



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL**

UNIDAD SINALOA

**Estudio de la estructura poblacional de la enzima tripsina digestiva en
sistemas comerciales del camarón *Litopenaeus vannamei* en el estado de
Sinaloa**

P R E S E N T A:

M en C JAZMIN ASUSENA AGUIÑAGA CRUZ

Guasave, Sinaloa, México.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 20 del mes octubre del año 2017, el (la) que suscribe Jazmin Asusena Aguiñaga Cruz alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro B120396, adscrito al CIIDIR-Sinaloa, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Sainz Hernández y el Dr. Juan Manuel González Prieto y cede los derechos del trabajo intitulado **“Estudio de la estructura poblacional de la enzima tripsina digestiva en sistemas comerciales del camarón *Litopenaeus vannamei* en el estado de Sinaloa”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección sainzjc@hotmail.com, jmgpcbipn@gmail.com y jasmine_2923@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M en C Jazmin Asusena Aguiñaga Cruz

Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 07 de agosto del 2017

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-Sinaloa en su sesión ordinaria No. 8va celebrada el día 3 del mes de agosto conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>Aguñaga</u>	<u>Cruz</u>	<u>Jazmin Asusena</u>
<small>Apellido paterno</small>	<small>Apellido materno</small>	<small>Nombre (s)</small>

Con registro:

B	1	2	0	3	9	6
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Estudio de la estructura poblacional de la enzima tripsina digestiva en sistemas comerciales del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en el estado de Sinaloa.

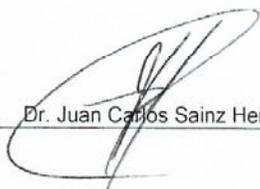
De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Análisis de la distribución de la enzima tripsina digestiva en diferentes centros de producción de poslarvas en Sinaloa.
Análisis de la estructura poblacional del gen de tripsina digestiva.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dr. Juan Carlos Sainz Hernández y Dr. Juan Manuel González Prieto

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
Centro de Investigación Interdisciplinaria para el Desarrollo Integral Regional
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis



Dr. Juan Carlos Sainz Hernández

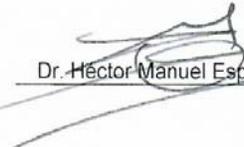


Dr. Juan Manuel González Prieto

Aspirante


M en C Jazmin Asusena Aguiñaga Cruz

Presidente del Colegio



Dr. Héctor Manuel Espartero

CIIDIR IPN SINALOA
DIRECCIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 12:00 horas del día 6 del mes de septiembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-Sinaloa para examinar la tesis titulada:
Estudio de la estructura poblacional de la enzima tripsina digestiva en sistemas comerciales del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en el estado de Sinaloa.

Presentada por el alumno:

Aguñaga Cruz
Apellido paterno Apellido materno
Nombre(s) Jazmin Asusena

Con registro:

B	1	2	0	3	9	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

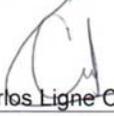
LA COMISIÓN REVISORA

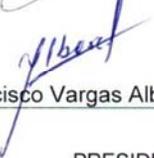
Directores de tesis


Dr. Juan Carlos Sainz Hernández

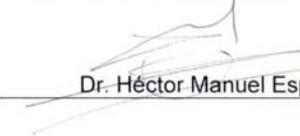

Dr. Juan Manuel González Prieto


Dr. Sergio Medina Godoy


Dr. Carlos Ligne Calderón


Dr. Francisco Vargas Albores

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Héctor Manuel Esparza Leal



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCIÓN

RECONOCIMIENTO A PROYECTOS Y BECAS

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Unidad Sinaloa, en el Departamento de Acuacultura, dentro del programa de doctorado en Ciencias en Biotecnología, bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Sainz Hernández y el Dr. Juan Manuel González Prieto. Este trabajo recibió financiamiento por parte de CONACyT con el proyecto de ciencia básica Genotipos de tripsina en *Litopenaeus vannamei* y su relación con su capacidad digestiva con número de registro 128258 y por el IPN a través de los proyectos SIP: 20151139 y 20141097. La alumna Jazmin Asusena Aguiñaga Cruz fue apoyada con la beca CONACyT con clave344823. Adicionalmente obtuvo apoyo económico como becaria BEIFI. La autora agradece el apoyo otorgado durante la realización del presente trabajo de investigación.

DIRECTORES

Dr. Juan Carlos Sainz Hernández

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR),
Unidad Sinaloa.

Dr. Juan Manuel González Prieto

Centro de Biotecnología Genómica (CBG)

TUTORES

Dr. Sergio Medina Godoy

Dr. Francisco Vargas Albores

Dr. Carlos Ligné Calderón

DEDICATORIA

A mis padres e hija

AGRADECIMIENTOS

A mis padres **Jesús Aguiñaga Gaytan y Antonia Cruz Rodríguez**, gracias por estar siempre apoyándome incondicionalmente en mi crecimiento profesional, les estaré eternamente agradecida. Este logro no es solo mío también les pertenece, los amo y gracias.

A mi hija **Paula Gabriela**, gracias Pau Pau por tolerar esas largas ausencias de tu mami. Todo lo que hago es y será para nuestro bienestar, te amo hija.

A mi director de tesis el **Dr. Juan Carlos Sainz Hernández**, gracias por confiar en mí y apoyarme en lo académico.

A mi director de tesis el **Dr. Juan Manuel González Prieto**, gracias por todas sus observaciones y aportaciones a este trabajo.

Al **Dr. Francisco Vargas Albores**, por aceptarme como alumna y apoyarme durante la estancia realizada en su laboratorio.

A los doctores **Sergio Medina Godoy y Carlos Ligné Calderón**, por sus aportes en la revisión de la tesis.

A mis compañeros de muestreo, **Heriberto, Dany, Cinthya, Cris, Alicia, Arturo, Max, Ismael, Brenda, John, Alexis, Juan Manuel**, gracias por aguantar tantas horas de trabajo y siempre con buena actitud.

Al **Grupo Acuícola Los Ahumada**, por todas las facilidades otorgadas para realizar los experimentos en sus granjas y Laboratorio de producción de poslarvas **Biomarina Reproductiva**.

A **Fernando Pino**, por permitirnos trabajar en las instalaciones de maduración en Biomarina Reproductiva.

A los biólogos **Gildardo Montoya y Manuel**, así como a los trabajadores de las granjas San Juan y Buenavista por todas las facilidades otorgadas durante los días de muestreo.

Índice

Índice.....	II
Lista de figuras.....	IV
Lista de cuadros.....	V
Resumen.....	VI
Abstract.....	VII
Glosario.....	X
Abreviaturas.....	XI
1 Introducción	1
2 Antecedentes	4
2.1 Camaronicultura en México.....	4
2.2 Ciclo de vida de <i>Litopenaeus vannamei</i>	4
2.3 Sistema digestivo en crustáceos.....	5
2.4 Tripsina	5
2.5 Isoenzimas de tripsina digestiva en <i>Litopenaeus vannamei</i>	6
2.6 Origen de los tres genotipos de tripsina digestiva en <i>Litopenaeus vannamei</i>	7
2.7 Polimorfismo de tripsina en otras especies heterótrofas y sus ventajas.....	7
2.8 Estructura genética e indicadores.....	9
2.9 Análisis de genética de poblaciones en peneidos	10
3 Justificación.....	14
4 Hipótesis.....	15
5 Objetivos	16
5.1 General.....	16
5.2 Específicos	16
6 Metodología	17
6.1 Análisis de la distribución de tres patrones de tripsina digestiva en reproductores en centros de producción de poslarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> en Sinaloa.....	17
6.1.1 Toma de muestra	17

6.1.2	Análisis electroforético y revelado de patrones de tripsina digestiva	18
6.1.2.1	Revelado de los patrones con tinción de plata para proteínas	18
6.2	Determinación de la estructura poblacional para el locus AB de tripsina digestiva en reproductores en los centros de producción de poslarvas del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	19
6.3	Determinación de las causas de la ausencia de camarones reproductores de <i>Litopenaeus vannamei</i> con patrón enzimático de tripsina digestiva CA	20
6.3.1	Estrategia experimental	20
6.3.2	Obtención de poslarvas a partir de padres con patrón de tripsina CBA	21
6.3.2.1	Identificación de los reproductores con patrón CBA.....	21
6.3.2.2	Mantenimiento de reproductores maduros y cruzas de reproductores CBA.....	21
6.3.2.3	Manejo, transporte y siembra de poslarvas a sistemas de engorda de camarón	21
6.3.2.4	Toma de muestra, preparación del extracto enzimático en las distintas etapas de cultivo; revelado de los patrones por SDS-PAGE y distintos métodos de tinción	22
6.3.2.4.1.1	Revelado de los patrones por actividad de proteasas.....	22
6.3.2.4.1.2	Tinción con solución de Azul de Coomassie	22
6.3.2.5	Análisis estadístico.....	23
7	Resultados	24
7.1	Análisis de la distribución de tres patrones de tripsina digestiva en reproductores en centros de producción de poslarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i>	24
7.2	Determinación de la estructura poblacional para el locus AB de tripsina digestiva de reproductores en los centros de producción de poslarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> . .	25
7.3	Determinación de las causas de la ausencia de camarones reproductores de <i>Litopenaeus vannamei</i> con patrón CA.....	29
8	Discusión.....	30
8.1	Análisis de la distribución de tres patrones de tripsina digestiva en reproductores en centros de producción de poslarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i>	30
9	Conclusión.....	36
10	Bibliografía	37

Lista de figuras

Figura 1. Isoenzimas y patrones de tripsina digestiva en <i>Litopenaeus vannamei</i>	6
Figura 2. Cruzas de reproductores con patrón de tripsina conocido para la generación de poblaciones con el 100% de cada patrón.	7
Figura 3. Patrones y genotipos inferidos en la glándula digestiva de <i>Litopenaeus vannamei</i>	7
Figura 4. Centros de producción de poslarvas en el estado de Sinaloa (CESASIN, 2012)..	17
Figura 5. Estrategia experimental para el análisis de la distribución de tres patrones de tripsina de una población de camarones provenientes de una cruce homóloga CBA.	20
Figura 6. Distribución de patrones de tripsina en 11 centros de producción de poslarvas de camarón en el estado de Sinaloa.	24
Figura 7. UPGMA está basado en los valores de FST por comparación pareada. El dendograma muestra la diferenciación genética entre los once centros de producción analizados en Sinaloa.	28
Figura 8. Distribución de los tres patrones de tripsina digestiva en sistemas de engorda para <i>Litopenaeus vannamei</i> en progenie proveniente de la cruce homóloga CBA.	29

Lista de cuadros

Tabla 1. Proporción de genotipos de tripsina digestiva en poblaciones de reproductores en centros de producción de poslarvas de camarón en Sinaloa.....	25
Tabla 2. Indicadores genéticos en poblaciones de reproductores en centros producción de poslarvas de camarón en Sinaloa para el locus AB de tripsina. Ho. Heterocigosidad observada. He. Heterocigosidad esperada. P. significancia de la prueba de exceso de heterocigotos. FIS índice de endogamia.....	26
Tabla 3. Comparación pareada entre los centros de producción de poslarva. Los valores de FST en negrita no son estadísticamente significantes ($P>0.05$).	27

Resumen

Con la finalidad de incrementar el rendimiento productivo de crustáceos diversas investigaciones se han enfocado al sistema digestivo. En la glándula digestiva de *Litopenaeus vannamei* existen tres isoenzimas de tripsina digestiva (C, B y A) que conforman tres patrones de acuerdo al bandeo electroforético visualizado en SDS-PAGE (CBA, CB y CA), se conoce presentan segregación mendeliana y con cruza específicas se puede obtener en la F1 progenie con el 100 % de cada patrón y este permanece durante todo el ciclo de vida del organismo, además se tiene evidencia que presentan diferencias significativas al analizar la digestibilidad de la proteína *in vitro* usando la técnica del pH-Stat. Contar con organismos que presentan este tipo de características mejorara algunas variables de producción en la industria de la camaronicultura. Por ello, es necesario evaluar a cada población de camarones con el patrón específico de tripsina y realizar una serie de estudios que permitan definir las ventajas de cada patrón. El objetivo del presente trabajo fue analizar la estructura genética poblacional y la distribución alélica de la enzima tripsina digestiva en centros de producción de poslarvas del camarón blanco *L. vannamei*. Se analizó un total de 2828 reproductores en 11 centros de producción de poslarvas en el estado de Sinaloa. Los parámetros evaluados para el análisis de la estructura genética fueron: frecuencias alélicas, heterocigosidad observada y esperada, F_{IS} , F_{ST} y el equilibrio de Hardy-Weinberg, para este análisis los patrones alélicos de tripsina fueron tomados como genotipos. El resultado mostró una alta frecuencia para el patrón CBA, seguido del CB y una baja frecuencia del patrón CA en 7 de los 11 centros analizados. Se presentó un exceso de heterocigotos y un desequilibrio en la prueba de Hardy-Weinberg para 10 de los 11 centros analizados. El análisis F_{IS} no mostró evidencias de endogamia con respecto al gen polimórfico de tripsina digestiva. Estos resultados llevaron a un segundo análisis que fue conocer por qué el patrón CA no se encuentra dentro de los centros de producción. Para ello se realizó una cruce dirigida con reproductores CBA para obtener una población con los tres patrones y se le dio seguimiento durante todo un ciclo completo de producción. Esta población fue sembrada y cultivada en 9 estanques de 0.6 ha en dos granjas comerciales de engorda en el municipio de Guasave, Sinaloa. Se analizaron las frecuencias de los tres patrones cada 15 días del cultivo y el resultado fue que menos del 5% de los organismos CA llegan a la etapa de siembra, la

mayoría muere en etapas larvarias. En conclusión, no es posible generar el 100% de organismos con los tres patrones; la ausencia de organismos con patrón CA es debido a que ellos mueren en etapas tempranas del cultivo. Es necesario establecer una estrategia diferente para conocer las ventajas en cultivo de cada uno de los patrones y experimentar con cruza recíprocas y homólogas entre organismos con patrón CBA y CB.

Abstract

In order to increase the productive yield of crustaceans, several investigations have focused on the digestive system. In the digestive gland of *Litopenaeus vannamei*, three isoenzymes of trypsin called C, B and A with different kinetic and biochemical characteristics were reported. Three patterns of these isotrypsins were visualized utilizing the SDS-PAGE technique (CBA, CB and CA) and two genes were described to give origin to these patterns, are known to present segregation Mendelian and cross specific results can be obtained in F1 progeny with 100% of each pattern and this remains throughout the life cycle of the organism, in addition there is evidence that present significant differences when analyzing the digestibility of the protein in vitro using the technique of pH-Stat. Having organisms with this type of characteristics will improve some production variables in the shrimp farming industry. In this study the distribution and population structure of digestive trypsin patterns in eleven commercial hatcheries from Sinaloa state, México, were analyzed. A total of 2828 broodstock shrimp were analyzed. The three allelic patterns of trypsin (CA, CB, CBA) were considered here as genotypes, and then the genotypic frequencies per hatchery were analyzed and tested for Hardy–Weinberg equilibrium, and F_{IS} as an index of endogamy. Results showed that pattern CBA was the most abundant, followed by CB and the less frequent was the pattern CA. This over-dominance of CBA resulted in a significant excess of heterozygosity and a departure of Hardy-Weinberg Equilibrium in the hatcheries, except for the J hatchery, where heterozygosity excess was not significant. In the eleven analyzed hatcheries, the CA pattern was present in a very low frequency followed by CB and the most frequent pattern was CBA. F_{IS} analysis did not show evidence of endogamy. These results led to a second analysis that was to know why the CA pattern is not found inside the production centers. A cross-breeding with CBA breeding was carried out to obtain a population with all three patterns and was followed during a whole production cycle. The postlarvae obtained (PL20) were transported to a two commercial farms and stocked in nine 0.6 ha ponds at 12 shrimp m^2 . To describe the fluctuations in the trypsin pattern frequencies, samples of 120 shrimp were collected from each pond every 15 days, starting the day of stocking in a culture period of 75 days. Results showed that the frequency of the CA pattern decreases to 5% after larval development and reaches 0% at 45 days in culture. The CB pattern decreases to 16%, and the CBA pattern increases constantly during the culture to reach 84%. In conclusions, at commercial level, it is not possible to produce 100% of each

pattern; perhaps some experimental ones that allow us describe variables in laboratory; the absence of organisms with CA pattern was because they died in early stages of culture.

Glosario

Acuicultura: Conjunto de técnicas y actividades cuyo objetivo es la cría en cautiverio de organismos acuáticos (peces, moluscos, crustáceos, reptiles o algas) en agua cuyo mayor o menor carácter intensivo depende del grado de intervención del hombre en los ciclos biológicos de los organismos en cuestión.

Alelo: Una de dos o más formas alternativas de un gen, cada una con una secuencia de nucleótidos única.

Aloenzima: Variante de una enzima que es codificada por un alelo diferente.

Distancia genética: Medidas del grado de la magnitud de las diferencias genéticas entre individuos, poblaciones o especies. Medida del grado de sustituciones por nucleótido entre dos secuencias homólogas de ADN.

Diversidad genética: Medida de la variabilidad genética en una población.

Eficiencia catalítica. Es la eficiencia con la cual una enzima cataliza una reacción en particular.

Electroforesis: Separación de moléculas cargadas en un campo eléctrico por la migración diferencial a través de un gel de acuerdo a su tamaño y su carga iónica.

Endogamia: Apareamiento de organismos relacionados entre sí, que trae consigo un aumento en la homocigosidad y posible expresión de genes deletéreos.

Enzima: Biomolécula, proteína o RNA que cataliza la reacción química de sustratos sin ser autodestruida o alterada al final de la reacción.

Equilibrio de Hardy-Weinberg: Es aquel que se da cuando al reproducirse las poblaciones pueden seguir patrones predecibles en cuanto a sus frecuencias genotípicas, es decir, que bajo ciertas condiciones tales como apareamiento al azar dentro de las poblaciones, donde ningún genotipo en particular sea seleccionado, los efectos de migración o mutación en las frecuencias alélicas sean insignificantes, y el tamaño de la población sea infinito, la segregación alélica siga un ajuste normal a la segregación mendeliana.

Fenotipo: Características desplegadas por un organismo bajo factores ambientales particulares. Es el resultado de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente.

Frecuencia alélica: Proporción de un alelo relativo a todos los alelos de un locus dentro de una población.

Gen: Unidad hereditaria que contiene información genética (ADN) que es transcrita a ARN y traducida a una cadena polipeptídica (proteína). En el genoma de un organismo, es una secuencia de nucleótidos a la que se le puede asignar una función específica.

Genética: Rama de la Biología en la que se estudia la herencia y variación de los caracteres, así como la estructura y función del material genético (ADN).

Genética de poblaciones: Rama de la Genética en la que se estudia la variabilidad de las poblaciones naturales, expresada en frecuencias genotípicas y alélicas de ciertos marcadores moleculares, así como los mecanismos que la hacen variar en generaciones consecutivas.

Genoma: Término utilizado para referirse a todos los genes (información genética) contenida en un solo gameto, es decir un representativo de cada cromosoma.

Genotipo: La constitución genética de un organismo, que estará dada por la información heredada por ambos padres. Específicamente para un solo locus, el genotipo estará dado por los alelos heredados por ambos padres y es distinto de los caracteres expresados o fenotipo.

Glándula digestiva: Órgano productor y secretor de enzimas digestivas en organismos invertebrados.

Heredado: Deriva de un código genético preformado y que está presente en los padres. Contrasta con lo adquirido.

Heterocigoto: Un organismo diploide que ha heredado diferentes alelos en uno o más de sus loci.

Heterocigosidad: La proporción de individuos heterocigotos para un locus o en promedio para varios loci. Es un estimador de variabilidad genética en poblaciones naturales o domesticadas.

Heterocigosidad esperada: Proporción de organismos heterocigotos calculada a partir del equilibrio de Hardy-Weinberg. Su cálculo implica la obtención de las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas siguiendo un binomio al cuadrado $(p + q)^2$, en donde p y q son las frecuencias alélicas y $2pq$ corresponderá a la frecuencia de heterocigotos.

Heterocigosidad observada: Proporción de organismos heterocigotos calculada a partir de los genotipos observados en una muestra poblacional.

Heterocigoto. Un individuo diploide o poliploide que ha heredado diferentes alelos en uno o más de sus loci.

Hidrólisis. La partición de un compuesto en fragmentos por la adición de agua, el grupo hidroxilo incorporado en un fragmento y el átomo de hidrógeno en el otro.

Homocigoto. Un organismo que ha heredado el mismo alelo de ambos padres para un determinado locus.

Índice de fijación: (FST) Mide los efectos de la subdivisión de la población. Se refiere a la consanguinidad en las subpoblaciones (S), en relación a la población total (T), de la cual ella es parte. Mide el grado de diferenciación génica entre las poblaciones, en función de las frecuencias alélicas.

Isoenzimas: Múltiples formas de un enzima que catalizan la misma reacción pero que difieren una de otras en su secuencia de aminoácidos, pueden ser distinguibles utilizando técnicas de electroforesis.

Km: Es la concentración de sustrato que resulta en la mitad de la velocidad máxima para la reacción enzimática.

Locus: La posición que un gen tiene en un cromosoma o dentro de un segmento de ADN genómico. Por convencionalismo, se aplica el término para referirse a genes aun cuando no se conozca su lugar en el genoma.

Loci: Plural de locus.

MENDEL, Ley de la Segregación: Los factores de un par de caracteres son segregados. Es la separación de los dos alelos de un individuo diploide en diferentes gametos y por ende segregación en la progenie.

Peso molecular: es la suma de los pesos atómicos de todos los átomos que constituyen la molécula; la masa de una molécula con respecto a la masa de un átomo estándar Carbono 12.

Población: Grupo de organismos de la misma especie que habitan una determinada área geográfica y que por ende se entrecruzan y comparten un acervo común de genes.

Polimorfismo: Ocurrencia de diferentes variantes alélicas para un locus específico en una población. Se considera que un locus es polimórfico cuando en la muestra poblacional la frecuencia del alelo más común no rebase el 95-99%.

Proteína: Macromolécula compuesta por una o varias cadenas polipeptídicas de más de 100 amino ácidos, cada una de las cuales tiene una secuencia característica de aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos. Las proteínas ceden sus aminoácidos tras una hidrólisis, para

ser asimilados y ayudar a la reconstrucción de proteína en los ribosomas de las células corporales.

Proteinasas: Es una enzima que corta las proteínas en posiciones internas de una cadena peptídica. Formalmente, las enzimas son peptidil péptido hidrolasas.

Punto Isoeléctrico: Es el pH en el cual una proteína pierde toda su carga eléctrica. El punto isoeléctrico es muy importante en la purificación de proteína porque este es el pH en el cual la solubilidad es mínima y en donde la movilidad en un sistema de electro-enfoque es cero. Es el punto en el que la proteína se puede acumular.

Tripsina: es una enzima peptidasa, que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos. De acuerdo a la comisión de enzimología su clasificación es: E.C. 3.4.21.4.

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
CaCl	Cloruro de Calcio
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
F1	Primera generación
F _{IS}	Medida de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg dentro de las subpoblaciones
F _{ST}	Medida de la diferenciación sobre las poblaciones
g	Gramos
H _e	Heterocigosidad esperada
H _o	Heterocigosidad observada
m	Metros
mM	Milimolar
mm	milímetros
M	Molaridad
mA	Miliamperes
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pH	Potencial de iones de hidrogeno
μg	Microgramo
μl	Microlitro
V	Voltios

1 Introducción

Las capturas mundiales recientes de camarón ascienden a alrededor de 3.3 millones de toneladas por año, siendo Asia el área de pesca del camarón más relevante. La producción camaronera mundial, tanto de captura como de criadero, es de aproximadamente 6 millones de toneladas, de las cuales alrededor del 60 por ciento entra en el mercado mundial. En términos de valor, el camarón es hoy el producto pesquero comercializado internacionalmente más importante. En muchos países tropicales en desarrollo es el producto de exportación pesquero más valioso; y su efecto en el empleo también es considerable (FAO, 2010). El camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* (Pérez-Farfante y Kensley, 1997) es la especie que obtiene los mejores rendimientos de crecimiento y la que tolera mejor las condiciones ambientales en cautiverio. En México, el camarón blanco es la principal especie que se cultiva, en el año 2013 se ubicó en el 4to lugar por el volumen de producción alcanzados en ese mismo año; sin embargo, por su valor, se ubicó en el primer lugar. *L. vannamei* es de las principales especies exportadas a los países de Estados Unidos de América, Japón y España. En nuestro país, la mayoría de los cultivos de peneidos se encuentran ubicados en la región Noroeste siendo los estados de Sonora y Sinaloa los líderes en la producción de esta especie aportando 25,391 y 61,000 t respectivamente en el año 2013 (CONAPESCA, 2014). En Sinaloa en el 2012 se contaba con 49,305 ha de estanquería para el cultivo semi-intensivo de camarón blanco *L. vannamei* con una producción de 45,151 t (CESASIN, 2012) mientras que en el 2015 aumentó el número de estanques sembrados a 55,097 ha (CESASIN, 2016). La producción de este crustáceo ha mostrado un incremento año con año, en 2013 se produjeron 127 mil 517 toneladas a 211 mil 96 toneladas al cierre preliminar de 2016 (SAGARPA, 2017).

El suministro de poslarvas a las piscinas camaroneras son la materia prima o la base de cualquier operación de engorde de crustáceos. La camaronicultura depende de las poslarvas producidas en centros especializados de producción de poslarvas que son sembradas y cultivadas dentro de los estanques de engorda. En Sinaloa la demanda de poslarva de camarón inicia a partir del mes de marzo, siendo este estado el líder en la producción de este vital

insumo para la camaronicultura. En Sinaloa se tiene una capacidad instalada superior a 3,000 millones de poslarvas mensuales en alrededor 22 centros de producción y se localizan principalmente en las zonas costeras de los municipios de El Rosario y Elota, mismas que aportan el 70% de la siembra de poslarva en el país (CESASIN, 2012). Del 100% de la producción de poslarva en Sinaloa, el 55% es para autoconsumo y el restante se comercializa a estados como Sonora, Nayarit, Colima, Tamaulipas, Campeche y Tabasco (CESASIN, 2012). Con el crecimiento de la camaronicultura, la demanda de poslarva aumenta, por lo que es necesario que los centros de producción optimicen sus producciones y obtengan una mayor cantidad de poslarvas para satisfacer esta demanda, así como, generar poslarvas de mejor calidad que permita la rentabilidad de esta industria. Para ello, a nivel mundial se han llevado a cabo diversas investigaciones para el mejoramiento genético para obtener camarones con una mayor tasa de supervivencia, mayor crecimiento, resistencia a patógenos y mayor capacidad metabólica. Goyard et al. (2008) cruzaron dos líneas de *L. stylirostris* domesticadas en lugares distintos de América (Hawaii y Nueva Caledonia). Los camarones cultivados en Nueva Caledonia, eran afectados por vibriosis y el uso de antibióticos no era permitido por lo que introdujeron organismos provenientes de Hawaii con la finalidad de que las poblaciones se cruzaran para incrementar la variabilidad alélica y comenzar un programa de mejora genética por hibridación. En este programa se obtuvieron mejoras de hasta el 37% más en crecimiento en los organismos híbridos no endogámicos, respecto a las dos líneas puras. Cock et al. (2009) efectuaron cruza selectivas en camarones peneidos para evaluar la resistencia a enfermedades como TSV y WSSV con la finalidad de influir directamente en la supervivencia. Además encontraron que se puede registrar variación genética a través de las generaciones al realizar un manejo genético adecuado y por lo tanto son necesarios programas de monitoreo permanente para prevenir la endogamia.

El sistema digestivo de los organismos es el encargado de poner a disponibilidad la mayor cantidad de proteína, carbohidratos y lípidos por medio del proceso llamado catabolismo (Dall, 1992). Un catabolismo deficiente compromete el buen desarrollo de los organismos e incluso su supervivencia ante la presencia de factores biológicos y ambientales. Por otro lado, un buen catabolismo proporciona ventajas porque pone a disposición materiales estructurales y energéticos para el buen desarrollo de los organismos. El sistema digestivo del camarón blanco *L. vannamei* está compuesto de diversas proteasas tales como

quimotripsina (E.C. 3.4.21.1), elastasa (E.C.3.4.21.37) y tripsina (E.C.3.4.21.4) respecto a que se encargan del desdoblamiento de proteínas. En la glándula digestiva de *L. vannamei* existen tres isoenzimas (Klein *et al.*, 1996; 1998) que tienen diferente capacidad catalítica *in vitro* (Sainz-Hernández *et al.*, 2004). Las tres isoenzimas son identificadas por su corrimiento electroforético (SDS-PAGE) y estos patrones son heredados a la progenie según las leyes de Mendel y se mantienen sin cambio alguno durante el ciclo de vida del camarón (Sainz-Hernández *et al.*, 2005). Los patrones de tripsina son derivados de dos genes, por lo que, mediante cruza específicas de reproductores con patrón de tripsina conocido se puede obtener en la F1 el 100% de cada patrón (Sainz-Hernández *et al.*, 2005). Esta evidencia abre una nueva línea de investigación donde se pretende definir si uno de los patrones tiene ventajas en el cultivo como una mayor supervivencia, mejor aprovechamiento del alimento y por ende una disminución en los costos de producción. Para ello, es necesario conocer la estructura genética poblacional del gen de tripsina que origina las isoenzimas A y B dentro de los centros de producción de poslarva para conocer su distribución y proponer una estrategia que ayude a generar líneas de camarón con patrones de tripsina independientes e iniciar una serie de estudios que permitan definir las ventajas o desventajas de los camarones por tener en su sistema digestivo un patrón específico de tripsina. Si la hipótesis planteada que dice que existen diferencias en la capacidad hidrolítica entre los camarones por presentar un patrón específico de tripsina es aceptada, será necesario llevar a cabo una evaluación de las variables de producción y así definir qué patrón es el indicado para mantenerlo dentro de los estanques de engorda para fortalecer la rentabilidad del cultivo, reduciendo los gastos económicos que se generan desde la producción de la poslarva y su desarrollo dentro de los sistemas de engorda hasta la etapa de cosecha.

2 Antecedentes

2.1 Camaronicultura en México

En México, al igual que en la mayoría de los países, una de las actividades que ha adquirido gran importancia en los últimos años es la acuicultura, arrojando beneficios sociales y económicos los cuales a su vez se han traducido en una fuente de alimentación con un elevado valor nutricional. El cultivo de crustáceos, particularmente de camarón, ocupa un lugar preponderante debido a la importancia en términos del volumen económico que este recurso representa para la región del Noroeste del Pacífico Mexicano. El cultivo de camarón inició en México a gran escala durante los años de 1985-1990 y creció a través de los años 90's basado en el cultivo del camarón azul del Pacífico, *Litopenaeus stylirostris*. Sin embargo, esta especie presentó poca resistencia a las enfermedades, por lo que la industria de camarón optó por utilizar el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* convirtiéndolo en la principal especie cultivada en la camaronicultura. Los programas de domesticación y selección genética permitieron un suministro más consistente de poslarvas de alta calidad, libres de patógenos específicos (SPF) y/o resistentes (SPR), que eran criadas en incubadoras. Algunas poslarvas fueron enviadas a Hawaii en 1989, obteniéndose las líneas de producción SPF y SPR por sus siglas en inglés y que posteriormente condujeron a su industrialización en Estados Unidos de Norteamérica y en Asia (FAO, 2006). En México, la camaronicultura depende de las poslarvas producidas en centros especializados de producción de poslarvas que son sembradas y cultivadas dentro de los estanques de engorda, se cuenta con 22 centros de producción de poslarvas ubicados al sur de Sinaloa (CESASIN, 2012).

2.2 Ciclo de vida de *Litopenaeus vannamei*

El camarón blanco *L. vannamei* es una especie nativa de la costa oeste del Océano Pacífico, se distribuye geográficamente desde Sonora, en el Golfo de California, hasta Perú en Sudamérica. Se le puede encontrar en aguas costeras desde 0 a 72 m de profundidad, sobre fondos fangoso, con preferencia por las aguas marinas, y por las estuarinas desde postlarva hasta juvenil. Los adultos viven y se reproducen en mar abierto, mientras que la postlarva migra a las costas a pasar la etapa juvenil, la etapa adolescente y pre adulta en estuarios, lagunas costeras y manglares. Los machos maduran a partir de los 20 g y las hembras a partir

de los 28 g en edad de entre 6 y 7 meses. Cuando *L. vannamei* pesa entre 30 y 45 g libera entre 100 000 y 250 000 huevos de aproximadamente 0,22 mm de diámetro. La incubación ocurre aproximadamente 16 horas después del desove y la fertilización. En la primera etapa, la larva denominada nauplio, nada intermitentemente y es fotostática positiva. Los nauplios no requieren alimentación, sino que se nutren de su reserva embrionaria. Las siguientes etapas larvarias (protozoa, mysis y postlarva temprana respectivamente) continúan siendo planctónicas por algún tiempo, se alimentan del fitoplancton y del zooplancton, y son transportados a la costa por las corrientes mareales, seguido se trasladan a la costa y empiezan a alimentarse de detritos bénticos, gusanos, bivalvos y otros crustáceos (FAO, 2006).

2.3 Sistema digestivo en crustáceos

Los camarones poseen un aparato digestivo que está constituido por la boca que se localiza en la parte ventral anterior, el intestino anterior esta modificado en un estómago de dos cámaras, que posee dientes trituradores y cerdas filtradoras en forma de peine (Barnes, 1987). En el hepatopáncreas, los alimentos son degradados al entrar en contacto con sustancias digestivas y transformados en compuestos asimilables (Martínez-Córdova, 1994). Las funciones del tracto digestivo de los crustáceos son ingestión, transporte de ingesta, digestión, absorción, almacenamiento de nutrientes y transporte de nutrimentos a los vasos circulatorios y finalmente eliminación de las excretas al medio (Ceccaldi, 1997). El sistema digestivo del camarón blanco *L. vannamei* está compuesto de diversas proteasas como Quimotripsina (E.C. 3.4.21.1), Elastasa (E.C.3.4.21.37) y Tripsina (E.C.3.4.21.4).

2.4 Tripsina

La tripsina bovina fue purificada a principios de la década del 1930 (Northrup y Kunitz, 1931) y fue una de las primeras peptidasas aisladas con suficiente pureza y cantidad para llevar a cabo análisis bioquímicos (Northrup *et al.*, 1948); además, casi toda la secuencia aminoacídica se logró conocer en los años 1960 (Walsh *et al.*, 1964; Walsh y Wilcox, 1970). Con el advenimiento de la cristalografía de rayos X, la estructura tridimensional de la tripsina bovina fue resuelta en el año 1970 (Huber *et al.*, 1974; Sweet *et al.*, 1974; Kossiakoff *et al.*, 1977) y en las siguientes décadas la secuencia, estructura y mecanismo de acción fueron estudiados en un gran número de especies, incluyendo invertebrados. La tripsina es la

principal endopeptidasa digestiva de crustáceos y es considerada la enzima más importante en la digestión de la proteína de la dieta (Tidwell y Allan, 2001) y junto con la quimiotripsina es la más abundante enzima proteolítica en la glándula digestiva de crustáceos (Dall, 1992). La tripsina es una serin proteasa que hidroliza cuerpos peptídicos en el lado carboxilo de los residuos de aminoácidos cargados positivamente dentro de una proteína. Le-Moullac *et al.* (1996) mencionan la existencia de tres isoenzimas de tripsina en el sistema digestivo de *L. vannamei*. Las tres isoenzimas de tripsina digestiva fueron aisladas y caracterizadas por Sainz-Hernández *et al.* (2004) fueron nombradas C, B y A de acuerdo al corrimiento electroforético en SDS-PAGE (figura 1), las isoenzimas presentaron diferencias en la capacidad catalítica al hidrolizar BAPNA como sustrato específico para tripsina.

2.5 Isoenzimas de tripsina digestiva en *Litopenaeus vannamei*

Las tres isoenzimas de tripsina generan 3 diferentes patrones que son identificados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE al 12%), el primero conformado por las isoenzimas CBA, el segundo por las isoenzimas CB y el tercero CA (Fig.1). Los patrones de tripsina permanecen constantes durante toda la vida del organismo, presentan segregación mendeliana y la modulación de la actividad ocurre por un aumento o disminución en la transcripción de las isoenzimas presentes y no por procesos de encendido y apagado de genes (Sainz-Hernández *et al.*, 2005). Es posible, mediante cruza controladas generar una progenie de *L. vannamei* con el 100% de cualquiera de los 3 patrones (Sainz-Hernández *et al.*, 2005) (fig. 2).

		Fenotipos de Tripsina			
		CBA	CB	CA	kD
Isoenzimas	C	████████	████████	████████	23
	B	████████	████████		22
	A	████████		████████	21

Figura 1. Isoenzimas y fenotipos de tripsina digestiva en *Litopenaeus vannamei*.

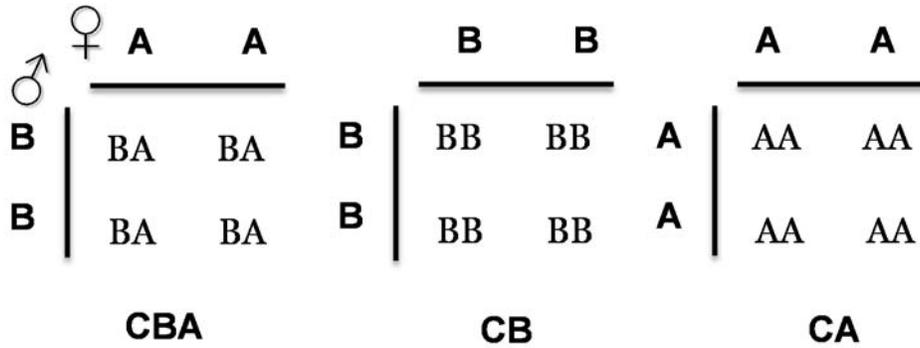


Figura 2. Cruzas de reproductores con patrón de tripsina conocido para la generación de poblaciones con el 100% de cada patrón.

2.6 Origen de los tres genotipos de tripsina digestiva en *Litopenaeus vannamei*

La presencia de varias isoformas de tripsina en los individuos de una población puede tener varios orígenes: que su síntesis esté codificada por distintos genes (Whitaker, 1994) otras pueden ser variantes alélicas codificadas por el mismo gen (Sainz-Hernández *et al.*, 2005) y otras que tengan el mismo origen pero que sufren modificaciones post-transcripcionales inducidas por factores internos y externos (Rungruangsak-Torrissen y Male, 2000). La enzima tripsina es una molécula monomérica que presenta polimorfismo (Klein *et al.*, 1996), 3 patrones de la enzima son visualizados en SDS-PAGE que son derivados de tres genotipos (Sainz-Hernández *et al.*, 2005) (fig. 3).

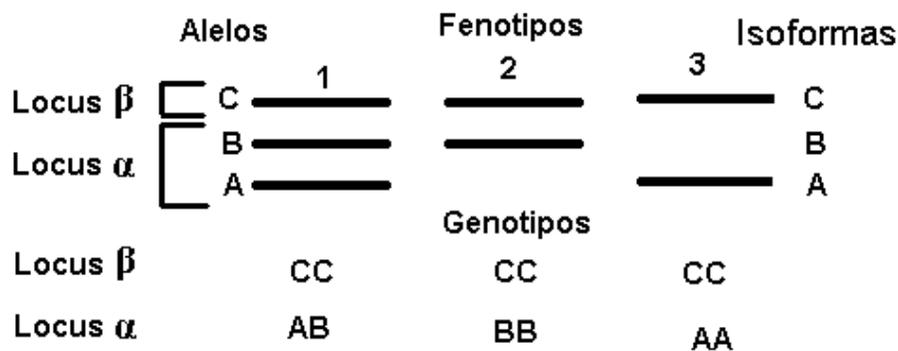


Figura 3. Patrones y genotipos inferidos en la glándula digestiva de *Litopenaeus vannamei*.

2.7 Polimorfismo de tripsina en otras especies heterótrofas y sus ventajas

Se ha reportado para diversas especies la presencia de isoenzimas de tripsina digestiva. En organismos como salmónidos se ha visto que hay un efecto positivo por la presencia de genes de determinadas isotripsinas sobre el crecimiento y desarrollo de estos peces, siendo esta

tripsina un marcador de crecimiento (Rungruangsak-Torrissen y Male, 2000). La presencia de una variante de tripsina (TRP-2*92) está influenciada por la temperatura del agua durante la incubación de los huevos y el periodo de inicio de la alimentación de las larvas, lo que después influye en la utilización del alimento que se traducen en incrementos de un 30% de peso al final del ciclo de vida completo (Rungruangsak y Male *et al.*, 2000). En adultos se mejora la eficiencia de la conversión alimenticia a bajas temperaturas (2-3 °C) (Torrissen *et al.*, 1993). Perera *et al.* (2010) describieron la presencia de tres isoenzimas y tres patrones de tripsina digestiva en la langosta espinosa *Panulirus argus* y demostraron que existen diferencias en la eficiencia de digestión de los tres patrones y reportan que el patrón que presenta las tres isoenzimas es el más frecuente en la población de langosta. Por otro lado, en la tilapia *Oreochromis niloticus* se ha descrito la presencia de múltiples isoformas de tripsina digestiva (Unajak *et al.*, 2012). Conocer el origen de las variantes de una molécula permite su modulación para obtener organismos con ventajas biológicas. Estas variaciones dan lugar a diferencias en las características biológicas de los organismos que las presentan y en general, se considera que aporta ventajas para el desarrollo y la permanencia de las especies (Hartl y Clark, 1997). Cordova-Murueta *et al.* (2008) analizaron la capacidad que tienen los 3 patrones de tripsina digestiva en *L. vannamei* para hidrolizar diferentes sustratos proteicos utilizando el método de digestibilidad *in vitro* pH-Stat encontrando que el patrón CBA hidroliza significativamente mayor cantidad de enlaces peptídicos que los patrones CB o CA. Los antecedentes reportados para *L. vannamei* mencionan que estos patrones no presentan modulación, son constantes durante el ciclo de vida del organismo y mediante cruza específicas se puede obtener poblaciones puras de cada patrón por lo que Rubio-Gastelum (2009) se enfocó en la búsqueda de reproductores de los tres patrones en 3 laboratorios de producción de poslarvas de camarón en Sinaloa y Nayarit con la finalidad de realizar cruza específicas y obtener progenies con el 100% de cada patrón de tripsina digestiva, e iniciar una serie de experimentos que definieran las ventajas o desventajas de los organismos por la presencia o ausencia de las isoenzimas. En este trabajo se reportaron las frecuencias de los tres patrones, donde el patrón CBA fue el más abundante con un 80%, seguido del patrón CB con 19.5% y por último el patrón CA con 0.5%. Estos dos últimos antecedentes evidencian que existen altas posibilidades de que el patrón CBA presente una mayor capacidad digestiva *in vivo* con respecto a los otros dos patrones. Navarrete del toro *et al.* (2011) analizaron el contenido de proteasas en la glándula digestiva de tres especies

comerciales de camarones (*L. vannamei*, *L. stylirostris* y *L. californiensis*) encuentran que las tres especies sintetizan proteasas siguiendo un patrón común con algunas peculiaridades en características como pH, temperatura, grado de hidrólisis e inhibidores, esas ligeras diferencias fueron suficientes para distinguirlas entre ellas y confirmar que son enzimas que divergieron por duplicación de genes y están relacionadas por especiación.

2.8 Estructura genética e indicadores

Dentro de una determinada especie no existe una absoluta homogeneidad genética, sino que distintas poblaciones de una misma especie pueden presentar ligeras diferencias genéticas. Los cambios en la composición genética de las poblaciones se deben a distintos mecanismos que afectan las frecuencias alélicas génicas de la población. Los procesos de mutación, recombinación, migración, deriva genética y selección natural influyen en la naturaleza y velocidad de estos cambios. Autores como Harlt y Clark (2007) indican que las variantes genéticas generadas por estos procesos pueden aumentar o disminuir la frecuencia, independientemente de si son o no cambios adaptativos útiles a sus portadores. En cambio la selección natural es el único proceso evolutivo que es direccional respecto a la adaptación. La naturaleza adaptativa de los organismos, tanto su fisiología como comportamiento es debida a la selección natural. En una población de cultivo, el hombre también actúa sobre la variabilidad genética seleccionando los fenotipos que determina algún carácter de importancia comercial, pero si no se tiene un manejo adecuado de los reproductores puede deteriorarse la variabilidad genética del cultivo.

Las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones constituyen la estructura genética. Cuando se habla de una especie con alta estructura genética, se refiere a que se pueden detectar fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones. En contraste, en una especie con baja estructura genética, las poblaciones que la constituyen son casi idénticas, con nulas o muy pocas diferencias en las frecuencias alélicas (Avise, 2000). Diversos indicadores genéticos son utilizados para conocer la diferenciación genética entre las poblaciones. La F_{is} describe la distribución de los genotipos dentro de las poblaciones e indica qué tan lejos se encuentra una población del equilibrio de Hardy-Weinberg. La F_{is} es de 0 si las poblaciones se encuentran en las proporciones esperadas si lo apareamientos fueran estrictamente al azar y pueden llegar hasta 1 si solo se encuentran los individuos homocigotos

en la población (lo cual en generalmente es una consecuencia de la endogamia extrema). El índice de fijación, representado como F_{st} , es un valor estadístico empleado para evaluar el nivel de diferenciación genética entre poblaciones. Se considera que un mayor efecto de la deriva genética derivará una mayor diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas y por lo tanto mayor valor de F_{st} . De manera que un $F_{st} = 0$ indica que no existen diferencias genéticas entre las poblaciones estudiadas, mientras que un valor de $F_{st} = 1$ implica un aislamiento genético entre las mismas, en cuanto a los loci estudiados.

2.9 Análisis de genética de poblaciones en peneidos

Los estudios de genética poblacional en animales son una herramienta útil para los programas de conservación, como demuestran Sunden y Davis, 1991. La pérdida de diversidad genética disminuye la capacidad de mantener y mejorar la producción pecuaria y reduce la aptitud para hacer frente a nuevas condiciones ambientales. 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 acerca de alelos raros, decrecimiento de la heterocigosidad e incremento en los niveles de entrecruzamiento dentro de los programas de cría. En términos de acuicultura, se ha enfatizado que los organismos que vayan a ser usados deberían de ser estudiados para determinar si existen diferencias suficientes entre las poblaciones, de tal manera que se favorezca alguna en particular para el cultivo bajo determinadas condiciones (Lightner, 1994). En el manejo y la conservación de los recursos explotados se debe incluir aspectos de la diversidad genética de las especies, debido a que algunos reproductores difieren en la tasa de crecimiento o la resistencia a enfermedades, entre otras características (Lester y Pante, 1992).

La identificación de stocks de camarones silvestres es importante porque proveen una importante fuente de diversidad genética en domesticación y programas de selección genética. La variabilidad genética es un importante aspecto para las especies sujetas a cultivo, tal es el caso de camarones peneidos. Es importante el monitoreo de los loci polimórficos, heterocigosidad y los niveles de endogamia ya que permite dar un seguimiento de la

descendencia y una mayor precisión en la evaluación de las poblaciones en cautiverio. Por ello, el monitoreo de la diversidad genética en los camarones peneidos es esencial para determinar el impacto de la selección artificial sobre medidas de variabilidad y mejorar los programas de selección de cría (Lester y Cook, 1987). Diversas investigaciones se han enfocado en describir la estructura poblacional de *L. vannamei* y otras especies de peneidos dentro de los laboratorios y en el medio natural para conocer el grado de variabilidad genética que existe en dichas poblaciones.

Ramos-Paredes et al. (2003) realizaron un análisis de genética poblacional en el camarón azul *Penaeus stylirostris* para describir la variabilidad genética de dos poblaciones salvajes y dos poblaciones cultivadas para determinar el parentesco entre ellas. Utilizando 17 sistemas enzimáticos y proteínas, lograron visualizar 31 loci, donde 11 fueron loci polimórficos en todos los organismos. En las dos poblaciones de camarones cultivados se encontró un mayor número de loci en desequilibrio en base a la prueba de Hardy-Weinberg con respecto a las poblaciones silvestres. Basados en las comparaciones de los valores de F_{st} y la distribución de las frecuencias alélicas, las poblaciones cultivadas fueron diferentes a las dos poblaciones salvajes. Los resultados arrojan la evidencia que la relación entre las poblaciones cultivadas es alta debido al alto valor del coeficiente de endogamia, y se ve reflejada en el UPGMA. También mencionan que el fenómeno de endogamia es muy común cuando no existe un buen manejo de los organismos en cautiverio y que han sido utilizados por varias generaciones.

Soto-Hernández y Grijalva-Chon (2004) analizaron la diferenciación genética de *L. vannamei* en tres laboratorios de poslarvas en el noroeste de México, así como; una población salvaje del norte de Sinaloa que fue usada como referencia. Se utilizaron 10 sistemas enzimáticos para determinar diferenciación genética de aloenzimas entre los tres laboratorios. Encuentran altos niveles de endogamia y una deficiencia en el número de heterocigotos para todas las muestras analizadas. Sólo en dos de las 10 aloenzimas se encontraron bajo equilibrio en la prueba de Hardy-Weinberg, para el resto de las muestras el análisis mostró un desequilibrio en la prueba de HW. Reportan una moderada diferenciación genética de acuerdo al F_{ST} (7.4%) entre los laboratorios y una mayor diferenciación con la población salvaje.

Valles-Jiménez et al. (2005) evaluaron la variación genética y la estructura poblacional de camarones salvajes de *L. vannamei* en cuatro regiones geográficas desde México hasta Panamá, utilizando 5 microsátelites de DNA. Encontraron que las poblaciones analizadas presentan una desviación en el Equilibrio de Hardy-Weinberg para 19 de los 20 locus analizados y esto fue la causa que en las poblaciones se registrara una alta deficiencia heterocigótica. El análisis de la comparación entre poblaciones (F_{st}), permitió dividir en tres regiones el área de estudio, mencionan que las condiciones físicas, oceanográficas y biológicas de cada área permitieron que las poblaciones analizadas fueran subdivididas genéticamente. Hacen alusión a la importancia de este tipo de información en la pesca, manejo en la acuicultura y conservación de las especies. El análisis con aloenzimas ha sido un método utilizado para determinar los niveles de variación y el grado de subdivisión genética para diversas especies de camarones (Lester y Pante, 1992; García-Machado *et al.*, 2001). Borrell et al. (2007) realizaron un análisis genético espacial y temporal del camarón blanco cubano *Penaeus (Litopenaeus) schmitti* en diferentes zonas geográficas de Cuba utilizando aloenzimas y microsátelites en 2003 y 2007. El análisis muestra que las poblaciones se encontraron bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg, además los resultados que obtienen muestran que existe heterogeneidad en una escala geográfica corta para esta especie debido a la ausencia de alguna evidencia de aislación por distancia, lo cual descarta la posibilidad de la existencia de una nueva población. Mencionan que esto es debido a un bajo flujo de genes por dos causas: 1) por la presencia de remolinos persistentes que ocurren en todas las plataformas y que contribuyen a la retención de la larva, 2) por la existencia de barreras geográficas en el Sur de la plataforma de Cuba.

Perez-Enriquez et al. (2009) analizaron el estatus de la diversidad genética en camarones de 6 laboratorios productores de poslarvas de *L. vannamei* en el noroeste de México utilizando 6 microsátélites como marcadores moleculares para medir el grado de endogamia. Analizaron el índice de fijación (endogamia), desviación de Hardy-Weinberg y FST entre las poblaciones. Los resultados muestran que a pesar de que los reproductores tienen 10 años en sistemas cerrados aún existen suficientes niveles de variación genética viables para los futuros programas de selección.

Mendoza-Cano et al. (2013) analizaron la diversidad genética del ADN mitocondrial en reproductores de *Litopenaeus vannamei* utilizados en el noroeste de México, en conjunto con el trabajo publicado por Pérez-Enriquez et al. (2009) ayudaron a fortalecer la hipótesis que los camarones que se encuentran en los laboratorios tienen un origen en común. Analizaron 5 laboratorios y una población silvestre, obtuvieron 36 haplotipos. El haplotipo H1 y H2 fueron los más frecuentes en los laboratorios. Mediante un árbol filogenético muestran que las muestras de los camarones cultivados y la muestra silvestre forman dos grupos (haplotipo H1 y haplotipo H2) que constituyen un clado bien diferenciado de sus secuencias, sugiriendo un ancestro común para todos los reproductores.

Los reproductores seleccionados para los programas de selección genética es de suma importancia evaluar las características del desempeño reproductivo, para evitar el deterioro de las características genéticas dentro de la población causado por la cruce de organismos emparentados (endogamia). De los Ríos-Pérez et al. (2017) analizaron el efecto de la endogamia en características reproductivas como número de huevos, tasa de fertilización, tasa de eclosión, número de nauplios en un núcleo genético de *Litopenaeus vannamei* en un laboratorio productor de poslarvas durante tres generaciones sucesivas en el 2010, 2011 y 2012. Encuentran diferencias significativas en la tasa de eclosión con el incremento en el coeficiente de endogamia y el número de huevos en el año 2010 y 2011. Mencionan que altos niveles de endogamia están involucrados en algunas características reproductivas por lo que deben ser analizados en cada generación.

3 Justificación

La camaronicultura es de las principales actividades acuícolas para el estado de Sinaloa, produciéndose miles de toneladas de camarón en dos ciclos de cultivo por año. Esta actividad tiene diferentes presiones que limitan la rentabilidad de la industria, en la parte biológica, los cultivos presentan una alta disparidad en tallas y considerables valores en el factor de conversión alimenticia, supervivencia y crecimiento. Para contrarrestar estas presiones, se han utilizado diversas estrategias de manejo empleando químicos y compuestos que aumentan los costos y que en muchos casos han sido contraproducentes.

En esta propuesta se analiza una alternativa basada en la manipulación de una característica propia de *L. vannamei*, el polimorfismo de la enzima tripsina digestiva. El polimorfismo de la tripsina genera tres patrones los cuales están asociados a tasas de supervivencia y capacidad hidrolítica significativa. Además, los patrones de tripsina pueden manipularse a través de cruces de reproductores con patrones de tripsina específicos. Para corroborar las ventajas y desventajas de cada patrón, se requiere conocer la estructura poblacional del gen polimórfico y los tres patrones de tripsina digestiva dentro de los centros de producción de poslarvas y así proponer una estrategia que nos permita generar poblaciones independientes de camarón con los tres patrones de tripsina.

4 Hipótesis

- Las poblaciones de reproductores de los centros de producción de poslarvas del camarón *Litopenaeus vannamei* está compuesta por tres patrones de tripsina digestiva y se encuentran bajo un equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus AB de la enzima tripsina digestiva.
- Las poslarvas provenientes de una cruce homóloga CBA:CBA mantienen la relación esperada 1:2:1 (CB: CBA: CA) de los tres patrones de tripsina digestiva durante todo un ciclo de cultivo.
- Es posible un manejo de los pies de cría existentes en los centros de producción de poslarvas y generar poblaciones con el 100% de cada uno de los patrones de tripsina digestiva.

5 Objetivos

5.1 General

Describir la estructura poblacional de la enzima tripsina digestiva en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en sistemas de producción en el estado de Sinaloa.

5.2 Específicos

- Analizar la distribución de tres patrones de tripsina digestiva en reproductores dentro de los centros de producción de poslarvas de *L. vannamei*.
- Determinar la estructura poblacional para el locus AB de tripsina digestiva en reproductores de los centros de producción de poslarvas de *L. vannamei*.
- Evaluar la supervivencia de camarones según los patrones de tripsina en una población de camarón blanco *L. vannamei* provenientes de una crucea homóloga CBA:CBA durante un ciclo completo de producción.

6 Metodología

6.1 Análisis de la distribución de tres patrones de tripsina digestiva en reproductores en centros de producción de poslarvas de *Litopenaeus vannamei* en Sinaloa.

6.1.1 Toma de muestra

Un total de 2828 muestras de heces fecales en camarones reproductores de 11 distintos centros de producción de poslarvas en el estado de Sinaloa fueron colectadas (fig. 4). Cada centro de producción fue nombrado con una letra de la A a K debido a la confidencialidad de los datos para cada centro productor. La toma de muestra consistió en capturar camarones, los cuales mantenían la hez fecal adherida esto para evitar la contaminación con heces de otros camarones. Cada camarón fue marcado con un anillo de identificación en el pedúnculo ocular y las muestras de heces fecales fueron colocadas en tubos Eppendorf que se mantuvieron en hielo para su posterior análisis. Cada extracto de heces fecales se preparó adicionando 60 μ L de agua destilada, se maceró hasta obtener una mezcla homogénea y seguido se colocaron en la centrifuga a 13 000 rpm por 20 minutos a 4 °C (Cordova-Murueta *et al.*, 2003).

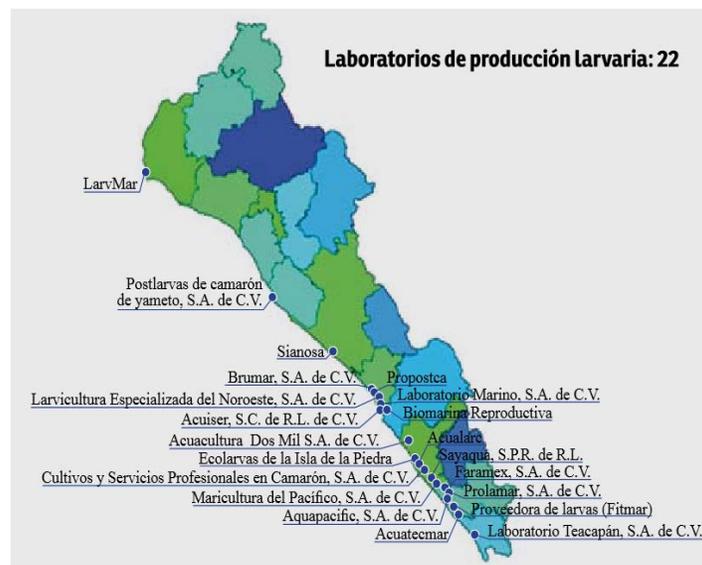


Figura 4. Centros de producción de poslarvas en el estado de Sinaloa (CESASIN, 2012).

6.1.2 Análisis electroforético y revelado de patrones de tripsina digestiva

Un volumen de 20 uL de cada extracto fue sometido a una electroforesis en gel (SDS-PAGE) al 12 %, el cual es una mezcla de poliacrilamida (acrilamida 300 g/L y bisacrilamida 8 g/L), buffer de separación de proteínas (Trisma base 0.5 M, pH 6.8), buffer de corrida (Trisma base 1.5 M, pH 8.8), SDS (dodecil sulfato de sodio) 10%, APS (persulfato de amonio) 10%, TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina) y H₂O destilada. Las condiciones de corrida fueron 120 V y 20 mA por gel durante 3 horas, manteniendo la cámara electroforética a una temperatura de 4°C (Sainz-Hernández *et al.*, 2004).

6.1.2.1 Revelado de los patrones con tinción de plata para proteínas

El revelado de las bandas de proteína que conforman los patrones de tripsina se hizo con la técnica de tinción con plata para proteínas (Heukeshoven y Dernick, 1985). Esta técnica consiste en sumergir los geles en diferentes soluciones durante determinados tiempos: el primer paso es sumergirlos en Solución Fijadora (ácido acético 10% (v/v) durante 30 minutos, una vez transcurrido el tiempo se extraen de la solución y se sumergen a solución sensibilizante (etanol 30% (v/v), acetato de sodio 6.8% (w/v), tiosulfato de Sodio 0.2% (w/v), y glutaraldehído 0.125% (v/v) durante 30 min, se enjuagan 3 veces con agua destilada por 10 minutos cada tiempo. Los geles son sumergidos en solución de plata (nitrate de Plata 0.25% (w/v), y formaldehído 0.015% (v/v) por 20 minutos y son enjuagados con agua destilada por 2 min; seguido se colocan en solución de revelado (carbonato de sodio 2.5% (w/v), y formaldehído 0.0074% (v/v) durante 5 min o hasta que las bandas de proteínas puedan ser observadas en el gel. Una vez observadas todas las bandas, el gel es colocado en solución “Stop” (Na₂EDTA 1.5% (w/v) para detener el proceso de tinción y es enjuagado nuevamente con agua destilada por 5 minutos.

6.2 Determinación de la estructura poblacional para el locus AB de tripsina digestiva en reproductores en los centros de producción de poslarvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

Con los resultados del revelado de los patrones de tripsina en el apartado anterior se realizó el análisis de la estructura poblacional para el locus AB de tripsina digestiva. Los patrones fueron considerados como genotipos, aquellos conformados por las aloenzimas BA se contaron como organismos heterocigotos y aquellos que presentaron aloenzimas BB o AA fueron contados como organismos homocigotos. Con la ayuda de la utilidad MsTools (Park, 2001) para el programa Excel de Microsoft Office 2003, se creó una base de datos para los diferentes formatos de los programas empleados para los análisis estadísticos. Utilizando el programa Genepop v4, se calcularon las frecuencias alélicas, heterocigocidad observada (H_o) y heterocigocidad esperada (H_e), para cada población. La frecuencia de los patrones por centro productor de larvas fue analizada e integrada en la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg aplicando la prueba de excesos de heterocigotos con el programa Genepop v4; así como también, se evaluó el índice de endogamia (FIS) (Rousset, 2008). La estructura de los genotipos de tripsina fue analizada por comparación pareada entre los 11 centros de producción de acuerdo a la prueba estadística F_{ST} con el programa Alerquin v3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). Una matriz de distancia genética fue calculada y evaluada con una significancia de $\alpha = 0.05$. Esta matriz fue utilizada como un archivo en Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013) para generar un análisis Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) que muestra la relación entre los centros de producción en un dendograma.

6.3 Determinación de las causas de la ausencia de camarones reproductores de *Litopenaeus vannamei* con patrón enzimático de tripsina digestiva CA

6.3.1 Estrategia experimental

En el centro de producción de poslarvas K se detectaron y aislaron reproductores machos y hembras con patrón CBA. Estos organismos fueron cruzados para obtener una población con la relación esperada de los tres patrones de tripsina digestiva 1:2:1 (CB:CBA:CA) (Sainz-Hernández *et al.*, 2005). Se cruzaron 50 hembras y 50 machos, esta progenie fue sembrada en dos granjas camaroneras ubicadas en Guasave, Sinaloa: San Juan y Buenavista, utilizando 5 y 4 estanques respectivamente con una dimensión de 0.6 ha. Se tomaron muestras de poslarvas PL-20 (siembra) y cada 15 días posteriores a la siembra hasta el final del cultivo. Cada muestra consistió en 120 organismos por estanque, los cuales fueron analizados para determinar las frecuencias de cada uno de los patrones de tripsina digestiva (Fig. 5).

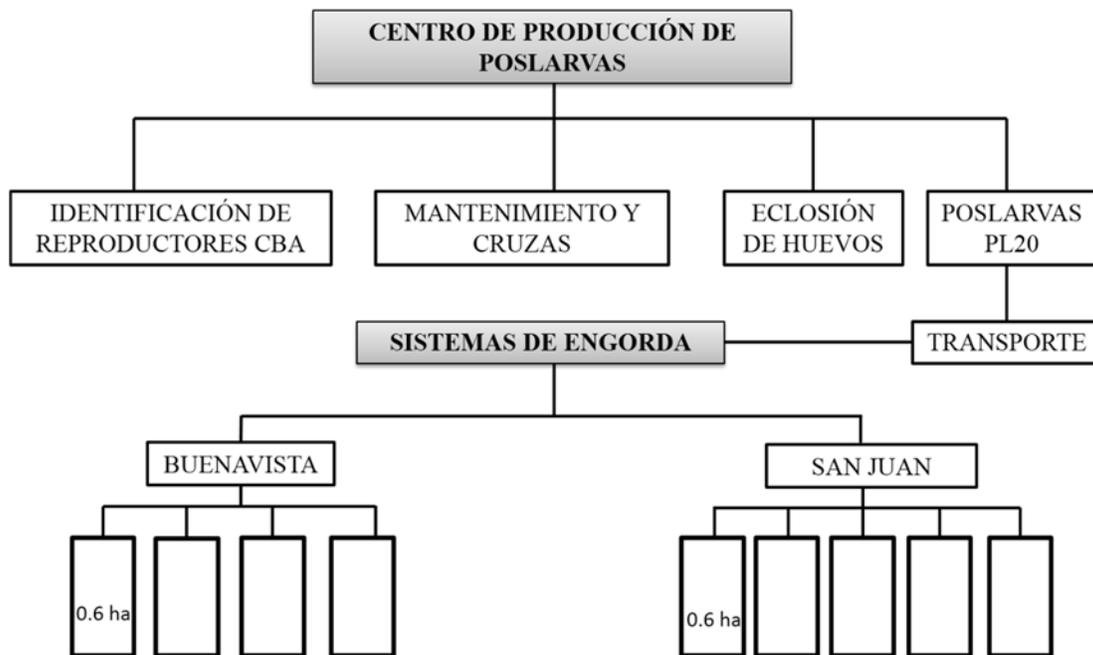


Figura 5. Estrategia experimental para el análisis de la distribución de tres patrones de tripsina de una población de camarones provenientes de una cruce homóloga CBA.

6.3.2 Obtención de poslarvas a partir de padres con patrón de tripsina CBA

6.3.2.1 Identificación de los reproductores con patrón CBA

Se analizó un total de 223 reproductores de dos líneas de camarones: línea Texana y línea AA en el centro productor de poslarvas K ubicado en los Pozos, El Rosario, Sinaloa. Las muestras de heces fueron colectadas como se explica en el apartado 6.1.1 y el revelado de los patrones se llevó a cabo por SDS-PAGE y tinción con plata como se explica en el apartado 6.1.2.

6.3.2.2 Mantenimiento de reproductores maduros y cruza de reproductores CBA

Los camarones reproductores hembras y machos fueron colocados en los estanques de maduración. La alimentación consistió en una dieta de calamar, mejillón, alimento balanceado (35% proteína) y krill, el fotoperiodo fue invertido con 12:12 h luz/oscuridad. Diariamente las hembras fueron revisadas para determinar el grado de madurez ovárica. Las hembras que mostraron el espermátforo adherido fueron separadas y colocadas en tanques individuales para el desove, aquellas que no lo presentaban se les aplicó inseminación artificial.

6.3.2.3 Manejo, transporte y siembra de poslarvas a sistemas de engorda de camarón

Los desoves de la cruza de un macho CBA y una hembra CBA da como resultado una relación esperada de 50% del patrón CBA, 25% patrón CB y 25% patrón CA (Sainz-Hernández *et al.*, 2005). Los nauplios de cada desove fueron alimentados con microalgas y *Artemia salina* hasta alcanzar la talla de PL20 y fueron transportadas a los estanques de los sistemas de engorda. Las poslarvas fueron transportadas en tinaco de plástico 1000L con aeración constante y fueron sembradas por la noche para evitar cambios en la temperatura. Se sembraron en estanques de 0.6 ha con 10 poslarvas por m². Se utilizaron 5 estanques en la San Juan y 4 estanques en Buenavista ubicadas en Guasave, Sinaloa. El manejo de los estanques fue hecho de manera rutinaria por los trabajadores de las granjas. Los estanques fueron alimentados con alimento comercial Purina con 35 % de proteína.

6.3.2.4 Toma de muestra, preparación del extracto enzimático en las distintas etapas de cultivo; revelado de los patrones por SDS-PAGE y distintos métodos de tinción

Antes de realizar la transferencia (siembra) a los estanques de cultivo se tomó una muestra de 200 poslarvas PL-20 de los tinacos donde fueron transportadas. Seguido a la siembra se colectaron 120 camarones cada 15 días y hasta el final del cultivo. Los muestreos se hicieron al azar dentro del estanque, para ello se realizaron 6 lances en diferentes puntos del estanque y se colectaron 20 camarones por lance. Los camarones se mantuvieron en hielo para ser transportados a CIIDIR-Sinaloa y almacenados a -20 °C hasta su análisis. En etapa PL-20 fue extraído el hepatopáncreas de cada camarón y colocado en un tubo Eppendorf de 1.5 mL seguido se les adicionó 100µL de 50mM de Tris HCL y 10 mM de CaCl. En esta etapa el revelado de los patrones se realizó por actividad de proteasas. Los camarones de más de 1 g se mantuvieron en hielo para ser transportados al CIIDIR Sinaloa y almacenados a -20 °C hasta su análisis. Para estas muestras el extracto se preparó de la glándula digestiva, cada glándula fue colocada en un tubo Eppendorf y se le adicionó agua destilada en una relación 1:1. Un volumen de 10 µL de cada extracto fue sometido a una electroforesis en gel SDS-PAGE al 12%. El revelado de las bandas de proteína se realizó con la tinción de coomassie como se detalla en 6.3.2.4.1.2.

6.3.2.4.1.1 Revelado de los patrones por actividad de proteasas

Una vez terminada la electroforesis de las muestras tomadas en la etapa de siembra el gel fue incubado 30 min a 4 °C en caseína al 3% en 20 mM Tris HCl y buffer a pH 8, seguido fue incubado por 90 min en la solución de caseína a temperatura ambiente. Los geles fueron lavados con agua destilada y teñidos con solución de Coomassie como lo describe Garcia-Carreno et al. (1993).

6.3.2.4.1.2 Tinción con solución de Azul de Coomassie

Los geles fueron colocados en 50 mL de solución de azul de coomassie (0.05% coomassie brilliant blue R, 40% de metanol y 7% de ácido acético) por 24 horas. Pasado el tiempo los geles fueron colocados en la solución de desteñido (40% de metanol y 7% de ácido acético) por 3 horas o hasta que el excedente del colorante fue retirado y las bandas de proteínas fueron visibles.

6.3.2.5 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos para la descripción de las variables poblacionales se mencionan en el apartado 6.2. Para el análisis del comportamiento de las proporciones de los tres patrones de tripsina durante el desarrollo en sistemas de engorda, se realizó un análisis de regresión y correlación con respecto al tiempo.

7 Resultados

7.1 Análisis de la distribución de tres patrones de tripsina digestiva en reproductores en centros de producción de poslarvas de *Litopenaeus vannamei*

Un total de 11 centros de producción de poslarvas fueron analizados. Los tres patrones de tripsina digestiva reportados por Sainz-Hernández *et al.* (2005) fueron encontrados, en los 2828 individuos analizados el patrón CBA fue el más abundante con 1918 individuos, seguido del patrón CB con 892 y por último en una muy baja frecuencia el patrón CA con 19 individuos. En los centros A, B, C, D, E, F, G, H, I, el patrón CBA se presentó en mayor frecuencia con respecto al resto de los centros analizados. Para los centros J y K el patrón CB fue más frecuente, con 102 de 200 individuos y 373 de 400 individuos analizados respectivamente. El patrón CA solo se encontró en los laboratorios B, E, G y J con 1, 4, 6 y 12 individuos respectivamente (fig. 6).

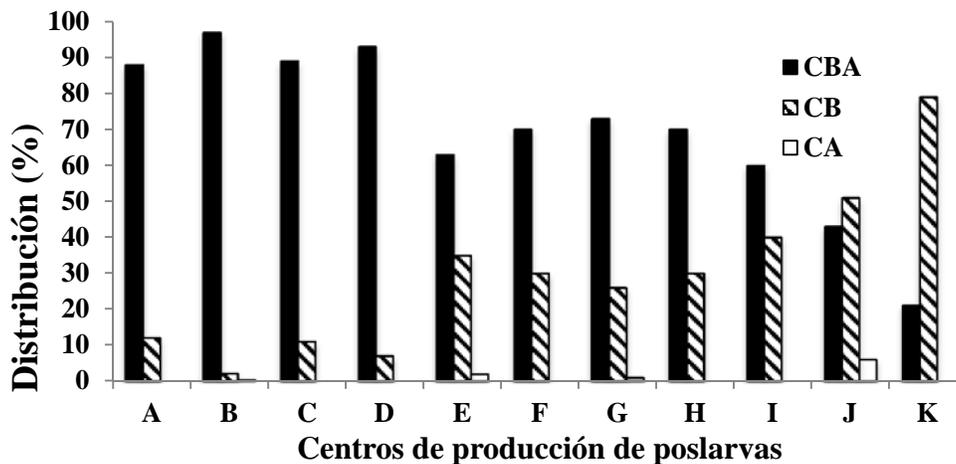


Figura 6. Distribución de patrones de tripsina en 11 centros de producción de poslarvas de camarón en el estado de Sinaloa.

7.2 Determinación de la estructura poblacional para el locus AB de tripsina digestiva de reproductores en los centros de producción de poslarvas de *Litopenaeus vannamei*.

El genotipo CA presentó una baja proporción seguido del genotipo CB, el genotipo con mayor proporción fue el CBA (tabla 1). En nueve de 11 centros el genotipo CBA fue el de mayor proporción (tabla 1), esta predominancia resultó en una significancia de heterocigotos y un desequilibrio en la prueba de Hardy-Weinberg para 10 de los centros productores de poslarvas y no para el J, donde el exceso de heterocigotos no fue significativo ($P > 0.05$; tabla 2). El análisis de endogamia FIS no mostró evidencias de endogamia pero si un exceso de heterocigotos para todos los centros (tabla 2).

Tabla 1. Proporción de genotipos de tripsina digestiva en poblaciones de reproductores en centros de producción de poslarvas de camarón en Sinaloa.

GENOTIPOS	Centro productor de poslarvas										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
CBA	0.88	0.97	0.89	0.93	0.70	0.70	0.73	0.70	0.60	0.43	0.21
CB	0.12	0.02	0.11	0.07	0.30	0.30	0.26	0.30	0.40	0.51	0.79
CA	0	0.003	0	0.02	0	0	0.01	0	0	0.60	0
n	495	267	206	210	196	200	200	200	181	200	473

Tabla 2. Indicadores genéticos en poblaciones de reproductores en centros producción de poslarvas de camarón en Sinaloa para el locus AB de tripsina. Ho. Heterocigosidad observada. He. Heterocigosidad esperada. P. significancia de la prueba de exceso de heterocigotos. FIS índice de endogamia.

Centro productor de poslarvas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Ho	0.88	0.97	0.88	0.92	0.63	0.70	0.73	0.70	0.60	0.43	0.20
He	0.49	0.50	0.49	0.49	0.44	0.45	0.47	0.45	0.42	0.40	0.18
P	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.17	0.00
FIS	-0.79	-0.94	-0.79	-0.9	-0.6	-0.59	-0.55	-0.53	-0.16	-0.07	-0.11

El análisis FST mostró diferencias significativas para la mayoría de los centros analizados a excepción del laboratorio J (tabla 3). De acuerdo a las frecuencias alélicas en los 11 centros, se encontró el centro K muestra altos niveles de diferenciación genética, lo que se confirma con el análisis UPGMA que muestra la diferenciación genética entre todos los centros productores de poslarvas analizados (fig. 7).

Tabla 3. Comparación pareada entre los centros de producción de poslarva. Los valores de FST en negrita no son estadísticamente significantes ($P > 0.05$).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
A											
B	0,00										
C	0,00	0,00									
D	0,00	0,00	0,00								
E	0,02	0,05	0,02	0,03							
F	0,02	0,04	0,02	0,02	0,00						
G	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00					
H	0,02	0,04	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00				
I	0,04	0,07	0,04	0,05	0,00	0,00	0,01	0,00			
J	0,05	0,09	0,06	0,07	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00		
K	0,25	0,33	0,29	0,32	0,17	0,19	0,22	0,19	0,13	0,11	

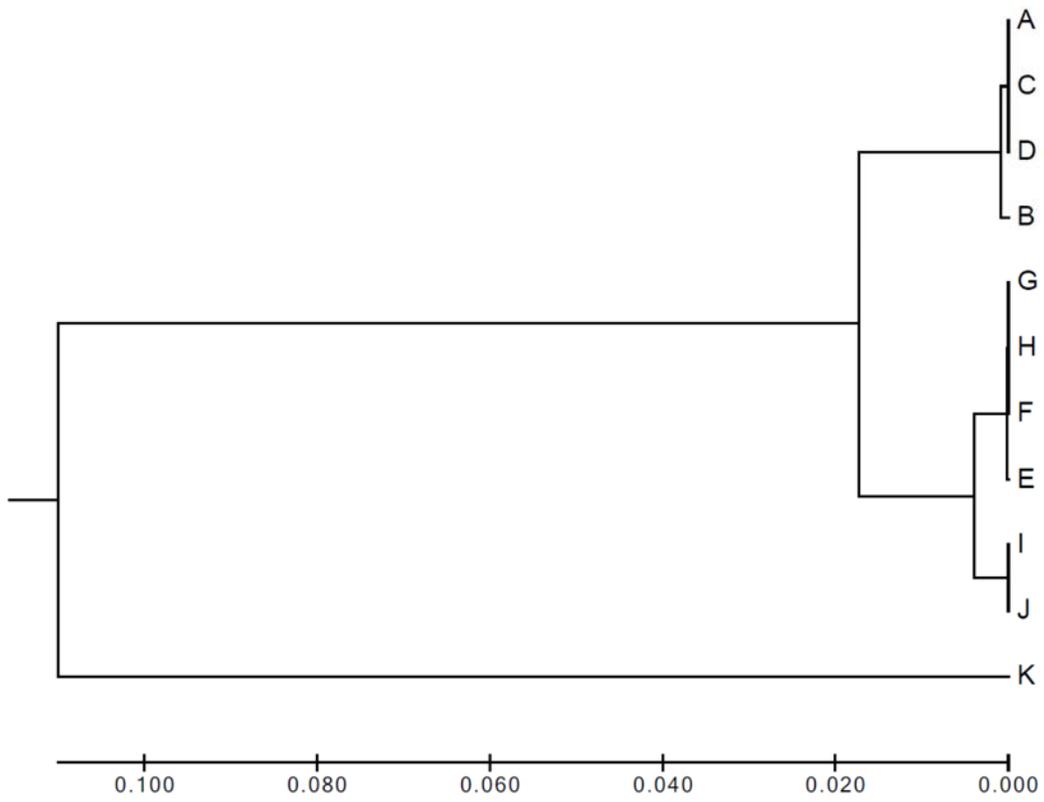


Figura 7. UPGMA está basado en los valores de FST por comparación pareada. El dendrograma muestra la diferenciación genética entre los once centros de producción analizados en Sinaloa.

7.3 Determinación de las causas de la ausencia de camarones reproductores de *Litopenaeus vannamei* con patrón CA

Los organismos con patrón CBA tienden a aumentar en frecuencia durante todo el desarrollo del cultivo, mientras que los organismos con patrón CB tienden a disminuir. La ecuación de regresión lineal aplicada a los porcentajes de ocurrencia de cada patrón de tripsina indica una pendiente negativa para el patrón CB y positiva para el patrón CBA. Los organismos con patrón CA aparecen con baja frecuencia y no fueron encontrados a los 45 días del cultivo (fig. 8).

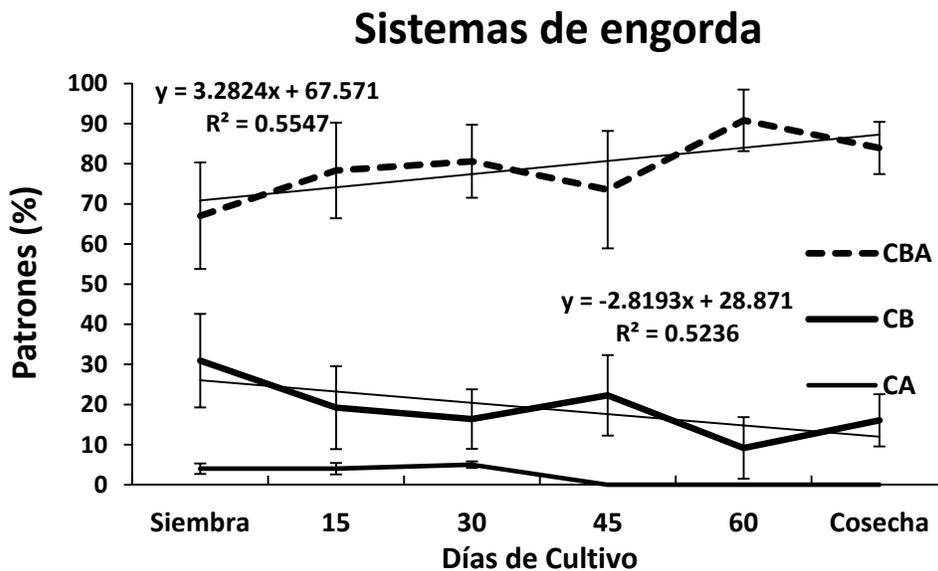


Figura 8. Distribución de los tres patrones de tripsina digestiva en sistemas de engorda para *Litopenaeus vannamei* en progenie proveniente de la cruce homóloga CBA.

8 Discusión

8.1 Análisis de la distribución de tres patrones de tripsina digestiva en reproductores en centros de producción de poslarvas de *Litopenaeus vannamei*

La FAO hace la proyección que para el año 2050 habrá 9,600 millones de personas, lo que conduce al desafío de producir más alimentos. En este sentido, la acuicultura es una opción viable, considerando el crecimiento que ha experimentado la actividad en las últimas décadas. La tasa media de crecimiento anual, en los últimos 10 años ha sido superior al 6%, aunque varía entre regiones, como de un país a otro, destacándose los países asiáticos (FAO, 2014). Un aumento en la producción de alimentos debe tener lugar en un contexto donde los recursos necesarios para la producción de alimentos, como la tierra y el agua, son aún más escasos en un mundo más poblado, es necesario cambiar la forma en que se llevan a cabo estas actividades económicas, así como también; el alimento producido debe tener una mejora nutricional y se deberá tener una reducción de residuos generados durante la producción del alimento (Kobayashi *et al.*, 2015). Los patrones de tripsina digestivas conformados con las distintas isoenzimas que presentan diferencias en sus características cinéticas (Sainz-Hernández *et al.*, 2004) los hace una opción para mejorar las variables de rendimiento dentro de los cultivos. Sin embargo, es necesario contar con las tres poblaciones de camarones reproductores con los distintos patrones de tripsina digestiva y realizar cruza dirigidas para la generación de cada patrón (Sainz-Hernández *et al.*, 2005) y definir las ventajas por sus diferencias. La búsqueda de reproductores hembras y machos de cada patrón para producir el 100% de cada población como describe Sainz-Hernández *et al.* (2005), ha llegado a ser un proceso complicado debido a la necesidad de contar con hembras y machos CA para obtener el 100% de una población de camarones con patrón CA o para obtener el 100% CBA es necesario contar con reproductores CB y CA. La relevancia de producir el 100% de cada patrón es para identificar posibles ventajas en cultivos comerciales por tener un patrón en particular de tripsina digestiva como lo mencionan Sainz-Hernández y Cordova-Murueta (2008). En el 2009, Rubio-Gastélum analizó las frecuencias de los patrones de tripsina de *L. vannamei* en cuatro centros de producción de poslarvas, encontró que el reporta al patrón CBA con un 80% como el más frecuente, seguido del patrón CB con 19.5% y una frecuencia del 0.5% del patrón CA. Este autor en su trabajo hace mención que en los centros

de producción de poslarvas la selección que se lleva cabo para obtener los pies de crías descarta los camarones que no presentan características morfométricas adecuadas para ser seleccionados y es aquí donde se pierde la población de camarones con patrón CA. Se hace mención que organismos con fenotipos homocigotos muestran una mayor vulnerabilidad de aquellos que son heterocigotos y con el paso del tiempo los lleva a una disminución o desaparición de una población (Nakatade *et al.*, 2003, Hedgecock y Davis, 2007, Zhang *et al.*, 2007), para corroborar lo mencionado por estos autores, en el presente trabajo nos enfocamos en conocer la causa por la que los camarones con patrón CBA son los más abundantes y la escases del patrón CA en los diferentes sistemas de producción. Para ello, se formularon dos hipótesis: 1.- los camarones con patrón CA no son seleccionados como reproductores por sus características morfológicas en los centros de producción de poslarvas de *L. vannamei* y son descartados generando sus bajas frecuencias. 2.- los camarones con patrón CA mueren antes de alcanzar la talla de reproductor.

Los resultados del presente trabajo muestran la presencia de los tres patrones de tripsina digestiva en los centros de producción de poslarvas analizados (Sainz-Hernández *et al.*, 2005). Las frecuencias encontradas concuerdan con las mencionadas por Rubio-Gastélum, 2009, donde el patrón CBA es el más frecuente seguido del CB y por último el CA. Del total de muestras analizadas el patrón CBA representó el 65%, seguido del CB con un 33% y el patrón CA con el 2%. Para la mayoría de los centros el patrón CBA fue el más frecuente, no obstante, el centro K no presentó estas frecuencias, aquí el 80% fue del patrón CB, 20% del CBA y 0% del CA. Datos proporcionados por CESASIN, 2014 reportan que este centro de estar en el 13vo lugar en ventas se ubicó en el 5to lugar durante el periodo del análisis de las frecuencias. Durante este ciclo de cultivo, la enfermedad de la mortalidad temprana atacó los sistemas de cultivo y fue destructiva en Sinaloa, las sobrevivencias reportadas fueron de 0% al 30% en la mayoría de las granjas, pero las poslarvas producidas en el laboratorio K la sobrevivencia reportada fue del 50% que hizo se posicionaran en el 5to lugar en ventas (CESASIN, 2014). Estos datos sugieren en más detalle que el utilizar progenie de camarones CBA y CB presenta ventajas, por lo que se puede recomendar que los organismos con patrón CA pueden ser descartados de los sistemas de producción. Esto es una evidencia que tiene que ser confirmada con nuevos experimentos en donde las tres poblaciones de patrones de

tripsina se tienen que estudiar de manera independiente. Por el momento se puede decir que el patrón CBA es el más abundante en los centros de producción de poslarvas a excepción de los centros J y K. La mayoría de los centros coinciden entre las características anatómicas y el patrón de tripsina CBA, pero este último centro que no presentó la mayor frecuencia para el patrón CBA, hacen mención que el proceso de selección de reproductores está muy estandarizado y consideran las características anatómicas de los reproductores, así como otras variables que han sido difícil de discutir con ellos por el hecho de mantener confidencialidad en los centros de producción (comunicación personal). Es claro que el patrón CBA presenta alguna característica que hace sean los más abundantes como reproductores en los centros de producción, mientras que los camarones con patrón CA no lo presentan, o por otro lado, los camarones CA podrían no ser encontrados en la talla de reproductor debido a que mueren en etapas tempranas de desarrollo de cultivo. Sainz-Hernández y Córdova-Murueta (2008) mencionan la posibilidad de que los camarones CA al mostrar significativamente menor capacidad hidrolítica con respecto a los otros dos patrones de tripsina estos camarones presentan una desventaja que los ha llevado a tener una disminución en sus poblaciones. En otras especies se ha reportado la presencia de distintos fenotipos o patrones de la enzima tripsina, Perera et al. (2012) mencionan tres patrones de tripsina digestiva en la langosta *Panulirus argus* similares a las descritas en *L. vannamei*, al analizar las frecuencias de los patrones de 118 langostas, encontraron que 102 presentaron el fenotipo A (41.2%), seguido del fenotipo B (35.3%) y finalmente el fenotipo C (23.5%). Si bien, los patrones fueron nombrados de distinta manera a *L. vannamei* es notorio que uno de los patrones es el más frecuente siendo el que presenta las tres isoenzimas el más abundante al igual que en *L. vannamei*, estos autores encuentran diferencias significativas entre los fenotipos al hidrolizar diferentes sustratos como harina de calamar, harina de soya, aislado de soya y harina de arenque, por lo que hacen alusión que el fenotipo con las tres isoenzimas presenta ventajas biológicas con respecto a los otros dos. Los datos obtenidos en el presente trabajo permiten descartar la primer hipótesis, los camarones con patrón CBA no son los más abundantes en los centros de producción de poslarvas por ser seleccionados como reproductores, sino que son los organismos que llegan a esa etapa con mayor frecuencia debido a que los organismos CA mueren en etapas tempranas. Por ello, la segunda hipótesis es aceptada, que indica que los camarones con patrón CA están bajo presión de una selección natural que los elimina de

manera eficiente en etapas tempranas. Ramos-Paredes *et al.* (2003) menciona que dentro de los individuos de una población existen diferencias genéticas (frecuencias alélicas o combinaciones) que los ayuda a tener más capacidad adaptativa a condiciones de cautiverio, lo que se resume en una mayor supervivencia. Esto puede ser debido a que el genotipo homocigoto AA (isoenzima A), tenga un efecto letal o semiletal, comportándose como un alelo recesivo, el alelo B dominante en el heterocigoto AB enmascara ese efecto y se observa una mayor supervivencia de los individuos portadores de este genotipo.

Los resultados previos de Córdova-Murueta (2008) donde los extractos de glándula digestiva de organismos CBA hidrolizan mayor cantidad de enlaces peptídicos que los patrones CB y CA podría explicar el fenómeno donde la población de los organismos CA va disminuyendo. Sin embargo, los extractos CB y CA se comportaron de manera similar en la capacidad de hidrolizar los sustratos. En este estudio organismos con patrón CB tienen una supervivencia aceptable al igual que el patrón CBA. Esto podría ser porque el sustrato que se utilizó en el trabajo para determinar las diferencias en hidrólisis fueron solo dos (caseína y harina de pescado), habría que analizar una mayor cantidad de sustratos proteicos para despejar las diferencias entre la capacidad hidrolítica entre organismos con patrón CB y CA. Si bien, aun no es claro la ventaja que tienen los camarones CBA por tener un fenotipo específico de tripsina digestiva, es evidente que existen diferencias en su capacidad adaptativa y se ve reflejada en los porcentajes de las frecuencias de los patrones a lo largo del desarrollo de vida en cultivo del camarón. Torrissen *et al.* (2006) menciona que la relación Tripsina/Quimiotripsina en salmones con genotipo específico de tripsina es modificado por las condiciones ambientales. La actividad de tripsina y tasa de Tripsina/Quimiotripsina es alta, mientras que la actividad de la quimiotripsina es baja en salmones que presentan una alta tasa de crecimiento al estar en aguas cálidas. Mencionan que la tripsina es la proteasa principal cuando las condiciones de crecimiento son favorables mientras que la quimiotripsina juega un papel importante cuando la oportunidad de crecimiento es interrumpida o limitada (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2014).

El mejoramiento genético es una opción importante para incrementar la rentabilidad en agricultura y acuicultura (Gjedrem *et al.*, 2012). Desde un punto de vista de conservación, mantener la diversidad genética de las poblaciones silvestres y organismos cultivados, es

necesario analizarlos genéticamente en distintos periodos para mantener una pila de material genético disponible para las siguientes generaciones (Iguchi *et al.*, 1999). Pérez-Enriquez *et al.* (2009) hace mención que a pesar de que la industria de producción de poslarvas en México se ha mantenido en sistemas cerrados por al menos 10 años, aún hay variabilidad genética disponible para los futuros programas de mejoramiento. Sin embargo, algunos criaderos individuales están experimentando pérdida de alelos debido a sus prácticas de selección (Freitas *et al.*, 2005; Briene *et al.*, 2000). En las poblaciones de camarones silvestres del estado de Sinaloa se mantiene una piscina genética diferente a las poblaciones cultivadas y estas se encuentran disponibles para el enriquecimiento genético de los reproductores (Valles-Jiménez *et al.*, 2005).

En la mayoría de las poblaciones de los centros de producción de poslarvas analizados hubo un exceso de heterocigotos, lo cual concuerda con la hipótesis que el patrón CBA es el más abundante. En el camarón *L. vannamei* han sido reportado otros locus heterocigotos, por ejemplo en la enzima ACPH-3 de 0.386, en APH-2 de 0.277, en APH-3 de 0.319, en EST-2 de 0.122, en EST-4 de 0.302 y PGM de 0.063, estos niveles son más bajos que los reportados en este estudio para el gen de tripsina, el promedio en los laboratorios fue de 0.599 estos resultados refuerzan la hipótesis planteada que el gen de tripsina está sujeto a un tipo de selección (De la Rosa-Velez *et al.*, 2000).

En el análisis de endogamia con el gen de tripsina, el valor promedio observado fue de -0.3101, esto indica que no existe endogamia en la población para el gen de tripsina pero si algún tipo de selección de heterocigotos. En la comparación de las frecuencias alélicas entre las poblaciones, se encontraron valores bajos en un rango de 0.0005 a 0.1768. Los valores del índice FST en las poblaciones de *L. vannamei* en laboratorios usando microsatélites, Pérez-Enriquez *et al.* (2009) encontraron que las poblaciones analizadas son diferentes con valores de FST de 0.0150. Una población estable presenta un gran tamaño efectivo, manifestando equilibrio con respecto a los modelos de deriva de la mutación, y una población en desequilibrio exhibirá un exceso de heterocigosidad en el sentido de la diversidad genética de Nei (1987). En este estudio 10 de los 11 centros de producción exhibieron un exceso de heterocigotos por lo que sus poblaciones se encuentran en desequilibrio de Hardy-Weinberg en el locus AB de tripsina digestiva. Ramos-Paredes *et al.* (2003) reportaron deficiencias

heterocigóticas y desequilibrio genotípico en dos de los locus analizados en dos poblaciones silvestres del camarón azul. Estos autores mencionan que puede ser debido a la reducción de las poblaciones y que es muy común en organismos cultivados con inadecuado manejo en el número efectivo de reproductores en cada generación. Sin embargo, es imposible mantener la composición genética original en un grupo de organismos en cautiverio debido a las selecciones de reproductores que resulta en un cambio genético. Para la característica analizada en este estudio del locus de tripsina digestiva que origina los patrones en *L. vannamei* esto no sucede, es posible mantener estos patrones sin importar la línea genética o el origen del camarón por lo que esta característica se mantendrá a través del tiempo dentro de los centros de producción de poslarva.

9 Conclusión

- En los centros de producción de poslarvas en el estado de Sinaloa, el patrón CBA fue el más abundante encontrándose en todos los centros analizados. Seguido del patrón CB y en menor frecuencia el patrón CA.
- En las poblaciones de reproductores dentro de los centros de producción de poslarvas en el estado de Sinaloa existe un exceso de heterocigotos para la enzima tripsina digestiva, por lo tanto, no existe endogamia para el locus AB de esta enzima.
- Las frecuencias esperadas 1:2:1 (CB: CBA: CA) de una cruce CBA dentro de los sistemas de engorda no se mantiene a lo largo del cultivo, conforme aumenta el tiempo del cultivo el patrón CA muere provocando modificaciones en las proporciones.
- No es posible, al menos en los laboratorios que se analizaron, realizar una producción comercial con el 100% de poslarva CBA. Solo podría hacerse una serie de cruces experimentales para definir algunas diferencias en el desempeño entre camarones con los tres patrones aislados.

10 Bibliografía

- Barnes, R. D. 1987. Invertebrate Zoology. Fifth ed. Saunders College Publishing. 893 pp.
- Bierne, N., Bezuart, I., Vonau, V., Bonhomme, F., Bédier, E., AQUACOP. 2000. Microsatellite associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*.184: 203–219.
- Borell, Y. J., Arenal, F., Mbemba, Z. M., Santana, O., Díaz-Fernández, R., Vázquez, E., Blanco, G., Sánchez, J. A., Espinosa, G. 2007. Spatial and temporal analysis of the Cuban White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) schmitti*. *Aquaculture*. 272S1. S125-S138.
- Ceccaldi, H. J. 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. En: Crustacean Nutrition. In: Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture. Vol. 6 (eds. L.R. D'Abrano, D.e. Conklin & M. Akimaya), pp. 261-291. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- CESASIN. 2012. Comité de Sanidad Acuícola en Sinaloa. Disponible en: <http://www.cesasin.com.mx/>.
- CESASIN. 2014. Comité de Sanidad Acuícola en Sinaloa. Disponible en: <http://www.cesasin.com.mx/>.
- CESASIN. 2016. Comité de Sanidad Acuícola en Sinaloa. Disponible en: <http://www.cesasin.com.mx/>.
- Cock, J., Gitterle, T., Salazar, M., Rye, M. 2009. Breeding for disease resistance of Penaeid shrimps. *Aquaculture*. 286: 1-11.
- CONAPESCA. 2014. Annual Fishery Statistics. 2009. Disponible en: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca.
- CONAPESCA, 2006. Annual Fishery Statistics 2006. Available at: <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/ccona>.
- Cordova-Murueta, J., García-Carreño, F., Navarrete del Toro, M. 2003. Digestive enzymes present in crustacean feces as a tool for biochemical, physiological, and ecological studies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.297: 43-56.
- Cordova-Murueta, J. H., García-Carreño, L.F., Navarrete del Toro, M. A. 2008. The effect of trypsin phenotype in the degree of hydrolysis of protein by shrimp *Penaeus vannamei*. Oral presentation: Pacific Fisheries Technologist (PFT) Conference, San Francisco California. Febrero 2008.

Dall, W. 1992. Feeding, digestion and assimilation in penaeidae. Proceedings of the Aquaculture Nutrition Workshop, (Salamander Bay, 15–17 April 1991), 57–62.

De la Rosa-Velez, J., Escobar-Fernández, R., Correa, F., Maqueda-Cornejo, M., De la Torre-Cueto, J. 2000. Genetic structure of two comercial penaeids (*Penaeus californiensis* and *P. stylirostris*) from the Gulf of California, as revealed by allozyme variation. Fishery Bulletin. 98: 674-683.

De lo Ríos-Pérez, L., Campos-Montes, G. R., Martínez-Ortega, A., Castillo-Juárez, H., Montaldo, H. 2017. Inbreeding effects on reproductive traits in a breeding population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Aquaculture. 479. 442-446.

Excoffier, L., Lischer, H.E. 2010. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. 10: 564-567.

FAO. 2006. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Briggs, M. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [online]. Roma. Actualizado 7 April 2006.

FAO. 2010. Estudio mundial sobre las pesquerías del camarón. Documento Técnico de Pesca. No. 475. Roma. 386pp.

FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.

Freitas, P.D., Galetti Jr., P.M. 2005. Assessment of the genetic diversity in five generations of a commercial broodstock line of *Litopenaeus vannamei* shrimp. African Journal Biotechnology. 4: 1362–1367.

García-Carreño, F.L., Dimes, N. and Haard, N. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Analytical Biochemistry. 214: 65-69.

García-Machado, E., Robainas, A., Espinosa, G., Oliva, M., Páez, J., Verdecia, N., Monnerot, M. 2001. Allozyme and mitochondrial DNA variation in Cuban populations of the shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea: Decapoda). Marine Biology. 138:701-707.

Gjedrem, T., Robinson, N., Rye, M. 2012. The importance of selective breeding in a aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. Aquaculture. 350:117-129.

Goyard, E., Goarante, C., Ansquer, D., Brum, P., De Decker, S., Dufour R., Galinié, C., Peignon, J. M., Pham, D., Vourey, E., Harache, Y., Patrois, J. 2008. Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquacultutr industries: Heterosis and inbreeding effects on growth and survival rates of the Pacific blue shrimp *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris*. Aquaculture. 278: 43-50.

Hartl, D.L. y Clark, A. 1997. Principles of population genetics, 3rd. edition. Sinauer Associates. Sunderland, M.A. 542.

Hartl, D. L y Clark, A. 2007. Genetic and phenotypic variation. In: Principles of populations genetics. 4 ed. Massachusetts: Sinauer Associates. 585 p.

Hedgecock, D. and Davis, J.P. 2007. Heterosis for yield and crossbreeding of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture. 272:17-29.

Heukeshoven, J. and Dernick, R. 1985. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. Electrophoresis 6, 103–112.

Huber, R., Kukla, D., Bode, W., Schwager, P., Bartels, K., Deisenhofer, J., Steigemann, W. 1974. Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution. Journal Molecular Biology. 89, 73–101.

Iguchi, K., Watanabe, K., Nishida, M., 1999. Reduced mitochondrial variation in hatchery populations of ayu (*Plecoglossus altivelis*) cultured for multiple generations. Aquaculture 178: 235-243.

Kobayashi, M., Msangi, S., Batka, Miroslav, Vannuccini, S., Det, M. and Anderson L. L. 2015. Fish to 2030: The role and Opportunity for Aquaculture. Journal Aquaculture Economics and Management. 19: 282-300.

Klein, B., Le Moullac, G., Sellos, D., Van Wormhoudt, A. 1996. Molecular cloning and secuencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): use in assessing gene expression during the molt cycle. Internal Journal of Biochemistry and Cellular Biology. 28: 551-563.

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

Kossiakoff, A.A., Chambers, J.L., Kay, L.M., Stroud, R.M. 1977. Structure of bovine trypsinog at 1.9 Å resolutions. Biochemistry. 16: 654-664.

Lightner, D. V. 1994. Enfermedades del camarón. En: Camaronicultura: Bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos. Martínez- Córdoba, L.R. (ed). AGT Ed. México. 3: 161-220.

Le Moullac, G. L., Klein, B., Sellos, D., Van Wormhoudt, A. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amilase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 208:107-125.

Lester, L. J., Cook, J.P. 1987. Ontogenic changes in isozyme patterns of *Penaeus* species. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 86: 253-258.

Lester L. J. and Pante Ma. J. R. 1992. Genetics of *Penaeus* species. In: *Marine Shrimp Culture: principles and practices* (eds. A. W. Fast and L. J. Lester), pp. 29-52. Elsevier Amsterdam, Netherlands.

Martínez-Córdova, L. 1994. *Camaronicultura: Bases Técnicas y Científicas para el Cultivo de Camarones Peneidos*. AGT Editor, México, DF. 233 pp.

Mendoza-Cano, F., Grijalva-Chon, J. M., Pérez-Enríquez, R., Ramos-Paredes, J., Varela-Romero, A. 2013. Genetic diversity of mitochondrial DNA from *Litopenaeus vannamei* broodstock used in northwestern Mexico. *Ciencias Marinas*. 39(4): 401-412.

Nakadate, M., Shikano, T., Taniguchi, N. 2003. Inbreeding depression and heterosis in various quantitative traits of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Aquaculture*. 220:219-226.

Navarrete del Toro, M. A., García-Carreño, F. L., Córdova-Murueta, J. H. 2011. *Aquaculture*. 317: 99-106.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, N. Y. Columbia University Press.

Northrup, J.H., Kunitz, M. 1931. Isolation of protein crystals possessing tryptic activity. *Science*. 73:262–263.

Northrup, J.H., Kunitz, M., Herriott, R.M. 1948. *Crystalline enzymes*. Columbia University Press, New York.

Park, Stephen. 2001. MS Tools v 3.1 Smurfit Institute of Genetics, Trinity College, Dublin 3, Irelandspark@tcd.ie /sdepark@hotmail.com; <http://acer.gen.tcd.ie/~sdepark/ms-toolkit/>

Perera, E., Moyano, F.J., Rodríguez-Viera, L., Cervantes, A., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J.M. 2010. In vitro digestion of protein sources by crude enzyme extracts of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) hepatopancreas with different trypsin isoenzyme patterns. *Aquaculture*. 310:170-185.

Perera, E., Rodríguez-Casariago, J., Rodríguez-Viera, L., Calero, J., Perdomo-Morales, R., Mancera, J. M. 2012. Lobster (*Panulirus argus*) hepatopancreatic trypsin isoforms and their digestion efficiency. *Biology Bulletin*. 222:158–170.

Pérez-Farfante, I., Kensley, B. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle*, Paris, France. 233 pp

Pérez-Enriquez, R., Hernández-Martínez, F., Cruz, P. 2009. Genetic diversity status of White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico. *Aquaculture*. 297: 44–50.

Ramos-Paredes, J., Grijalva-Chon, J.M. 2003. Allozyme genetic analysis in hatchery strains and wild blue shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris* (Stimpson), from the Gulf of California. *Aquaculture Resources*. 34: 221-234.

Ríos-Pérez, L., Campos-Montes, G. R., Martínez-Ortega, A., Castillo-Juárez, H., Montaldo, H. H. 2017. Inbreeding effects on reproductive traits in a breeding population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*. 479: 442-446.

Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. 8: 103-106.

Rubio-Gastelum, D. 2009. Desempeño diferencial en conversión alimenticia, crecimiento y supervivencia de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en función del fenotipo de tripsina presente en la glándula digestiva. Tesis de maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. Guasave, Sinaloa, México. 76 pp

Rungruangsak, T.K. and Male, R. 2000. Trypsin isozymes: development, digestion and structure. In: Haard, N.F. Simpson D.K. (Eds), *Seafood Enzymes, utilization and influence on postharvest Seafood Quality*. Marcel Dekker NY. 215-269.

Rungruangsak, T.K., Moss, R., Andresen, L.H., Berg, A., Waagbe, R. 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology Biochemistry*. 32: 7-23.

Rungruangsak, T. K. 2014. Atlantic Salmon, *Salmo salar* L.: Genetic variations in protein metabolism and growth. In: *Salmon: Biology, Ecological Impacts and Economic Importance*. 2014. 85-119.

SAGARPA. 2017. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible en: <https://www.gob.mx/sagarpa>

Sainz-Hernández, J.C., García-Carreño, F., Sierra-Beltrán, A., Hernández-Cortés, M.P. 2004. Trypsin synthesis and storage as zymogen in the digestive gland of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*. 24: 266-276.

Sainz-Hernández, J.C., Cruz-Hernández, P., Cordova-Murueta, J.H., García-Carreño, F.L. 2005. *Penaeus vannamei* isotrypsins: Genotype and Modulation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 326: 105-113.

Soto-Hernández, J., Grijalva-Chon, J.M. 2004. Genetic differentiation in hatchery strains and wild white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone, 1931) from northwest Mexico. *Aquaculture International*. 12, 593–601.

Sunde, S. y Davis, S. 1991. Evaluation of genetics in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparasion with three natural populations. In: *Aquaculture*. Vol. 97. No. 2-3. 131-142 p.

Sweet, R.M., Wright, H.T., Janin, J., Chothia, C.H., Blow, D.M. (1974) Crystal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz) at 2.6-Å resolution. *Biochemistry*. 13, 4212-4228.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.

Tidwell, J.H. and Allan, G.L. 2001. Fish as food: aquaculture's contribution. Ecological and economic impacts and contributions of fish farming and capture fisheries. *EMBO Reports*. 2, 958–963.

Torrissen, K. R., Male, R., Naevdal, G. 1993. Trypsin isozymes in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: studies on heredity, egg quality and effect on growth of three different populations. *Aquaculture*. 43: 289-305.

Unajak, S., Meesawat, P., Paemane, A., Areechon, N., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Rungruangsak-Torrissen, K., Choowongkamon, K. 2012. Characterization of thermostable trypsin and determination of trypsin isozymes from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Food Chemistry*. 134: 1533-1541.

Valles-Jiménez, R., Cruz, P., Perez-Enriquez, R. 2005. Population genetic structure of Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology*. 6: 475–484.

Walsh, K.A., Kauffman, D.L., Sampath-Kumar, K.S.V., Neurath, H. 1964. On the structure and function of bovine trypsinogen and trypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 301-308.

Walsh, K.A., Wilcox, P.E. 1970. Serine proteinases. *Methods Enzymology*. 19, 31-41.

Whitaker, J. R. 1994. Principles of Enzymology for the Food Sciences, Second edition, Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. 625 p.

Zang, H., Liu, X., Zhang, G., Wang, C. 2007. Growth and survival of reciprocal crosses between two bay scallops, *Argopecten irradians concentricus* Say and *A. irradians irradians* Lamarck. Aquaculture. 272: 88-93.