes does not imply an identity at a genetic level. The distribution of allelic frequencies of *EST-2** and *PGM** showed that both size classes are genetically different. This was corroborated by *Fst*, which indicated little (but significant) genetic differentiation. Two possible explanations exist. One is that either the hatchery laboratory or CREMES mixed organisms or strains from different origins. This would give a genetic nonhomogeneous offspring. This possibility is discarded because neither the hatchery laboratory nor CREMES carry out this type of procedures (Lango-Alemán pers. com.). The organisms analyzed in this study are part of a commercial strain of Venezuelan origin. The reproduction scheme of this strain involves the use of 8000 broodstock selected at the end of the culture of the same strain in the commercial shrimp farms. Thus, 25,000,000 nauplii are obtained daily, with 80% survival at postlarvae 12 (Lango-Alemán pers. com.).

The other possibility, assuming a homogeneous broodstock, is that the genetic difference observed is linked to the rate of growth and is largely governed by genes responsible for growth. Since size is defined by the combined action of an unknown number of several genes, we cannot attribute all the responsibility of this differentiation to the esterase and phosphoglucosutase genes. This possibility can be tested by conducting follow-up research on successive generations, analyzing offspring of both size classes and observing allozyme

crecimiento. Debido a que la talla se define por la acción combinada de un número desconocido de varios genes, no podemos atribuir toda la responsabilidad de la diferenciación a los genes de las esterases y de la fosfoglucomutasa. Esta posibilidad se puede probar si se hace un seguimiento por varias generaciones para analizar la progenie de ambos tamaños de clase y observando la herencia fenotípica de las alozimas. De esta forma se podría considerar que estos dos genes (junto con otros que desconocemos) podrían estar involucrados en el crecimiento.

Recientemente, las investigaciones de Argue *et al.* (2002), Goyard *et al.* (2002) e Ibarra-Humphries *et al.* (2002) han encontrado que puede existir un mejoramiento significativo en el crecimiento a través de un buen proceso de selección; sin embargo, la búsqueda de la base genética del crecimiento del camarón está aún en sus inicios. La información sobre la variabilidad genética puede ser vital para el diseño e implementación de un manejo apropiado de las especies de interés acuícola y también para diseñar las investigaciones dirigidas a determinar que genes gobiernan o están relacionados al crecimiento. El desarrollo de un programa de domesticación para organismos de origen silvestre y el mejoramiento de las técnicas acuaculturales, a través de un buen esquema de selección del pie de cría, requerirán de una población fundadora con una variación genética apropiada (Sugama *et al.* 2002). Esto servirá como base para desarrollar cuidadosamente los programas de selección con endogamia controlada y con la selección de rasgos importantes como el crecimiento (Bolívar y Newkirk, 2002).

Agradecimientos

Agradecemos a Luis Martínez-Córdova y a Alfredo Campaña-Torres por proporcionar los camarones de su cultivo experimental. Gracias a Alejandro Varela-Romero y a Luis Enrique Gutiérrez-Millán por sus comentarios. El Dr. Ellis Glazier llevó a cabo la edición del texto en inglés. MRG recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Referencias

- Abreu-Grobois A. 1983. Population Genetics of *Artemia*. PhD Thesis. University College of Swansea, England. 438 pp.
- Aebersold PB, Winans GA, Teel DJ, Milner GB, Utter FM. 1987. Manual for Starch Gel Electrophoresis: A Method for the Detection of Genetic Variation. NOAA Technical Report NMFS 61.
- Allendorf FW, Leary RF. 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. In: Soulé ME (ed.), Conservation Biology. The Science of Scarcity and Diversity. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, pp. 57–76.
- Álvarez G, Zapata C, Amaro R, Guerra A. 1989. Multilocus heterozygosity at protein loci and fitness in the European oyster, *Ostrea edulis* L. *Heredity* 63: 359–372.
- Argue BJ, Arce SM, Lotz JM, Moss SM. 2002. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture* 204: 447–460.
- phenotype inheritance. This would indicate whether these two loci (and others that we ignore) are involved in growth.
- Recent studies by Argue *et al.* (2002), Goyard *et al.* (2002), and Ibarra-Humphries *et al.* (2002) have shown that growth can be significantly improved through a good selection process. Nevertheless, the search for the genetic foundation of shrimp growth is still in its early stages. Information of genetic variability can be vital for the design and implementation of the appropriate handling of species of aquacultural concern, and also to design investigations to try to determine which genes govern or are related to growth. The development of a domestication program of wild stocks and the improvement of aquaculture techniques through a good broodstock selection scheme will require a founder population with appropriate genetic variation (Sugama *et al.* 2002). This will serve as a basis to develop careful selection programs with controlled inbreeding and the selection of important features such as growth (Bolívar and Newkirk 2002).
- ## Aknowledgements
- We are indebted to Luis Martínez-Córdova and Alfredo Campaña-Torres for providing the shrimp from their experimental culture. We thank Alejandro Varela-Romero and Luis Enrique Gutiérrez-Millán for their comments, and Ellis Glazier for editing the English-language text. The first author received a scholarship from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT).
-
- Bolívar RB, Newkirk GF 2002. Response to within family selection for body weight in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a single-trait animal model. *Aquaculture* 204: 371–381.
- Diehl WJ, Koehn RK. 1985. Multiple-locus heterozygosity, mortality, and growth in a cohort of *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 88: 256–271.
- Exadactylos A, Geffen AF, Torpe JP. 1999. Growth and genetic variation in hatchery-reared larval and juvenile Dover sole, *Solea solea* (L). *Aquaculture* 176: 209–226.
- Gaffney PM, Scott TM, Koehn RK, Diehl WJ. 1990. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the coot clam *Mulinia lateralis*. *Genetics* 124: 687–699.
- García DK, Maura A, Rhoades L, Alcívar-Warren A. 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3: 270–280.
- García DK, Dhar AK, Alcívar-Warren A. (1996). Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 5: 71–83.
- Gentili MR, Beaumont AR. 1988. Environmental stress, heterozygosity, and growth rate in *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Biol. Ecol.* 120: 145–153.
- Gosling EM. 1989. Genetic heterozygosity and growth rate in a cohort of *Mytilus edulis* from the Irish coast. *Marine Biology* 100: 211–215.
- Goyard E, Patrois J, Peignon JM, Vanaa V, Dufour R, Viallon J, Bédier E. 2002. Selection for better growth of *Penaeus stylirostris* in Tahiti and New Caledonia. *Aquaculture* 204: 461–468.

- Grijalva-Chon JM, Rosa-Vélez J, de la and Sosa-Nishizaki O. 1996. Allozyme variability in two samples of swordfish. *Xiphias gladius* P. in the North Pacific Ocean. Fish. Bull. 94: 589–594.
- Harris SEG, Dillion Jr RT, Sandifer PA, Lester LJ. 1990. Electrophoresis of isozymes in cultured *Penaeus vannamei*. Aquaculture 85: 1–4.
- Ibarra-Humphries AM, Pérez-Rostro CI, Ramírez-Arce JL. 2002. Programa de mejoramiento genético de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en México. Panorama Acuicola 7: 8–9.
- IUBNC (International Union of Biochemistry Nomenclature Committee). 1984. *Enzyme Nomenclature*. Academic Press. Orlando. 646 pp.
- Jónsdóttir ÓDB, Imsland AK, Daniélsdóttir AK, Marteinsdóttir G. 2002. Genetic heterogeneity and growth properties of different genotypes of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) at two spawning sites off south Iceland. Fish. Res. 55: 37–47.
- Kjartansson AI, Foss A, Naevdal G, Stefansson SO. 2001. Selection or adaptation: Differences in growth performance of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* Refinesque) from two close-by localities off Norway. Sarsia 86: 43–51.
- Klug WS, Cummings MR. 1999. Conceptos de Genética. Quinta edición. Prentice Hall. Madrid. 814 pp.
- Koehn RK, Diehl WJ, Scott TM. 1988. The differential contribution by individual enzymes of glycolysis and protein catabolism to the relationships between heterozygosity and growth rate in the coot clam *Mulinia lateralis*. Genetics 118: 121–130.
- Lester LJ. 1983. Developing a selective breeding program for Penaeid shrimp mariculture. Aquaculture 33: 41–50.
- Li CC, Horvitz DG. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. Amer. J. Human Gen., 5: 107–117.
- Mallet AL, Zouros E, Gartner-Kepay KE, Freeman KR. 1986. Genetics of growth in blue mussels: family and enzyme-heterozygosity effects. Mar. Biol. 92: 475–482.
- Maqueda-Cornejo MM. 1990. Variación genética intrapoblacional y grado de diferenciación interpoblacional del camarón azul *Penaeus stylirostris* del Golfo de California. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. México. 71 pp.
- Martínez-Córdova LR. 1999. Cultivo de Camarones Peneidos, Principios y Prácticas. AGT Editor. S.A. de C.V. Mexico. 283 pp.
- Mulley JC, Latter BDH. 1980. Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid prawns. Evolution, 34: 904–916.
- Naevdal G, Folkvord A, Otterley E, Thorkildsen S. 1992. Growth rate related to genotype of 0-group cod at three environmental temperatures. Sarsia 77: 71–23.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583–590.
- Nei M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. New York. 512 pp.
- Pogson GH, Zouros E. 1994. Allozyme and RFLP heterozygosities as correlates of growth rate in the scallop *Placopecten magellanicus*: a test of the associative overdominance hypothesis. Genetics 137: 221–231.
- Ramos-Paredes J. 2001. Variabilidad genética alozímica en poblaciones silvestres y en líneas cultivadas de camarón azul (*Penaeus stylirostris*). Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. México. 108 pp.
- Ramos-Paredes J, Grijalva-Chon JM. 2003. Allozyme genetic analysis in hatchery strains and wild blue shrimp *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris* (Stimpson) from the Gulf of California. Aquaculture Res. 34: 221–234.
- Raymond M, Rousset F. 1995. Genepop (version 1.2): a population genetics software for exact test and ecumenism. J. Heredity 86: 248–249.
- Redfield JA, Salini JP. 1980. Techniques of starch-gel electrophoresis of penaeid prawn enzymes (*Penaeus* spp. and *Metapenaeus* spp.) CSIRO. Division of Fisheries and Oceanography. Cronulla, SSW. 20 pp.
- Rice WR. 1989. Analysing tables of statistical tests. Evolution 43: 223–225.
- Rosa-Vélez J. de la, Rodríguez-Romero F. 1989. Enfoque genético para el análisis de poblaciones de recursos pesqueros: el caso de la población ostrícola de la laguna de Términos, Campeche. En: J. de la Rosa-Vélez y F. González-Farías (eds.), Temas de Oceanografía Biológica en México. Universidad Autónoma de Baja California. México. pp. 255–284.
- Rosa-Vélez J. de la, Escobar R, Correa F, Félix E. (1999). High allozyme variation and genetic similarity of two populations of commercial penaeids, *Penaeus brevisrostris* (Kingsley) and *Penaeus vannamei* (Boone), from the Gulf of California. Aquaculture Res. 30: 459–463.
- Rosa-Vélez J de la, Escobar-Fernández R, Correa F, Maqueda-Cornejo M, Torre-Cueto J de la. 2000. Genetic structure of two commercial penaeids (*Penaeus californiensis* and *P. stylirostris*) from the Gulf of California, as revealed by allozyme variation. Fish. Bull. 98: 674–683.
- Schaal BA, Anderson WW. 1974. An outline of techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from the American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Technical Reports Series. Georgia Marine Sciences Center 74.
- Selander RK, Smith MH, Yang SY, Johnson WE, Gentry JB. 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). Studies in Genetics. VI. Univ. Texas Publ. 7103: 49–90.
- Shaklee JB, Allendorf FW, Morizot DC, Whitt GS. 1990. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. Trans. Amer. Fish. Soc. 119: 2–15.
- Shaw CR, Koen, AP. 1968. Zone electrophoresis of enzymes. In: I. Smith (ed.), Chromatography and Electrophoresis. Interscience Publishers. New York. pp. 325–364.
- Shaw CR, Prasad R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. Biochem. Gen. 4: 297–320.
- Soto-Hernández J. 2002. Evaluación de la diferenciación genética en tres linajes de camarón blanco, *Penaeus vannamei*, cultivados en Sonora. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. México. 47 pp.
- Sugama K, Haryanti, Benzie J.A.H, Ballment E. 2002. Genetic variation and population structure of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Indonesia. Aquaculture 205: 37–48.
- Sunden SLF, Davis SK. 1991. Evaluation of genetic variation in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. Aquaculture 97: 131–142.
- Swofford D, Selander R. 1981. BIOSYS-1 – A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoresis data in population genetics and systematics. J. Heredity 72: 281–283.
- Torre-Cueto F.J. de la. 1991. Variabilidad Genética del camarón café (*Penaeus californiensis* Holmes 1900) en una población de Mazatlán, Sin. 1991. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. México. 50 pp.
- Wang Z, Guo X, Allen SK, Wang R. 2002. Heterozygosity and body size in triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg, produced from meiosis II and tetraploids. Aquaculture 204: 337–348.

- Weir BS. 1996. Genetic Data Analysis II. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, Sunderland. 445 pp.
- Workman PL, Niswander JD. 1970. Population studies on Southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. Amer. J. Human Gen. 22: 24–29.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution 19: 395–420.
- Zar JH. 1984. Biostatistical Analysis. Prentice Hall. Englewood Cliffs. 718 pp.
- Zouros E. 1987. On the relation between heterozygosity and heterosis: an avaluation of the evidence from marine mollusks. Curr. Topics Biol. Med. Res. 15: 255–270.
- Zouros E, Mallet AL. 1989. Genetic explanations of the growth/heterozygosity correlation in marine mollusks. In: .S. Ryland. and P.A. Tyler (eds.), Reproduction, Genetics and Distribution of Marine Organisms. Poceedings of the XXIII European Marine Biology Symposium, Olsen and Olsen, Fredensborg, Denmark. pp: 317–324.

*Recibido en septiembre de 2003;
recibido en su forma actual en enero de 2004;
aceptado en julio de 2005.*