

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN
Y DESARROLLO, A.C.

**Variabilidad Molecular en DNA Mitocondrial
y Relaciones Filogenéticas de Tres Especies
de *Penaeus* del Pacífico Mexicano**

por

LUIS ENRIQUE GUTIÉRREZ MILLÁN

Tesis aprobada por la

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL

Como Requisito Parcial para Obtener el Grado de

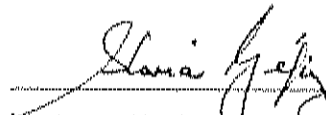
DOCTOR EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora.

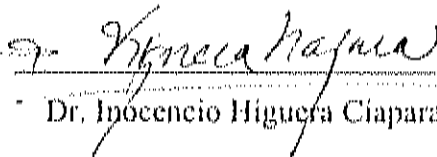
26 de Marzo de 2003

APROBACIÓN

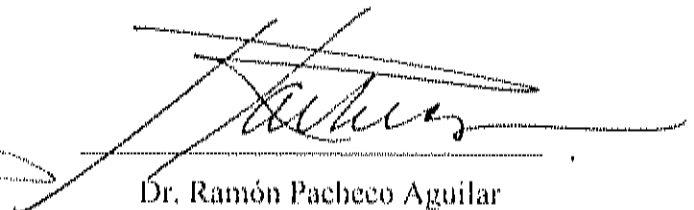
Los miembros del Comité designado para revisar la tesis del M. en C. Luis Enrique Gutiérrez Millán, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias, dentro del programa de Doctorado de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal



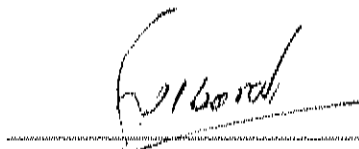
Dra. Gloria Yepiz Plascencia
Directora de Tesis




Dr. Inocencio Higuera Ciapara



Dr. Ramón Pacheco Aguilar



Dr. Francisco Vargas Albores



Dr. Jorge de la Rosa Vélez

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de este manuscrito con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C. (CIAD), Apdo. Postal 1735, Hermosillo, Sonora.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, de la directora de tesis.

Firma



Dr. Alfonso Gardea Béjar
Director General

DEDICATORIA

A mi adorada, bella y tierna esposa: para ti, mi amor, por el esfuerzo, sacrificios y sueños compartidos.

A mis adorables y encantadores hija e hijos: para ustedes, mi Jessie, mi Ricky y mi Orly, razones de mí existir, por soportar tantas noches de abandono y tantos momentos difíciles.

A mis venerados y amados Padre y Madre: con todo mi cariño y respeto, por su ejemplo de vida y su DNA heredado.

A mis aguerridos, admirados y queridos hermana y hermanos: para ustedes, por los almohadazos de niños y sus bendiciones y consejos de adultos.

A mi querida directora: por haber creído algún día en mí, aún sin conocerme.

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Tesis, por su enseñanza y amor compartido por la biología molecular.

A los miembros de mi Comité de Tesis, Dr. Francisco Vargas A., Dr. Jorge de la Rosa V., Dr. Ramón Pacheco A. y Dr. Inocencio Higuera C., por sus valiosas aportaciones para el enriquecimiento académico de esta investigación.

A todos mis compañeros de los laboratorios de Biotecnología Marina y Biología Molecular de Organismos Acuáticos, por su amistad, apoyo, estímulo y enseñanzas constantes.

Al Dr. Jorge Hernández y la Dra. Teresa Gollas, quienes me apoyaron y alentaron siempre, aún mucho antes de mi ingreso al doctorado.

Al Dr. Enrique Villalpando, por su invaluable ayuda

Al Dr. Rogerio Sotelo y la Dra. María Islas, por sus valiosas aportaciones al mejoramiento de este trabajo.

Al Dr. Juan Pedro Camou y al M. C. Martín Valenzuela, por su apoyo irrestricto.

Al Dr. Gopan Murugan (CIBNOR), por su apoyo en el análisis filogenético.

A la QB Maribel Padilla, M. en C. Alma Peregrino y Dra. Gabriela Romo, por su hermosa amistad y por haberme ayudado incondicionalmente en mi iniciación al maravilloso mundo de la biología molecular.

A CIAD, por su apoyo constante durante mis estudios de doctorado.

A la Universidad de Sonora, especialmente a través del DICTUS, por su estímulo y apoyo para la realización de este postgrado.

A SIMAC, proyecto 970106030, por su apoyo económico.

A CONACYT, proyecto 34348-B, por su apoyo económico y por la beca otorgada para los estudios de doctorado.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	6
El Recurso Genético Camarón en el Pacífico Mexicano: Pesquería y Cultivo	6
Descripción, Taxonomía y Evolución de <i>Penaeus</i>	7
Marcadores Moleculares: Origen y Detección de Variabilidad Genética	12
DNA Mitocondrial (mtDNA)	14
Genes en Camarón	23
Identificación y Variabilidad Genética en Camarón	24
OBJETIVOS	29
Objetivo General	29
Objetivos Particulares	29
HIPÓTESIS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Especies de Camarón	31
Extracción de DNA Mitocondrial	31
Extracción de DNA Genómico	33
Purificación de DNA	34
Protocolo A (Aislamiento Rápido de DNA de 0.2-300 kb, a Partir de Solución)	34
Protocolo B (Aislamiento Rápido de DNA de 0.2-300 kb, a Partir de gel de Agarosa)	35
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	35
Amplificación de Fragmentos de mtDNA Menores de 2 kb	35
Amplificación del genoma mitocondrial complete	39
Clonación y Análisis de Recombinates	41

Extracción de DNA Superenrollado	42
Extracción de DNA Plasmídico	42
Secuenciación y Análisis de Secuencias	44
Análisis Filogenético	45
Distancias Genéticas	45
Análisis de Máxima Probabilidad	46
Bootstrapping	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
Aislamiento de DNA Mitocondrial	50
Amplificación de Genes Mitocondriales	52
Pseudogenes y/o Heteroplasmia	61
Amplificación del Genoma Mitocondrial Completo de <i>Penaeus</i>	63
Clonación de Genes Mitocondriales	66
Secuenciación y Análisis de Genes Mitocondriales	70
Estructuras Secundarias de tRNAs	94
Variabilidad e Identidad Genética en mtDNA de <i>Penaeus</i> spp.	105
Relaciones Filogenéticas de <i>Penaeus</i> spp.	137
CONCLUSIONES	143
APÉNDICE 1	146
APÉNDICE 2	154
APÉNDICE 3	174
LITERATURA CITADA	201

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del genoma mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp.	18
Figura 2. Localización de los oligonucleótidos en el genoma mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp.	38
Figura 3. Aislamientos de mtDNA de <i>Penaeus</i> spp.	51
Figura 4. Aislamiento de DNA genómico de camarón café <i>Penaeus californiensis</i>	53
Figura 5. Amplificación por PCR del fragmento ND1F-16SR mtDNA de <i>Penaeus</i> spp.	56
Figura 6. Amplificación por PCR de los fragmentos génicos ribosomales mitocondriales de <i>Penaeus</i> spp.	57
Figura 7. Amplificación por PCR de la región control mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp.	59
Figura 8. Amplificación por PCR del fragmento CTRLF-tRNAMetR del D-loop mitocondrial de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	60
Figura 9. Pseudogenes/Heteroplasmia en genes ribosomales de <i>Penaeus</i> spp.	62
Figura 10. Amplificación por PCR del genoma mitocondrial completo de <i>Penaeus</i> spp.	65
Figura 11. Huella genética de <i>Penaeus</i> spp	67
Figura 12. Clonación de genes mitocondriales de <i>Penaeus</i> spp.	69
Figura 13. Clonación de la región control de mtDNA de <i>Penaeus</i> spp.	71
Figura 14. Estrategia de secuenciación de la porción ND1F-tRNAMetR del genoma mitocondrial de camarón café <i>Penaeus californiensis</i>	72
Figura 15. Estrategia de secuenciación de la porción ND1F-tRNAMetR del genoma mitocondrial de camarón azul <i>Penaeus stylirostris</i>	73
Figura 16. Estrategia de secuenciación de la porción ND1F-12SR del genoma mitocondrial de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	74
Figura 17. Secuencia nucleotídica total ND1F-tRNAMetR mtDNA de camarón café <i>Penaeus californiensis</i>	78

Figura 18. Secuencia nucleotídica total ND1F-tRNA ^{Met} r-miDNA de camarón azul <i>Penaeus stylirostris</i>	82
Figura 19. Secuencia nucleotídica total ND1F-12SR miDNA de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	85
Figura 20. Orden génico y polaridad transcripcional de genes mitocondriales de <i>Penaeus</i> spp.	88
Figura 21. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del gen parcial de <i>NADH1</i> mitocondrial de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	96
Figura 22. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del gen parcial de <i>NADH1</i> mitocondrial de camarón azul <i>Penaeus stylirostris</i>	97
Figura 23. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del gen parcial de <i>NADH1</i> mitocondrial de camarón café <i>Penaeus californiensis</i>	98
Figura 24. Estructuras secundarias predichas de los tRNA ^{Leu(CUN)} de los camarones café <i>Penaeus californiensis</i> , azul <i>P. stylirostris</i> y blanco <i>P. vannamei</i>	101
Figura 25. Estructuras secundarias predichas de los tRNA ^{Val} de los camarones café <i>Penaeus californiensis</i> , azul <i>P. stylirostris</i> y blanco <i>P. vannamei</i>	102
Figura 26. Estructuras secundarias predichas de los tRNA ^{Gln} de los camarones café <i>Penaeus californiensis</i> y azul <i>P. stylirostris</i>	103
Figura 27. Estructuras secundarias predichas de los tRNA ^{His} de los camarones café <i>Penaeus californiensis</i> y azul <i>P. stylirostris</i>	104
Figura 28. Alineamiento de secuencias nucleotídicas entre el gen parcial <i>12SrRNA</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	110
Figura 29. Alineamiento de secuencias nucleotídicas entre el gen parcial <i>16SrRNA</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	122
Figura 30. Alineamiento de secuencias nucleotídicas entre el gen parcial <i>NADH1</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	128
Figura 31. Alineamiento de secuencias aminoacídicas entre el gen parcial <i>NADH1</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	131
Figura 32. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de la región control de <i>Penaeus</i> spp.	136

Figura 33. Relaciones Filogenéticas de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados con base en el gen mitocondrial <i>12S rRNA</i> .	138
Figura 34. Relaciones Filogenéticas de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados con base en el gen mitocondrial <i>16S rRNA</i> .	140
Figura 35. Relaciones Filogenéticas de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados con base en el gen mitocondrial <i>18S rRNA</i> .	141

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Clasificación taxonómica de camarón <i>Penaeus</i> spp.	9
Tabla II. Descripción de genes mitocondriales	19
Tabla III. Características de oligonucleótidos diseñados para amplificación por PCR de genes mitocondriales	37
Tabla IV. Características de oligonucleótidos diseñados para la amplificación completa por PCR del genoma mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp.	40
Tabla V. Fragmentos de mtDNA de <i>Penaeus</i> spp. amplificados por PCR	54
Tabla VI. Identificación de genes y regiones no-codificantes de las secuencias nucleotídicas obtenidas de <i>Penaeus</i> spp.	87
Tabla VII. Polaridad de la transcripción de los genes mitocondriales analizados de <i>Penaeus</i> spp. y su comparación con otros artrópodos seleccionados	89
Tabla VIII. Composición de bases nucleotídicas del gen <i>12SrRNA</i> de <i>Penaeus</i> spp. y su comparación con otros artrópodos seleccionados	91
Tabla IX. Composición de bases nucleotídicas del gen <i>16SrRNA</i> de <i>Penaeus</i> spp. y su comparación con otros artrópodos seleccionados	92
Tabla X. Composición de bases nucleotídicas del gen <i>NADH1</i> de <i>Penaeus</i> spp. y su comparación con otros artrópodos seleccionados	93
Tabla XI. Composición de bases nucleotídicas del D-loop mitocondrial de <i>P. californiensis</i> , <i>P. stylirostris</i> y otros artrópodos seleccionados	95
Tabla XII. Composición (%) deducida de aminoácidos del gen parcial de <i>NADH1</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	99
Tabla XIII. Identidad y distancia genética con base en el gen <i>12SrRNA</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	111
Tabla XIV. Identidad y distancia genética con base en el gen <i>16SrRNA</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	123
Tabla XV. Identidad y distancia genética con base en el gen <i>NADH1</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	129
Tabla XVI. Identidad y distancia genética con base en la secuencia aminoacídica deducida de la subunidad proteica <i>NADH1</i> de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	132

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	6
El Recurso Genético Camarón en el Pacífico Mexicano: Pesquería y Cultivo	6
Descripción, Taxonomía y Evolución de <i>Penaeus</i>	7
Marcadores Moleculares: Origen y Detección de Variabilidad Genética	12
DNA Mitocondrial (mtDNA)	14
Genes en Camarón	23
Identificación y Variabilidad Genética en Camarón	24
OBJETIVOS	29
Objetivo General	29
Objetivos Particulares	29
HIPÓTESIS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Especies de Camarón	31
Extracción de DNA Mitocondrial	31
Extracción de DNA Genómico	33
Purificación de DNA	34
Protocolo A (Aislamiento Rápido de DNA de 0.2-300 kb, a Partir de Solución)	34
Protocolo B (Aislamiento Rápido de DNA de 0.2-300 kb, a Partir de gel de Agarosa)	35
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	35
Amplificación de Fragmentos de mtDNA Menores de 2 kb	35
Amplificación del genoma mitocondrial complete	39
Clonación y Análisis de Recombinantes	41

Extracción de DNA Superenrollado	42
Extracción de DNA Plasmídico	42
Secuenciación y Análisis de Secuencias	44
Análisis Filogenético	45
Distancias Genéticas	45
Análisis de Máxima Probabilidad	46
Bootstrapping	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
Aislamiento de DNA Mitochondrial	50
Amplificación de Genes Mitochondriales	52
Pseudogenes y/o Heteroplasmia	61
Amplificación del Genoma Mitochondrial Completo de <i>Penaeus</i>	63
Clonación de Genes Mitochondriales	66
Secuenciación y Análisis de Genes Mitochondriales	70
Estructuras Secundarias de tRNAs	94
Variabilidad e Identidad Genética en mtDNA de <i>Penaeus</i> spp.	105
Relaciones Filogenéticas de <i>Penaeus</i> spp.	137
CONCLUSIONES	143
APÉNDICE 1	146
APÉNDICE 2	154
APÉNDICE 3	174
LITERATURA CITADA	201

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del genoma mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp.	18
Figura 2. Localización de los oligonucleótidos en el genoma mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp.	38
Figura 3. Aislamientos de mtDNA de <i>Penaeus</i> spp.	51
Figura 4. Aislamiento de DNA genómico de camarón café <i>Penaeus californiensis</i>	53
Figura 5. Amplificación por PCR del fragmento ND1F-16SR mtDNA de <i>Penaeus</i> spp.	56
Figura 6. Amplificación por PCR de los fragmentos génicos ribosomales mitocondriales de <i>Penaeus</i> spp.	57
Figura 7. Amplificación por PCR de la región control mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp.	59
Figura 8. Amplificación por PCR del fragmento CTRLF-tRNAMetR del D-loop mitocondrial de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	60
Figura 9. Pseudogenes/Heteroplasma en genes ribosomales de <i>Penaeus</i> spp.	62
Figura 10. Amplificación por PCR del genoma mitocondrial completo de <i>Penaeus</i> spp.	65
Figura 11. Huella genética de <i>Penaeus</i> spp	67
Figura 12. Clonación de genes mitocondriales de <i>Penaeus</i> spp.	69
Figura 13. Clonación de la región control de mtDNA de <i>Penaeus</i> spp.	71
Figura 14. Estrategia de secuenciación de la porción ND1F-tRNAMetR del genoma mitocondrial de camarón café <i>Penaeus californiensis</i>	72
Figura 15. Estrategia de secuenciación de la porción ND1F-tRNAMetR del genoma mitocondrial de camarón azul <i>Penaeus stylirostris</i>	73
Figura 16. Estrategia de secuenciación de la porción ND1F-12SR del genoma mitocondrial de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	74
Figura 17. Secuencia nucleotídica total ND1F-tRNAMetR mtDNA de camarón café <i>Penaeus californiensis</i>	78

Figura 18. Secuencia nucleotídica total ND1F-tRNA ^{Met} R mtDNA de camarón azul <i>Penaeus stylirostris</i>	82
Figura 19. Secuencia nucleotídica total ND1F-12SR mtDNA de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	85
Figura 20. Orden génico y polaridad transcripcional de genes mitocondriales de <i>Penaeus</i> spp.	88
Figura 21. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del gen parcial de <i>NADH1</i> mitocondrial de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	96
Figura 22. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del gen parcial de <i>NADH1</i> mitocondrial de camarón azul <i>Penaeus stylirostris</i>	97
Figura 23. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del gen parcial de <i>NADH1</i> mitocondrial de camarón café <i>Penaeus californiensis</i>	98
Figura 24. Estructuras secundarias predichas de los <i>tRNA^{Leu(CUA)}</i> de los camarones café <i>Penaeus californiensis</i> , azul <i>P. stylirostris</i> y blanco <i>P. vannamei</i>	101
Figura 25. Estructuras secundarias predichas de los <i>tRNA^{Ala}</i> de los camarones café <i>Penaeus californiensis</i> , azul <i>P. stylirostris</i> y blanco <i>P. vannamei</i>	102
Figura 26. Estructuras secundarias predichas de los <i>tRNA^{Gln}</i> de los camarones café <i>Penaeus californiensis</i> y azul <i>P. stylirostris</i>	103
Figura 27. Estructuras secundarias predichas de los <i>tRNA^{Pro}</i> de los camarones café <i>Penaeus californiensis</i> y azul <i>P. stylirostris</i>	104
Figura 28. Alineamiento de secuencias nucleotídicas entre el gen parcial <i>12SrRNA</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	110
Figura 29. Alineamiento de secuencias nucleotídicas entre el gen parcial <i>16SrRNA</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	122
Figura 30. Alineamiento de secuencias nucleotídicas entre el gen parcial <i>NADH1</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	128
Figura 31. Alineamiento de secuencias aminoacídicas entre el gen parcial <i>NADH1</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	131
Figura 32. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de la región control de <i>Penaeus</i> spp.	136

Figura 33. Relaciones Filogenéticas de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados con base en el gen mitocondrial <i>12S rRNA</i> .	138
Figura 34. Relaciones Filogenéticas de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados con base en el gen mitocondrial <i>16S rRNA</i> .	140
Figura 35. Relaciones Filogenéticas de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados con base en el gen mitocondrial .	141

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Clasificación taxonómica de camarón <i>Penaeus</i> spp.	9
Tabla II. Descripción de genes mitocondriales	19
Tabla III. Características de oligonucleótidos diseñados para amplificación por PCR de genes mitocondriales	37
Tabla IV. Características de oligonucleótidos diseñados para la amplificación completa por PCR del genoma mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp.	40
Tabla V. Fragmentos de mtDNA de <i>Penaeus</i> spp. amplificados por PCR	54
Tabla VI. Identificación de genes y regiones no-codificantes de las secuencias nucleotídicas obtenidas de <i>Penaeus</i> spp.	87
Tabla VII. Polaridad de la transcripción de los genes mitocondriales analizados de <i>Penaeus</i> spp. y su comparación con otros artrópodos seleccionados	89
Tabla VIII. Composición de bases nucleotídicas del gen <i>12SrRNA</i> de <i>Penaeus</i> spp. y su comparación con otros artrópodos seleccionados	91
Tabla IX. Composición de bases nucleotídicas del gen <i>16SrRNA</i> de <i>Penaeus</i> spp. y su comparación con otros artrópodos seleccionados	92
Tabla X. Composición de bases nucleotídicas del gen <i>NADH1</i> de <i>Penaeus</i> spp. y su comparación con otros artrópodos seleccionados	93
Tabla XI. Composición de bases nucleotídicas del D-loop mitocondrial de <i>P. californiensis</i> , <i>P. stylirostris</i> y otros artrópodos seleccionados	95
Tabla XII. Composición (%) deducida de aminoácidos del gen parcial de <i>NADH1</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	99
Tabla XIII. Identidad y distancia genética con base en el gen <i>12SrRNA</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	111
Tabla XIV. Identidad y distancia genética con base en el gen <i>16SrRNA</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	123
Tabla XV. Identidad y distancia genética con base en el gen <i>NADH1</i> mitocondrial de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	129
Tabla XVI. Identidad y distancia genética con base en la secuencia aminoacídica deducida de la subunidad proteica <i>NADH1</i> de <i>Penaeus</i> spp. y otros artrópodos seleccionados	132

RESUMEN

El género *Penaeus* soporta una de las pesquerías de camarón naturales más grandes del mundo, además de ser también el crustáceo más cultivado. La producción y consumo de camarón en el Pacífico mexicano se sustenta principalmente en tres especies de penaeidos: *Penaeus californiensis*, *Penaeus vannamei* y *Penaeus stylirostris*. Los análisis de variabilidad genética normalmente empleados en el estudio de poblaciones, mejoramiento genético, autenticación de alimentos e identificación de especies, así como en investigaciones de conservación, evolución y filogenia, requieren el uso de marcadores moleculares apropiados. Los genes mitocondriales, a pesar de ser conservados, varían lo suficiente como para discriminar entre diferentes especies, poblaciones, e incluso individuos. El DNA mitocondrial (mtDNA) presenta características idóneas para ser utilizado como marcador molecular, ya que usualmente no presenta recombinación, es heredado maternalmente y se presenta en un número alto de copias en las células, lo cual permite trabajar con pequeñas cantidades de tejido y poder obtenerse aún de muestras procesadas y/o degradadas.

El objetivo de esta investigación fue estimar la variabilidad genética molecular y las relaciones filogenéticas de *P. californiensis*, *P. vannamei* y *P. stylirostris*, por medio del análisis de secuencia de genes mitocondriales, para su posterior uso potencial como marcador molecular en alimentos, acuicultura, pesquerías, conservación y evolución.

El mtDNA fue obtenido de pleópodos de camarón mediante lisis con detergente, precipitación salina ("salting-out") y extracción con fenol-cloroformo. Este mtDNA fue usado como molde para ser amplificado por PCR con primers conservados de los genes *NADH1*, *16SrRNA*, *12SrRNA*, *tRNA^{Asp}* y región control mitocondriales. Los productos amplificados fueron ligados al vector pCR 2.1 TOPO y secuenciados por el método de terminación con dideoxineucleótidos. Las secuencias obtenidas fueron alineadas por

CLUSTALX y las distancias genéticas fueron calculadas en acuerdo con el modelo de dos parámetros de Kimura. Se aplicó un análisis de máxima probabilidad bootstrapped con 1000 réplicas.

Se obtuvieron y secuenciaron exitosamente clones de mtDNA, correspondientes a 7 genes ribosomales (2 rRNAs y 5 tRNAs), 1 gen codificante para una subunidad proteica (*NADH1*) y la región control (D-loop), en las especies de camarón estudiadas. Las estructuras secundarias predichas de los tRNAs investigados mostraron la conservación de la típica conformación de trébol, característica de estas moléculas. La región control del mtDNA de los peneidos analizados presentó dos regiones hipervariables, equivalentes a las regiones HVRI y HVRII (dominios A y B) de otros organismos, con la variabilidad genética suficiente para ser potencialmente empleada como huella genética molecular (“fingerprinting”) para la identificación de individuos.

En esta investigación se presenta la primera secuencia de DNA (nuclear o mitocondrial) de camarón café *P. californiensis*, así como el primer registro de una amplificación por PCR de los genomas mitocondriales completos de camarones peneidos, reportados en la literatura. Los patrones de restricción del genoma mitocondrial completo de las tres especies de *Penaeus* fueron especie-específicos, apropiados para su uso en la autenticidad de la identificación de especies de camarón en muestras frescas, mientras que el análisis de PCR-RFLP de los genes mitocondriales de esta investigación mostró excelentes resultados para ser aplicado en autenticación e identificación de especies en muestras preservadas de alimentos a base de camarón.

Los resultados muestran sorprendentes grados de variabilidad genética molecular entre especies de peneidos, semejantes a los descritos a nivel de géneros para otros organismos. Los análisis de arreglos génicos, polaridad transcripcional y diversificación

genética de los genes mitocondriales investigados, permitió proponer una filogenia para los peneídos estudiados, compatible con la hipótesis del grupo Pancrustacea, compuesto por el clado Crustacea/Hexapoda.

“Si uno pudiera diseñar a su gusto un marcador genético especial para estudios poblacionales y evolutivos, seguramente terminaría re-inventando el mtDNA” (Rand, 1994).

INTRODUCCIÓN

La pesquería del camarón en el Pacífico mexicano se sustenta preferencialmente en la pesca de tres especies de peneidos: *Penaeus californiensis*, *P. vannamei* y *P. stylirostris* (<http://mp.semarnat.gob.mx/sustentabilidad/Pacifico/camapac.pdf>), siendo estas dos últimas sujetas también a explotación aculeola, mientras que la primera está siendo actualmente estudiada por su potencial para cultivo en climas templados (Martínez-Córdova *et al.*, 1998, 1999). Estos importantes recursos genéticos necesitan ser evaluados a nivel molecular para estimar su variabilidad genética y conocer el estado de “salud genética” de estas especies, para efectos de conservación, manejo de pesquerías y mejoramiento genético (Davis y Nixon, 1992; DeSalle y Birstein, 1996; Stepien, Hubers y Skidmore, 1999; Wuthisuthmethavee *et al.*, 2000). Además, es importante también contar con marcadores moleculares para estas especies que permitan clarificar sus relaciones filogenéticas actualmente en controversia (Pérez-Farfante y Kensley, 1997; Baldwin *et al.*, 1998; Maggioni *et al.*, 2001).

Por otro lado, la industria alimentaria requiere marcadores moleculares susceptibles de ser empleados en autenticación de alimentos e identificación de especies de camarón, para evitar productos fraudulentos en el mercado [Apéndice 2 (Gutiérrez-Millán *et al.*, 2002b)]. ¿Qué marcador molecular tan versátil podría reunir todos los requisitos necesarios (no recombinación, herencia uniparental, poder resolutivo, alto número de moléculas, tamaño pequeño, grado de conservación y facilidad de extracción)

para ser aplicado confiable e irrestrictamente en campos aparentemente tan disímboles como manejo de pesquerías, acuacultura, autenticación de alimentos, evolución y filogenia?: sin duda alguna, el DNA mitocondrial (mtDNA), pequeña molécula circular de aproximadamente 16 Kb, heredada vía materna (Garesse *et al.*, 1997; Boore, 1999), cuya conformación nucleotídica representa tres diferentes grados resolutivos: (1) altamente conservada [genes ribosomales (rRNAs y tRNAs)], (2) medianamente conservada (genes codificantes de subunidades proteicas) y (3) secuencias no codificantes altamente variables (región control mitocondrial).

La presente investigación se orientó a la caracterización molecular de regiones de mtDNA representativas de los tres grados resolutivos anteriormente descritos, en las tres especies de *Penaeus* más importantes del Pacífico mexicano, con el fin de caracterizar sus secuencias nucleotídicas y evaluar su posible uso como marcadores moleculares en pesquerías y acuacultura, autenticación de alimentos, conservación y evolución, a través del análisis de la variabilidad genética de estas especies y su aplicación en la estimación de sus relaciones filogenéticas. Las estrategias a seguir fueron una combinación de métodos moleculares (PCR, clonación, secuenciación) y análisis bioinformático y filogenético. Se encontraron resultados sorprendentes acerca de la variabilidad genética molecular de estos organismos y sus relaciones filogenéticas con otros artrópodos.

ANTECEDENTES

El Recurso Genético Camarón en el Pacífico Mexicano: Pesquería y Cultivo

El cultivo de camarón es un componente importante en la economía de los países intertropicales, especialmente en el Sureste Asiático y América Central y del Sur. Esta actividad industrial aporta aproximadamente el 30% del camarón comercializado en el mercado mundial, con una producción estimada de cerca de 712,000 toneladas métricas (Rosenberry, 1996). De éstas, en 1997 el 75% correspondieron a 7 países asiáticos y 14% a Latino-América. Del total de la producción de camarón cultivado a nivel mundial, el 50% corresponde al camarón tigre gigante *Penaeus monodon*, (FAO, 1998) mientras que el resto está sostenido preferencialmente por el camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* y, en mucho menor grado, por *Penaeus stylirostris*, entre otras especies de peneidos.

En el Pacífico mexicano, la pesquería de camarón ocupa el primer lugar nacional en valor económico, tercer lugar nacional en volumen y décimo a nivel mundial (<http://imp.semarnat.gob.mx/sustentabilidad/Pacifico/camapac.pdf>). Dicha pesquería se sustenta básicamente en 4 especies: camarón café *P. californiensis*, cristal *Penaeus brevisrostris* (en menor escala), azul *P. stylirostris* y blanco *P. vannamei*, siendo cultivados a escala comercial estos dos últimos y a nivel experimental el primero, por su tolerancia a bajas temperaturas (Martínez-Córdova *et al.*, 1998, 1999). Sin embargo, la pesquería de camarón en el Pacífico mexicano ha llegado ya a su máximo permisible, presentando la de camarón café un estado aún saludable, mientras que las de azul y blanco registran ya un marcado deterioro en sus poblaciones (<http://imp.semarnat.gob.mx/sustentabilidad/Pacifico/camapac.pdf>). Resulta ineludible el compromiso de México de incrementar su producción camaroneola a través de la

acuicultura, para contribuir a la alimentación mundial de una población en constante crecimiento. No obstante, debe tenerse especial cuidado en evaluar previamente la estructura y la variabilidad genética de los recursos pesqueros en su entorno natural, así como en su manejo al ser introducidos estos recursos en sistemas de cultivo (Allendorf, Ryman y Uter, 1987), para evitar el deterioro genético de las especies y sus poblaciones.

Descripción. Taxonomía y Evolución de *Penaeus*

Los camarones del género *Penaeus* incluyen a las especies de crustáceos comercialmente más importantes (Wilson *et al.*, 2000) y constituyen un grupo diverso y abundante de taxa bénticos encontrados en aguas tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Baldwin *et al.*, 1998). Los camarones en este género comprenden una pesquería global con algunas de las 28 especies cultivadas intensivamente en todo el mundo (Dall *et al.*, 1990).

Como todos los artrópodos, los camarones peneidos presentan su cuerpo dividido en tres grandes regiones principales: cefalotórax, abdomen y telson. Los apéndices (pares) del cefalotórax son las anténulas, antenas, mandíbulas, maxilas, maxilípedos y pereopodos. En el abdomen se encuentran los pleópodos o apéndices natatorios y en el telson los urópodos, que forman el abanico caudal. Los caracteres morfológicos más comúnmente utilizados para diferenciar las diversas especies de *Penaeus* son el tipo de estructura genital externa (v.gr.: télico abierto en el subgénero *Litopenaeus* o télico cerrado en el subgénero *Farfantepenaeus*) y el número de dientes rostrales (v. gr.: fórmula rostral 8-9/1-2 para *P. vannamei* y 5-10/3-8 para *P. stylirostris*) (Rodríguez de la Cruz, 1987). Sin embargo, la diferenciación de especies de camarón puede no resultar fácil debido a su gran similitud morfológica, especialmente cuando se tienen organismos en los primeros estadios larvales o postlarvales, o bien adultos mal preservados, mutilados (descabezados) o procesados para su consumo como alimento. Es importante

notar también que aunque existan organismos morfológicamente similares, esto no significa que sean también genéticamente similares (carentes de variabilidad genética), tal y como parece ser el caso de camarones peneidos (Palumbi y Benzie, 1991).

Desde un punto de vista filogenético, los camarones del género *Penaeus* exhiben un número de estados caracteres plesiomórficos (v. gr.: larva naupliar), lo cual indicaría una posición basal en la filogenia de los decápodos (Burkenroad, 1981; Felgenhauer y Abele, 1983; Bauer, 1986). La morfología somática de estos camarones es conservada, aunque los taxa dendrobranchiata muestran una diversidad en sus estructuras genitales (Bauer, 1986, 1991). Algunos géneros, como *Penaeus*, han florecido desde el Mesozoico (Glaessner, 1969; Dall *et al.*, 1990) con relativamente poco cambio morfológico en relación con otros taxa decápodos (von Sternberg, 1996).

A pesar de la importancia de los peneidos, la sistemática de este grupo rara vez ha sido investigada bajo un enfoque evolutivo y su clasificación actual es más bien de carácter tipológico (von Sternberg, 1996). La clasificación de especies y subgéneros en este género fue realizada sin indicar relaciones genealógicas (Pérez-Farfante, 1969). Las divisiones subgenéricas de *Penaeus* actualmente aceptadas [6 subgéneros: *Farfantepenaeus* Burokovskii (1972), *Fenneropenaeus* Pérez Farfante (1969), *Litopenaeus* Pérez Farfante (1969), *Marsupenaeus* Tirmizi (1971), *Melicertus* Rafinesque (1814), and *Penaeus* s.s. Fabricius (1798)] fueron basadas en características del caparazón y estructura genital (Pérez-Farfante, 1969), criterios válidos, aunque se requieren investigaciones filogenéticas de sinapomorfismos para poder determinar si estos agrupamientos de especies representan grupos naturales (von Sternberg, 1996).

La posición taxonómica actualmente aceptada –aunque controversial– de las especies de *Penaeus* económicamente más importantes del Pacífico mexicano, se resume en la Tabla I, según modificaciones a lo presentado por el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>) de los

Tabla 1. Clasificación taxonómica de camarón *Penaeus* spp. Se incluye la clasificación taxonómica de los camarones penidos económicamente más importantes del Pacífico mexicano: café *P. californiensis*, blanco *P. vannamei* y azul *P. stylirostris*, modificado del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

Taxón:	Nombre:
Superreino:	Eukaryota
Reino:	Metazoa
Phylum:	Arthropoda
Subphylum:	Crustacea
Clase:	Malacostraca
Subclase:	Eumalacostraca
Superorden:	Eucarida
Orden:	Decapoda
Suborden:	Dendrobranchiata
Superfamilia:	Penaeoidea
Familia:	Penaeidae
Género:	<i>Penaeus</i>
Subgéneros:	<i>Farfantepenaeus</i> <i>Litopenaeus</i>
Especies:	<i>P. (F.) californiensis</i> <i>P. (L.) vanamei</i> <i>P. (L.) stylirostris</i>

E.U.A.. El único desacuerdo presente es referente al nivel taxonómico de los subgéneros *Litopenaeus* y *Farfantepenaeus* elevados a nivel de género según la reciente propuesta de Pérez-Farfante y Kensley (1997).

La filogenia de *Penaeus*, con base en el gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) ha sido investigada por Baldwin *et al.*, (1998). Estos autores estudiaron 13 especies, representantes de los 6 subgéneros actualmente aceptados, y encontraron divergencias genéticas entre especies del rango de 8-24%, lo cual indica una mayor variabilidad genética que la encontrada por alozimas. Su análisis filogenético mostró que la actual clasificación de *Penaeus* en seis subgéneros no es natural. No obstante, los clados por ellos encontrados sí concuerdan con los patrones biogeográficos actualmente observados para estos camarones. Además, concluyeron también que la región Indo-Pacífica presentó el linaje mitocondrial más antiguo (*Penaeus indicus*), lo cual concuerda con las observaciones de Dall *et al.* (1990) en el sentido de que *Penaeus* surgió en esta región y desde allí radió hacia el este y oeste hasta alcanzar la actual distribución circuntropical observada del género.

No obstante los datos anteriores de Baldwin *et al.* (1998), investigaciones más recientes basadas en secuencias parciales del gene mitocondrial *16SrRNA* parecen contradecir lo propuesto por aquellos autores. Maggioni *et al.* (2001) han concluido que sí existen dos clados monofiléticos que soportan la propuesta de Pérez-Farfante y Kensley (1997) de elevar a nivel de género los subgéneros *Farfantepenaeus* y *Litopenaeus*, conclusión que habrá de ser valorada a la luz de futuras investigaciones.

Ahora bien, ¿Qué relación guardan los crustáceos decápodos malacostracos con respecto al resto de los artrópodos?. Diversos estudios filogenéticos han mostrado la posibilidad de que los crustáceos constituyan en realidad un grupo parafilético (Wilson *et al.*, 2000), llegando incluso a sugerir que existe una relación filogenética hermana entre los grupos Hexápoda y Crustacea (Hwang *et al.*, 2001), nuevo grupo al cual se le ha

llamado Panerustacea (Giribet y Ribera, 2000). Sin embargo, existe controversia acerca de cuál grupo de crustáceos es el más cercano a los insectos hexápodos: los Branchiopodos (v.gr.: *Artemia*) o los Malacostracos (v.gr.: *Penaeus*). ¿Están los crustáceos branquiópodos más filogenéticamente cercanos a los hexápodos y miriápodos que a los propios crustáceos malacostracos, formando el clado Hexapoda/Branchiopoda, tal y como sugieren diversas investigaciones sobre genes nucleares (Regier y Shultz, 1997)? En contraste a estos datos nucleares del gen EF1 α , la secuencia de un genoma mitocondrial completo de un malacostraco (*P. monodon*) soporta la posibilidad de que los malacostracos estén más relacionados con los insectos que con los Branchiopoda (Wilson *et al.*, 2000). No cabe duda de que se requieren más estudios que aborden este problema para clarificar las relaciones filogenéticas de los crustáceos, dentro del grupo de los Arthropoda.

Marcadores Moleculares: Origen y Detección de Variabilidad Genética

Los caracteres morfológicos han sido usados como una herramienta para identificar especies de camarón. Sin embargo, especies estrechamente relacionadas son difíciles de distinguir morfológicamente. El desarrollo de marcadores moleculares sería útil no sólo para la identificación de especies, sino también para el mejoramiento genético del camarón (Wuthisuthmethavee *et al.*, 2000) y la detección de variabilidad genética intra- e inter-específica. El desarrollo de marcadores genéticos diagnósticos para hacer una rápida discriminación entre especies (Stepien, Hubers y Skidmore, 1999) provee una importante herramienta en la biología de la conservación (DeSalle y Birstein, 1996; Amato *et al.*, 1998; Palumbi y Cipriano, 1998), además de ofrecer nuevos juegos de caracteres (moleculares) para aumentar y probar las clasificaciones morfológicas tradicionales y delinear especies filogenéticas (Davis y Nixon, 1992; Stepien y Kocher, 1997).

Un marcador molecular es cualquier cambio en una secuencia de DNA que es detectable sólo por técnicas de Biología Molecular. Los marcadores moleculares mayormente usados se encuentran en las áreas entre genes y son mucho más comunes que los cambios de DNA dentro de genes, debido a que no están sujetos a selección natural. Cuando las diferencias en el DNA ocurren dentro de genes, tienen el potencial para afectar la función de ellos y, por lo tanto, el fenotipo del individuo. Las mutaciones consideradas como marcadores moleculares tienden a acumularse en el genoma y constituyen una abundante fuente de variación genética para estudios de mapeo de recombinación, ligamiento, diferenciación y diversidad genética.

La diversidad genética se origina por mutación y recombinación, pero diferentes procesos determinan el grado en el que se mantienen en las poblaciones. Los genomas son entidades dinámicas que evolucionan a lo largo del tiempo debido a los efectos acumulativos de alteraciones en la secuencia a pequeña escala (mutación) y rearrreglos a

gran escala (recombinación) (Brown, 1999). Las mutaciones van desde un cambio en un simple nucleótido (mutación puntual), hasta una modificación del cariotipo (poliploidía). Las mutaciones puntuales, además del cambio de un nucleótido por otro, involucran inserciones o deleciones de bases nucleotídicas y son el resultado de errores en la replicación del DNA o de daños en los genes por factores químicos o radiación que alteran la estructura química de nucleótidos individuales. Las mutaciones son, en última instancia, la fuente de toda la variación genética, pero es una fuente de diversidad impredecible y, por lo tanto, incontrolable (Féral, 2001). Las mutaciones crean nuevos alelos, cuyos destinos evolutivos son gobernados por otras fuerzas, tales como la selección, migración y deriva génica (Hartl y Clark, 1989; Weir, 1990; Avise, 1994; Slatkin *et al.*, 1995; Torpe y Smartt, 1995). Por su parte, la recombinación resulta en una reestructuración de una parte del genoma, por ejemplo mediante el intercambio de segmentos de cromosomas homólogos durante la meiosis o mediante transposición de un elemento móvil desde una posición hasta otra dentro del mismo cromosoma o entre diversos cromosomas (Brown, 1999). Pero, ¿cómo detectar la variabilidad genética, sea cual fuere su origen?

Los marcadores genéticos usados en el pasado para detectar la diversidad genética han sido principalmente los grupos sanguíneos y las enzimas polimórficas, como una manifestación directa del genotipo. Sin embargo, al no constituir el genotipo mismo normalmente sub-representan la diversidad genética real, limitándose su poder resolutivo a la evaluación de diferencias genéticas entre taxa superiores. En la actualidad, se cuentan con marcadores moleculares que forman parte del propio genotipo (DNA), cuyo poder resolutivo va desde la variabilidad intrapoblacional (e incluso individual), hasta las líneas más profundas del árbol filogenético de la vida.

Los principales tipos de marcadores moleculares pueden dividirse en aquellos basados en DNA nuclear (nDNA) o DNA mitocondrial (mtDNA). Los marcadores de nDNA pueden a su vez subdividirse en aquellos que no requieren información previa de

la propia secuencia de DNA (RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA; AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphisms; ISSR: Inter-Simple Sequence Repeat; RAMP: Randomly Amplified Microsatellite Polymorphism; VNTR: Variable Number Tandem Repeats; MRSP: Mapped Restriction Site Polymorphisms; SSCP: Single Strand Conformational Polymorphisms; SNP: Single Nucleotide Polymorphisms) y los que sí requieren conocimiento previo de su secuencia (CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence; ST-SSR: Sequence-Tagged Simple Sequence Repeat) (<http://www.science.siu.edu/plant-biology/PLB449/DLN.449lectures/PCR&RAPD.htm>).

Los marcadores moleculares basados en mtDNA pueden ser detectados por técnicas de hibridación de sondas marcadas, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR (Polymerase Chain Reaction), una combinación de estas dos últimas (PCR-RFLP), secuenciación de fragmentos amplificados por PCR o secuenciación completa del genoma mitocondrial. ¿Por qué preferir mtDNA sobre nDNA como marcador molecular para evaluar la diversidad genética y en estudios de evolución y filogenética?

DNA Mitocondrial (mtDNA)

Desde que se identificó y aisló la mitocondria hace casi 50 años y se supo que contenía DNA (en los 60's), este organelo ha vuelto a ser el centro de atención de muchos investigadores alrededor del mundo, debido a que ha mostrado jugar un papel central en apoptosis, o muerte celular programada, con implicaciones para la biología del desarrollo, el cáncer, la senescencia y la muerte de un organismo (Sheffler, 2000). Además, hay indicaciones de que el inicio y severidad de enfermedades tales como el mal de Parkinson, la diabetes mellitus, posiblemente la enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento en general, tienen sus bases genéticas en deficiencias y disfunciones mitocondriales (Johns, 1995). Esto parece estar relacionado en gran medida con el "escape" eventual de electrones hacia el oxígeno, a partir de los complejos de la cadena de transporte de electrones, lo cual lleva a la formación de especies reactivas de oxígeno

(ROS). Estas moléculas son capaces de dañar proteínas, lípidos y al propio DNA mitocondrial. Un grupo especial de enzimas en la mitocondria atrapan estas ROS, pero algunas de ellas logran escapar y causan daño (mutaciones) en el mtDNA. Se ha hipotetizado que una acumulación de estos daños reduce la capacidad de la mitocondria para producir ATP para el trabajo biológico. Este fenómeno asociado con el envejecimiento puede ser un reflejo de este daño acumulado en el mtDNA (Sheffler, 2000). Por otro lado, la gran frecuencia de mutaciones en el mtDNA de los organismos paradójicamente es también una fuente rica de variabilidad genética, susceptible de ser aprovechada ampliamente para hacer inferencias en filogenética y biología de poblaciones (Saville, Kohli y Anderson, 1998).

La mitocondria es el organelo productor de energía por excelencia, ya que es el sitio de la fosforilación oxidativa, esencial para la producción de ATP, así como también de una variedad de otras funciones bioquímicas (Boore, 1999). En el interior de este organelo subcelular se encuentra un genoma, separado de la cromatina nuclear, llamado DNA mitocondrial (mtDNA), muy comúnmente usado en estudios de filogenética molecular (Moritz, Dowling y Brown, 1987)

El descubrimiento del mtDNA a principios de los sesentas (Nass y Nass, 1963; Schatz, Haslbrunner y Tuppy, 1964) hizo posible el desarrollo de la genética mitocondrial y permitió la formulación de algunos principios básicos de la biogénesis de la célula y de organelos, así como de las bases moleculares de un número de enfermedades humanas. La evidencia de DNA en la mitocondria sirvió también como un argumento a favor del origen endosimbiótico de estos organelos (Nosek *et al.*, 1998).

La distinción fundamental entre organismos procarióticos y eucarióticos reside principalmente en dos características sobresalientes: (1) las células eucarióticas tienen un genoma contenido dentro de una envoltura nuclear membranosa y con poros y (2) la gran mayoría de eucariotes poseen mitocondrias. Algunas veces esto es apenas reconocible,

como en el caso de los hidrogenosomas (Anderson y Kurland, 1999). Las investigaciones de los últimos 30 años han consolidado la hipótesis de Lynn Margulis (1981) sobre el origen de la mitocondria como endosimbionte de un eucariote primitivo. La teoría endosimbiótica serial postula que una célula proto-eucariótica sin mitocondria evolucionó primero y que este organismo capturó después por endocitosis una proteobacteria. Después de establecer una relación simbiótica, la pérdida de genes redundantes y la transferencia de genes desde la bacteria hasta el núcleo, se llegó a la distribución actual de genes observada en los dos genomas nuclear y mitocondrial (Gray, 1993; Gray, Burger y Lang, 1999).

En los organismos metazoarios el mtDNA es generalmente un genoma pequeño (14-20 kb comúnmente y hasta 40 kb ocasionalmente), altamente empacado, carente de intrones y con pocas regiones intergénicas, (Garesse *et al.*, 1997; Boore, 1999). El genoma mitocondrial es una molécula de DNA circular cerrada (Hwang *et al.*, 2001), con excepción de algunos organismos que presentan mtDNA lineal: ciliados, protozoarios aplicomplexos parasíticos, algas, mohos, hongos oomycetos y levaduras (Nosek *et al.*, 1998), además de algunas especies de metazoarios del Phylum Cnidaria - clases Cubozoa, Scyphozoa e Hydrozoa- (Bridge *et al.*, 1992) y el crustáceo isópodo, *Armadillidium vulgare*, en el cual consiste de una o dos moléculas lineales (Hwang *et al.*, 2001; Warrior y Gall, 1985; Bridge *et al.*, 1992; Raimond *et al.*, 1999). Con las excepciones de nemátodos y el mejillón azul, los cuales carecen del gen *ATPasa 8* (Garesse *et al.*, 1997), el mtDNA contiene 37 genes (Boore, 1999). Aunque se han encontrado genomas mitocondriales mucho más grandes, éstos son producto de duplicaciones de porciones del mtDNA, más que de la variación en el contenido génico (Boyce, Zwick y Aquadro, 1989; Fuller y Zouros, 1993).

El complemento génico típico codifica para los dos rRNAs (12S y 16S) del ribosoma mitocondrial, los 22 tRNAs (designados por el código de una letra, con los dos tRNAs L y los dos S diferenciados por las secuencias anticodón {tag/taa y gct/tga, respectivamente})

necesarios para la traducción de las proteínas codificadas por el mtDNA y 13 polipéptidos (Figura 1) (Wolstenholme, 1992; Lavrov, Boore y Brown, 2000), todos ellos subunidades de los complejos respiratorios (enzimas de la fosforilación oxidativa) presentes en la membrana interna mitocondrial. Estos polipéptidos comprenden tres subunidades de citocromo oxidasa (*COI-III*), siete subunidades de NADH deshidrogenasa (*ND1-6* y *ND4L*), dos subunidades de ATP sintasa (*ATPasa α* y *δ*) y el citocromo b (*Cytb*) del complejo III (Garesse *et al.*, 1997). Por razones históricas, estos genes tienen designaciones específicas al mtDNA animal, cuyos nombres se presentan en la Tabla II, junto con sus respectivos sinónimos. Todos estos genes encontrados típicamente en el mtDNA animal tienen sus homólogos en el mtDNA de plantas, hongos y/o protistas (Boore y Brown, 1994; Levings y Vasil, 1995; Gray *et al.*, 1998; Paquin *et al.*, 1997).

A pesar de la conservación en el contenido de genes, han ocurrido ampliamente rearrreglos génicos durante la evolución del mtDNA (García-Machado *et al.*, 1996). Los ejemplos más notables son encontrados en invertebrados donde los cambios se han dado a nivel de Orden (Pont-Kingdon *et al.*, 1994; Clary y Wolstenholme, 1985; Crozier y Crozier, 1993; Riga, Monerot y Sellos, 1995; Terrett, Miles y Thomas, 1994). Los cambios más simples involucran relocalizaciones de genes de tRNA (Crozier y Crozier, 1993; Riga, Monerot y Sellos, 1995; Terrett, Miles y Thomas, 1994; Valverde *et al.*, 1994). Sin embargo, en un número de situaciones, segmentos completos han sido invertidos y son considerados como marcadores útiles para clarificar las relaciones filogenéticas (Sankoff *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1993; Boore y Brown, 1994).

El genoma mitocondrial contiene además una gran región no-codificante conocida también como D-loop o Región Control. En esta región rica en A+T se encuentran todos los elementos de control conocidos hasta hoy de la transcripción y replicación del propio mtDNA (Wolstenholme, 1992; Garesse *et al.*, 1997). Estos procesos en el genoma mitocondrial son relativamente simples con respecto tanto a las secuencias regulatorias, como a la maquinaria enzimática involucrada. Ambos procesos son mejor entendidos en

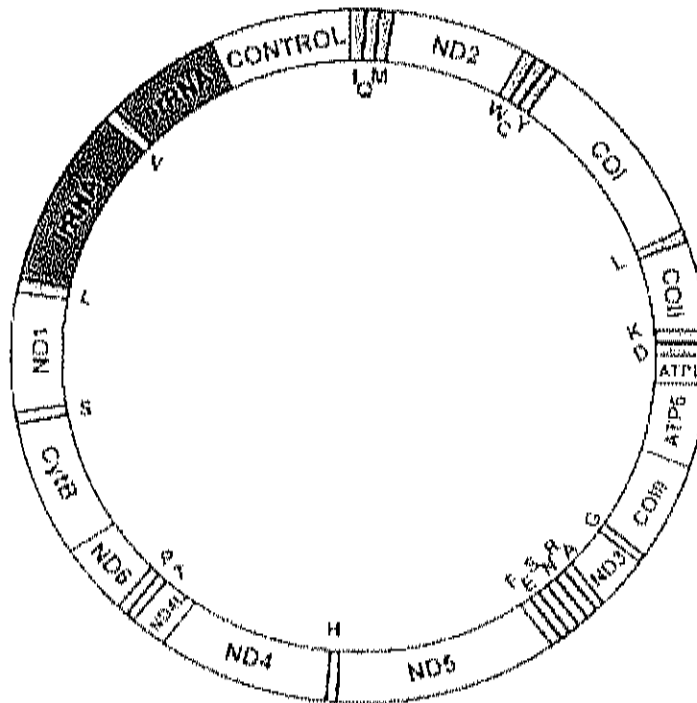


Figura 1. Mapa del genoma mitocondrial de *Penaeus* spp. (aproximadamente 16,000 bp). Este esquema fue adaptado de Crease (1999) y cotejado con el mtDNA secuenciado de *P. monodon* (Wilson *et al.*, 2000). La nomenclatura génica se presenta en la Tabla II.

Tabla II. Descripción de genes mitocondriales. Incluye 13 genes de proteínas, 2 RNA ribosomales y 22 tRNAs encontrados en genomas mitocondriales animales (No se incluye la Región Control, llamada también D-loop o región grande no-codificante rica en A-T).

Producto Codificado	Designación en el mtDNA animal	Sinónimos (usados regularmente en mtDNA no-animal)
Citocromo Oxidasa Subunidades I, II, III	<i>COI, COII, COIII</i>	<i>cox1, cox2, cox3</i>
Citocromo b Apoenzima	<i>Cytb</i>	<i>Cob</i>
NADH deshidrogenasa Subunidades 1-6, 4L	<i>ND1-6, 4L</i>	<i>nad1-6, 4L</i>
ATP sintasa Subunidades 6, 8	<i>A6, A8 o ATP6, ATP8</i>	<i>atp6, atp8</i>
RNA Ribosomal Subunidad Grande (16S)	<i>LrRNA</i>	<i>Rnl</i>
RNA Ribosomal Subunidad Pequeña (12S)	<i>SlrRNA</i>	<i>Rns</i>
18 RNAs de Transferencia, cada uno especificando un aminoácido simple	Correspondiente aminoácido en código de una letra.	<i>TrnX</i>
2 RNAs de Transferencia, especificando leucina	Diferenciados por el codón reconocido <i>L(CUN)</i> y <i>L(UUR)</i>	Diferenciados por un Superescrito: <i>tRNA^{Leu(CUN)}</i> y <i>tRNA^{Leu(UUR)}</i>
2 RNAs de Transferencia, especificando serina	Diferenciados por el codón reconocido <i>S(AGN)</i> y <i>S(UCN)</i>	Diferenciados por un Superescrito: <i>TRNA^{Ser(AGN)}</i> y <i>tRNA^{Ser(UCN)}</i>

mamíferos, en donde algunos estudios han identificado las principales características de la replicación y la transcripción del mtDNA (Clayton, 1984, 1991, 1992), a diferencia de invertebrados en donde se conoce muy poco (Garesse *et al.*, 1997).

En algunos mtDNAs todos los genes son transcritos a partir de una sola cadena, mientras que en otros los genes están distribuidos entre las dos cadenas. En los pocos casos en los cuales ha sido estudiado, cada cadena es transcrita como un solo policistrón grande, el cual es procesado post-transcripcionalmente en mensajes gene-específicos (Boore, 1999). Los genes de RNA de transferencia, cuya estructura secundaria se ha pensado son señales de división entre genes (Ojala *et al.*, 1981), puntualizan el policistrón de algunos mtDNAs, pero otros tienen genes de tRNA agrupados, lo cual evita tal mecanismo. Aunque se han propuesto estructuras secundarias potenciales como sustitutos en algunas de estas uniones de genes, en la mayoría de los casos no se han podido identificar dichas estructuras *in vivo*. Es posible que el "modelo policistrón" pueda no ser apropiado para muchos de los animales cuya expresión génica mitocondrial permanece aún sin ser estudiada (Boore, 1999).

El D-loop mitocondrial, además de ser el centro de control de este genoma, presenta otra característica notable: es altamente hipervariable, tanto en su secuencia, como en su longitud, lo cual ocasiona la eventual observación de grandes genomas mitocondriales (Rand, 1993) que retan la visión del mtDNA animal como un ejemplo de economía genética. Permanece poco claro si estas regiones control (suponiendo que sean el segmento más grande no codificante) son homólogas entre animales distantemente relacionados o si, alternativamente, han surgido independientemente de varias secuencias no-codificantes en linajes evolutivos separados, puesto que ellas no comparten similitud en la secuencia, excepto entre animales estrechamente relacionados. Por otro lado, en algunos mtDNAs existe otra pequeña región no-codificante, además de la grande, que podría o no contener elementos de control (Boore, 1999).

La variabilidad en la longitud del mtDNA, ahora reconocida como una característica común de esta molécula, ha sido observada en numerosas especies de peces (Billington and Herbert, 1991; Rand, 1993). En casi cada caso, la variabilidad en la longitud ha mostrado ser debida a la presencia de variación en el número de repeticiones en tanda (VNTRs: "Variable Numbers of Tandem Repeats") en la principal región no codificante (Faber y Stepien, 1998; Nesbo *et al.*, 1998; Brzuzan, 2000; Ludwig y Jenneckens, 2000; Saitoh *et al.*, 2000). Los VNTRs varían en tamaño, desde 10 bases hasta 1.5 kb, son altamente polimórficos y exhiben variación en el número de copias entre individuos (lo cual posibilita el análisis de huella genética o "fingerprinting") y, frecuentemente, aún dentro de individuos (heteroplasmia). La detección actual de las frecuentes variaciones en la longitud, así como de la heteroplasmia, es posible se deba en gran parte a la sensibilidad de la detección provista actualmente por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ravago, Monje y Juinio-Meñez, 2002).

Muchos estudios genéticos moleculares se han enfocado a esta región control (CR) mitocondrial, debido a su supuesta rápida tasa evolutiva (Hoelzel *et al.*, 1991). En vertebrados esta región del mtDNA ha sido bien caracterizada a nivel nucleótido (Lessinger y Aseredo-Espin, 2000). Análisis comparativos indican que la CR está relativamente muy estructurada (Saccone *et al.*, 1991), con una región central conservada (CSB: "Conserved Sequence Blocks") flanqueada por dominios izquierdo y derecho relativamente divergentes o hipervariables (Brown *et al.*, 1986; Shadel y Clayton, 1993). No obstante las altas tasas de mutación, la región control contiene motivos o regiones de secuencias cortas bien conservados entre los taxa, lo cuales se piensa están involucrados en la regulación de la replicación de la cadena pesada (H) y en la transcripción del genoma mt (Clayton, 1982; Saccone *et al.*, 1987).

El genoma mitocondrial ha sido ampliamente usado como un marcador molecular para estudios de diversidad genética y filogenética (Avice, 1986; Moritz, Dowling y Brown, 1987; Wilson *et al.*, 1987), debido a su tamaño compacto (14-20 kb), alta tasa de

mutación, [5-10 veces superior que el DNA nuclear de copia simple, debido en parte a la carencia de histonas y de mecanismos de reparación del DNA (Garesse *et al.*, 1997)], carencia de recombinación y su modo de herencia exclusivamente maternal (Brown *et al.*, 1979; Harrison, 1989). Estudios recientes, sin embargo demuestran excepciones a esos conceptos ampliamente aceptados de la biología mitocondrial (Ravago *et al.*, 2002), especialmente en lo referente a la presencia de recombinación en el mtDNA de sistemas biológicos naturales (Saville *et al.*, 1998) y a repetidos reportes de heteroplasmia como resultado de "fugas" de DNA mitocondrial del progenitor en la fecundación (Saville *et al.*, 1998; Stepien *et al.*, 1999), lo cual podría dificultar la interpretación de verdaderos polimorfismos genéticos (Heath *et al.*, 1995; Quesada *et al.*, 1995) para discernir entre diversos organismos.

El DNA mitocondrial ha sido considerado útil para resolver un gran número de problemas filogenéticos (Avise, 1986), tanto en niveles categóricos bajos, como altos (Baldwin *et al.*, 1998; Ballard *et al.*, 1992). Mientras su secuencia primaria, con excepción de la región 12S, ha sido usada principalmente en niveles categóricos inferiores, su patrón de rearrreglo de genes y la secuencia del gen *12SrDNA* han sido usados en niveles categóricos superiores (Hwang y Kim, 1999). Los genes mitocondriales más frecuentemente empleados para evaluar diversidad genética son: *16SrRNA* (Dietrich *et al.*, 1997; Vogler y Welsh, 1997; Schwenk *et al.*, 1998; Stepien *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 1999; Koufopanou *et al.*, 1999; Michel-Salzat y Bouchon, 2000; Schubart *et al.*, 2001; Wares, 2001) y *12SrRNA* (Ballard *et al.*, 1992; Lehman *et al.*, 1995; Wägele y Stanjek, 1995; Hwang *et al.*, 1999; Koufopanou *et al.*, 1999; Richter *et al.*, 2001) como representativos de secuencias altamente conservadas; genes de las subunidades proteicas *NADH* (Dietrich *et al.*, 1997; Smith y Kambhampati, 1999; Chen *et al.*, 2002), *COI*, *COII* y *COIII* -preferencialmente *COI*- (García *et al.*, 1994; Meyran *et al.*, 1997; Vogler y Welsh, 1997; Baldwin *et al.*, 1998; Bernasconi *et al.*, 2000; Leys *et al.*, 2000; Gusmao *et al.*, 2000; Edmonds, 2001; Guryev *et al.*, 2001; Maus *et al.*, 2001; Goto y Kimura, 2001; Mantovani *et al.*, 2001; Litjens *et al.*, 2001; García-Machado *et al.*, 2001; Wares,

2001) y *Cytb* (Crozier *et al.*, 1995; Vogler y Welsh, 1997; Wolf *et al.*, 2000; Leys *et al.*, 2000; Krzywinski *et al.*, 2001; Guryev *et al.*, 2001) representando genes de conservación media en su secuencia nucleotídica y la región control (Taylor *et al.*, 1993; Lehman *et al.*, 1995; Arnaud *et al.*, 1999; Lessinger y Azeredo-Espin, 2000; Gilles *et al.*, 2001; Ravago *et al.*, 2002) –altamente hipervariable– para resolver problemas de diferenciación genética en grupos estrechamente relacionados, especialmente por abajo del nivel de especie. Para la mayoría de los genes mitocondriales usados en diversidad genética, ya se cuentan con oligonucleótidos universales (Koehler *et al.*, 1989) que hacen posible su amplificación por PCR y su posterior análisis por RFLP (PCR-RFLP) o secuenciación directa.

Genes en Camarón

La búsqueda original de marcadores moleculares de camarón se orientó principalmente a la obtención de marcadores del estado de salud (Vargas-Albores, 1991) que permitieran un diagnóstico rápido de las posibles enfermedades o alteraciones bioquímicas de este crustáceo comercialmente importante. Desde entonces, se han identificado diversas proteínas plasmáticas de *Penaeus* spp. involucradas en el sistema de defensa, tanto aquellas de reconocimiento de lo extraño, como reguladoras y efectoras (Vargas-Albores, 1998), tales como la proteína reconocedora de beta glucanos –BGBP, por sus siglas en inglés– (Vargas-Albores, 1996, 1997), la reconocedora de lipopolisacáridos LPS-BP (Vargas-Albores, 1993), algunos factores líticos (Guzmán-Murillo, 1993), la fenol-oxidasa y su proenzima (Gollas-Galván, 1997, 1999), la proteína de coagulación CP (Montaño-Pérez, 1999) e inhibidores de proteasas tipo α -macroglobulinas (Vargas-Albores y Gollas-Galván, *en prensa*, 2003; Vargas-Albores *et al.*, 2000), además de la lipoproteína de alta densidad HDL transportadora de lípidos y también participante en el sistema de defensa (Yepiz-Plascencia, 1998a).

Algunos otros genes estudiados en camarón incluyen neuropéptidos relacionados con la regulación del crecimiento y maduración del camarón (Sun, 1994, 1995), genes de enzimas digestivas como las proteasas tripsina (Klein, 1996, 1998; Le Moullac, 1997), quimotripsina (Sellos, 1992; Van-Wormhoudt, 1995) y catepsinas (Le-Boulay, 1996, 1998), además de genes de amilasas (Van-Wormhoudt, 1996). Pero sin lugar a dudas, los genes más prometedores como marcadores moleculares para identificación, evaluación de la diversidad genética, mejoramiento genético, conservación y evolución, son aquéllos que forman parte del genoma mitocondrial.

Otros tipos de genes y/o secuencias no-codificantes de DNA estudiados en camarón, son aquéllos de tipo nuclear, tanto ribosomales (Bagshaw y Quiel, 1997; Klinbunga, Penman y McAndrew, 1998) y RAPDs (García y Benzie, 1995; García, Dhar y Alcívar-Warren, 1996; Tassanakajon *et al.*, 1997, 1998; Aubert y Lightner, 2000), como los abundantes y polimórficos microsátélites (García, Dhar y Alcívar-Warren, 1996; Wolfus, García y Alcívar-Warren, 1997; Bagshaw y Buckolt, 1997; Ball, Leonard y Chapman, 1998; Vonau *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 1999; Bierne *et al.*, 2000; Brooker *et al.*, 2000), que han mostrado ser de gran utilidad por su potencial aplicación en acuicultura.

Identificación y Variabilidad Genética en Camarón

Los estudios de variación genética de camarones peneidos iniciaron en la década de los 70's (Lester y Pante, 1992), aunque en sus primeras etapas estas investigaciones estuvieron enfocadas a detectar polimorfismos en un locus (Proctor *et al.*, 1974; Marvin y Caillouet, 1976 y Marvin *et al.*, 1977) en poblaciones naturales. El siguiente enfoque en este tipo de estudios fue el ensayo de sistemas multienzimáticos para la determinación de la diversidad genética (Lester, 1979; Mulley y Latter, 1980; De Matthaeis *et al.*, 1983; Mattoceia *et al.*, 1987; Escobar, 1991; Benzie *et al.*, 1992; Tam y Chu, 1993) igualmente

en poblaciones naturales. En México, los estudios de variabilidad genética en peneidos iniciaron con el estudio de alozimas en el laboratorio de genética del Dr. Jorge de la Rosa-Vélez, en la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), específicamente con una investigación sobre *Penaeus californiensis* (Escobar, 1991), en la cual se concluyó que esta especie -en el Golfo de California- presenta "una alta homogeneidad genética interpoblacional", trabajos que han sido posteriormente continuados con evaluaciones de variación genética y estructura poblacional en las cuatro especies de peneidos comercialmente importantes del Pacífico mexicano *P. californiensis*, *P. stylirostris*, *P. brevistrostris* y *P. vannamei* (de la Rosa-Vélez *et al.*, 1999, 2000).

Conforme se empezó a desarrollar el cultivo de camarón a nivel mundial y se obtuvieron las primeras poblaciones cautivas "domesticadas", el enfoque de las investigaciones genéticas se orientó a la evaluación de los organismos cultivados (Lester, 1983; Laubier *et al.*, 1984; Sbordonni *et al.*, 1986; Sbordonni *et al.*, 1987; Lester y Cook, 1987; Harris *et al.*, 1990 y Lester y Pante, 1992). La gran mayoría de estos trabajos enfatizan la baja variabilidad genética presente en poblaciones naturales y la no-estructuración genética de las mismas, así como la indeseable pérdida de variabilidad genética en poblaciones de camarón bajo cultivo. Sin embargo, es importante resaltar que todas ellas evaluaron sólo sistemas enzimáticos (alozimas), que si bien reflejan al genotipo, no son el genotipo mismo.

Así, actualmente se han desarrollado técnicas que analizan directamente el DNA como fuente primaria de la variabilidad genética presente en las poblaciones. Estos estudios (Palumbi y Benzie, 1991; Benzie *et al.*, 1993; Bouchon *et al.*, 1994; García *et al.*, 1994; García y Benzie, 1995; García *et al.*, 1996; García-Machado *et al.*, 2001) han empleado técnicas de RFLP (análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) y RAPD's (amplificación aleatoria de DNA polimórfico) en moléculas de DNA mitocondrial y genómico, en algunos casos incluyendo la secuenciación de los fragmentos obtenidos. Esta poderosa técnica de secuenciación de fragmentos de mtDNA

incluso ha revelado en ocasiones la presencia de especies crípticas, como en el caso de la nueva especie de *Penaeus* descubierta por Gusmão *et al.* (2000). En la actualidad, se acepta que los camarones peneídos muestran una mayor variabilidad genética a nivel de mtDNA que la encontrada anteriormente a nivel de alozimas (Benzie, 2000) y que sólo en algunos casos la información de DNA (mitocondrial y microsátélites) parece coincidir con patrones espaciales de variación genética detectada por alozimas.

En crustáceos, es amplia la lista de investigaciones concernientes al polimorfismo de mtDNA. Los primeros organismos en ser estudiados fueron el copépodo *Calanus* (Bucklin y Kam, 1991; Bucklin *et al.*, 1992; Bucklin y Lajeunesse, 1994; Bucklin y Kocher, 1996) y el cladóceros *Daphnia* (Stanton *et al.*, 1991; Colbourne y Hebert, 1996; Taylor *et al.*, 1996; Crease y Little, 1997), seguidos posteriormente por el branquiópodo *Artemia* (Pérez *et al.*, 1994; Vallejo *et al.*, 1996; Garesse *et al.*, 1997), el isópodo *Trichoniscus pusillus pusillus* (Theisen *et al.*, 1995), los langostinos europeo *Austropotamobius pallipes pallipes* (Grandjean y Souty-Grosset, 1996; Grandjean *et al.*, 1997a,b) y americano *Pacifastatus lentusculus* (Grandjean y Souty-Grosset, 1997), el anfípodo *Eurythenes gryllus* (France y Kocher, 1996), las langostas *Panulirus argus* (Sarver *et al.*, 1998), *Homarus*, *Homarinus*, *Metanephrops*, *Nephrops* y *Nephropsis* (Tam y Kornfield, 1998), los notostracos *Lepidurus* (King y Hanner, 1998), los cangrejos ocypodidos (Kitaura *et al.*, 1998), *Menippe* (Schneider-Broussard y Neigel, 1997) y *Emeritta* (Tam *et al.*, 1996), entre otros.

El mtDNA ha sido también aplicado para evaluar la variabilidad genética en diversas especies de camarón. Palumbi y Benzie (1991) fueron los primeros en utilizar este marcador molecular en *P. (Litopenaeus) stylirostris* y *P. (L.) vannamei* del Pacífico, así como también en las especies australianas *P. (Penaeus) esculentus*, *Metapenaeus endaeavori*, concluyendo que existen diferencias en DNA mitocondrial entre camarones peneídos morfológicamente similares, del orden de 9,6% entre *P. vannamei* y *P. stylirostris* cuando se evaluó la secuencia del gen *12S* ribosomal mitocondrial. También

Benzie *et al.* (1993) aplicaron este marcador molecular para analizar la estructura genética de *P. monodon* y comparar estos resultados con análisis de alozimas, trabajo semejante al realizado posteriormente por García *et al.* (1994) en *P. vannamei*. Existen también estudios de mtDNA-RFLP para determinar la variación genética y estructura poblacional de *P. monodon* (Klinbunga *et al.*, 1999), los cuales han estimado una diversidad de nucleótido de 1.91-2.51% entre poblaciones y un tamaño aproximado del genoma mitocondrial de 15913 ± 177 bp.

Por otro lado, la variabilidad de secuencia de *P. notialis* y *P. schmitti* (García-Machado *et al.*, 1993) ha sido evaluada con base en el gene *16SrRNA* mitocondrial, cuya comparación de secuencia revela un 11% de divergencia de nucleótido entre estas dos especies. Este mismo grupo de investigadores (García-Machado *et al.*, 1996) ha logrado secuenciar la mitad del genoma mitocondrial de *P. notialis*. Existen también publicaciones comparativas de la variación de mtDNA en *P. monodon* y *P. japonicus* (Bouchon *et al.*, 1994) y *P. vannamei* (Alcivar-Warren *et al.*, 1997). Además, a la fecha se han secuenciado los genomas mitocondriales completos de 31 artrópodos, dentro de los cuales se incluyen 6 crustáceos: el camarón asiático *Penaeus monodon* (Wilson *et al.*, 2000), la langosta espinosa japonesa *Panulirus japonicus* (Yamauchi *et al.*, 2002), el cangrejo ermitaño *Pagurus longicarpus* (Hickerson y Cunningham, 2000), el cladóccero *Daphnia pulex* (Crease, 1999), el branquiópodo *Artemia franciscana* (Pérez *et al.*, 1994) y el copépodo *Tigriopus japonicus* (Machida *et al.*, 2002). De estas investigaciones se desprende la conclusión de que existen al menos tres arreglos de genes mitocondriales distintos en crustáceos: (1) el posible orden génico más primitivo -por su estrecha relación con insectos- sería el de *Daphnia pulex* (Crease, 1999), semejante al de *Drosophila yakuba*; (2) el arreglo de genes de *Artemia franciscana* (Valverde *et al.*, 1994) que muestra dos rearrreglos de tRNAs que son únicos, con respecto a otros artrópodos y (3) el orden de genes presente en *Pagurus longicarpus* que muestra 8 rearrreglos con respecto al genoma "primitivo" de *Daphnia-Drosophila*, entre los cuales se incluyen 2 rearrreglos únicos (aparte de los quelicéceros) de genes codificantes de proteínas -*NADH2*

y *NDH3*- además de una inversión en la transcripción del *tRNA^{Val}* (Hickerson y Cunningham, 2000). Estas observaciones corroboran lo propuesto por diversos autores, en el sentido de la importancia que reviste el rearrreglo de genes mitocondriales para discernir relaciones filogenéticas y sistemáticas controversiales (Boore *et al.*, 1995; Boore y Brown, 1998; Curole y Kocher, 1999; Blanchette *et al.*, 1999).

OBJETIVOS

Objetivo General

Estimar la variabilidad genética molecular y las relaciones filogenéticas de *P. californiensis*, *P. vannamei* y *P. stylirostris*, por medio del análisis de secuencia de genes mitocondriales, para su posterior uso potencial como marcador molecular en acuicultura, pesquerías, conservación, evolución y alimentos.

Objetivos Particulares

Amplificar por PCR los genes ribosomales y la región control mitocondriales de las tres especies de *Penaeus* bajo estudio.

Clonar y secuenciar los fragmentos de los genes mitocondriales amplificados por PCR

Analizar la secuencia de los genes mitocondriales clonados

Estimar distancias genéticas a nivel nucleótido de las tres especies estudiadas

Evaluar las relaciones filogenéticas de las tres especies de Penéidos analizadas.

HIPÓTESIS

El orden génico de la porción *NADH1-IRNA^{Mt}* del DNA mitocondrial es igual para las tres especies de camarón (*P. californiensis*, *P. vannamei* y *P. stylirostris*) comercialmente más importantes del Pacífico mexicano; sin embargo, sus secuencias nucleotídicas difieren lo suficiente como para diferenciar especies y establecer las relaciones filogenéticas entre ellas. Además, si los camarones *P. vannamei* y *P. stylirostris* representan ambos a camarones de tético abierto, entonces su mtDNA presentará un porcentaje mayor de identidad nucleotídica, con respecto al camarón de tético cerrado *P. californiensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies de Camarón

Los organismos de camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* utilizados en este estudio fueron donados por la granja comercial camaronícola "Acualarvas", ubicada en la costa sur de Sonora. Los ejemplares de camarón azul *P. (Litopenaeus) stylirostris* fueron donados por la Unidad Experimental Kino, del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), enclavada en la costa oeste central del Golfo de California. Las muestras de camarón café *P. (Farfantepenaeus) californiensis* fueron proporcionadas por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), situado en la costa sur oeste de la península de Baja California. Los organismos fueron transportados vivos al laboratorio y mantenidos en acuarios bajo sistema cerrado a una temperatura de $24 \pm 4^{\circ}\text{C}$, 36 ppm de salinidad, 5.5 ± 0.5 ppm de oxígeno disuelto y alimento peletizado comercial camaronina (AgribRANDS Purina, México) suministrado *ad libitum*. Cuando no fue posible trasladar y/o mantener vivos a los organismos, fueron entonces colectados sus pleópodos y preservados en etanol al 90% para su posterior procesamiento (Padilla-Sánchez, 1999).

Extracción de DNA Mitocondrial

La extracción de mtDNA se realizó mediante el método de Carr y Griffith (1987), incluyendo una precipitación por medio de una solución saturada de sal (Aljanabi y Martínez, 1997), en acuerdo con las modificaciones propuestas por Padilla-Sánchez (1999).

El protocolo de extracción consistió en la homogeneización de 1 g de pleópodos, llevado hasta 15 ml con buffer frío de homogeneización sacarosa-TE [sacarosa 0,25 M, EDTA 60 mM, Tris-HCl 30 mM, NaCl 1,5%, pH 8,0 (Grandjean y Souty-Grosset, 1996)]. El homogeneizado fue centrifugado en una centrífuga Avanti 30 (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA) en un tubo de 50 ml a 1000 x g, durante 30 min a 4°C, para precipitar los restos nucleares y celulares. El sobrenadante, conteniendo a las mitocondrias, fue recuperado y centrifugado a 1,200 x g durante 10 min, a 4°C. Seguido a esto, se transfirió de nuevo el sobrenadante a (3-4) tubos Falcon 2063 de 5 ml y se centrifugo a 20,000 x g, por 20 min, a 4°C., para obtener el precipitado mitocondrial (preparación cruda de mitocondrias). Después, se resuspendió este pellet en 15 ml de "TE-buffer especial para mitocondrias" (EDTA 60 mM, Tris-HCl 30 mM, NaCl 1,5%, pH 8,0) para purificar la preparación mitocondrial. Posteriormente, se repitió la centrifugación a 20,000 x g, por 20 min, a 4°C y se resuspendió el pellet en 980 µl de "TE-buffer especial para mitocondrias" anteriormente descrito y 20 µl de Nonidet P-40 (Igepal CA-630), lo cual proporciona una concentración final de 0,4% de este reactivo.

Se agregaron después, a la suspensión de mitocondrias, 10 µl de RNasa A (10 µg/µl) y se realizó una incubación de 30 min, a 42°C, después de lo cual se agregó 1/20 vol (50,5 µl) de Proteínasa K (20 mg/ml) y se incubó durante 1 hora a 65°C. Una vez terminada la incubación, se dejó hasta alcanzar temperatura ambiente y posteriormente se congeló a -70°C, durante toda la noche, para fragmentar las membranas mitocondriales. Seguido a este congelamiento, se extrajeron las proteínas de la solución con NaCl 6 M. Por cada 450 µl de la muestra, se agregaron 300 µl de NaCl 6 M y se mezclaron en vortex a velocidad máxima, para ser posteriormente centrifugada la solución a 12,800 x g, por 30 min, a 4°C. Se separó el sobrenadante y se le agregó 1 ml de TE-buffer [TE pH 8,0: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, pH 8,0 (Sambrook *et al.*, 1989)] para diluir la concentración de sal en la solución. Esta se realizó con 1 vol igual de fenol pH 8,0; posteriormente se separó la fase acuosa y se centrifugo a 12,800 x g, durante 10 min, a 4°C. Se separó el sobrenadante y se extrajo una vez con 1 vol de cloroformo:alcohol

isoamílico (24:1) para remover el fenol. De nuevo se separó la fase acuosa conteniendo el DNA y se centrifugó a 12,800 x g, durante 10 min, a 4°C. Al sobrenadante se le agregó 1 vol de isopropanol (2-propanol), o bien 2 vol de etanol absoluto, para precipitar el DNA, sin agregar sal adicional, por considerar que ya había exceso de NaCl en la muestra, y posteriormente se congeló a -70°C, durante toda la noche. Se procedió después a descongelar la muestra y centrifugarla a 15,000 x g, por 30 min, a 4°C. Para lavar el pellet obtenido, se agregó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugo a 15,000 x g, por 10 min, a 4°C y se repitió el mismo procedimiento para un mejor lavado. Finalmente, el precipitado fue secado al vacío en "Speed-Vac" (DNA Speed Vac, DNA 110, Savant, Holbrook, New York, USA) y resuspendido en 50 µl de TE-buffer, en acuerdo con la fórmula original de Sambrook *et al.* (1989).

Extracción de DNA Genómico

El protocolo que se presenta a continuación es una modificación al método propuesto por Aljanabi y Martínez (1997), según Peregrino-Uriarte y Yepiz-Plaseencia (comunicación personal). Cada extracción se inició con 100-150 mg de tejido (pleópodos), los cuales fueron homogeneizados con 500 µl de buffer (NaCl 0.4 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) mediante un homogenizador Kontes e incubados 15 min a 55°C. Posteriormente, se añadieron 3 µl de RNasa A (10 mg/ml) y se incubó la solución durante 1 hora, a 37°C, para después agregar 10 µl de Proteinasa K (20 mg/ml), junto con 50 µl de SDS al 20% e incubar entonces 1 hora, a 60°C. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó la muestra a 10,000 x g, por 10 min, a 4°C. Al sobrenadante resultante se le agregaron 300 µl de NaCl 6 M y 88 µl de CTAB (bromuro de hexadecil trimetil amonio) al 10%, lo cual resultó en una concentración final de 1%. Esta solución fue entonces incubada por 1 hora, a 55°C, después de lo cual se añadió 1 vol (aproximadamente 650 µl) de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló

manualmente. Esta solución fue centrifugada a 12,000 x g, durante 5 min. Posteriormente se repitió el paso de cloroformo:alcohol isoamílico hasta volver de nuevo a centrifugar bajo las condiciones ya descritas. Se tomó después la fase acuosa con puntas para micropipeta con extremos recortados (especiales para evitar el daño físico de DNA), se añadió 1 vol igual de isopropanol y se incubó al menos durante 1 hora, a -20°C , seguido de una centrifugación a 10,000 x g, por 40 min, a 4°C . El DNA precipitado fue después lavado dos veces con 300 μl de etanol al 70%, seguido de centrifugación a 10,000 x g, por 10 min, a 4°C . Al final el DNA fue secado al vacío, en Speed-Vac, por 10 min y resuspendido en 50 μl de buffer TE (10 mM Tris.Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0 (Sambrook *et al.*, 1989).

Purificación de DNA

La purificación de DNA requerida para experimentos posteriores (PCR, secuenciación, clonación, etc.), tanto a partir de soluciones líquidas (Protocolo A), como de gel (Protocolo B), fue realizada con base en una matriz de sílica gel en microtubo (GeneClean, BIO101®, La Jolla, CA) en acuerdo a las siguientes especificaciones:

Protocolo A (Aislamiento Rápido de DNA de 0.2-300 kb, a Partir de Solución)

En un tubo con filtro de GeneClean, se agregaron 400 μl de "GeneClean spin glassmilk" (conteniendo a la sílica gel) previamente agitados en vortex y posteriormente se adicionó la solución de DNA (máximo 300 μl /filtro). Se dejó reposar 5 min la solución para la unión del DNA a la sílica, invirtiendo el microtubo cada minuto para evitar el asentamiento de la matriz. La cantidad de matriz usada es suficiente para unir hasta 5 μg de DNA/preparación (si se tiene más DNA, deberá repartirse en varios microtubos, no

excediendo nunca los 5 µg en cada uno de ellos). Posteriormente se centrifugó la solución a 13,200 x g, por 1 min, para bajar el líquido del microtubo y posteriormente desecharlo. El filtro fue entonces lavado dos veces con la solución A "GeneClean spin new wash" (etanol, posiblemente al 70%), centrifugado a 13,200 x g, por 30 segundos y desechada la solución. Esta misma centrifugación fue de nuevo repetida, pero sin solución y durante 2 min, para secar el líquido del pellet lo más posible. El filtro se pasó entonces a un segundo microtubo limpio y se le agregaron 25 µl de "GeneClean spin elution" (agua estéril). Finalmente, la muestra fue de nuevo centrifugada a 13,200 x g, por 1 min, para obtener el DNA ya en solución y listo para su posterior análisis.

Protocolo B (Aislamiento Rápido de DNA de 0.2-300 kb, a Partir de Gel de Agarosa)

El corte de gel (no más de 300 mg/filtro) fue primeramente agregado a 400 µl de "GeneClean spin glassmilk" y calentado a 55°C, por 5 min, o hasta que el gel se derritió completamente. La muestra fue después centrifugada a 13,200 x g, por 1 min, para bajar el líquido del microtubo. Después de este paso, el protocolo continuó exactamente igual al descrito en el protocolo A, a partir de los lavados con la solución A (etanol).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Amplificación de Fragmentos de mtDNA Menores de 2 kb

El mtDNA fue usado como templado (10 ng) para ser amplificado mediante PCR en un volumen de reacción total de 50 µl, conteniendo concentraciones finales de 200 µM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's), 3.75 mM MgCl₂, 1 µM de cada uno de los dos primers, 2.5 U de enzima Taq Polimerasa y 1X PCR buffer (50 mM

KCl, 20 mM TrisHCl, pH 8.4), siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante (Perkin Elmer). Los primers utilizados para amplificar una porción de los genes ribosomales de las subunidades grande 16S y pequeña 12S mitocondriales fueron originalmente descritos como "primers universales" por Koehler *et al.* (1989): 16SF 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCA-3' (19 mer), que corresponde a una porción del primer 16SBR reportado por Simon *et al.* (1991) y Palumbi y Benzie (1991), correspondiente a la porción 12910-12888 de la secuencia mitocondrial de *Drosophila yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985), así como el primer 12SR1 5'-ACACATACGCCCGTCGCTCT-3' (20 mer), semejante al reverso mas complemento modificado del primer 12SBI reportado por Simon *et al.* (1991), correspondiente a la región 14234-14214 de la secuencia mitocondrial antes descrita de *Drosophila yakuba*.

Estos primers, así como los restantes oligonucleótidos empleados en esta investigación, diseñados a partir de genes mitocondriales *12SrRNA*, *16SrRNA*, *NADH1*, *tRNA^{Met}* y región control, fueron obtenidos con base en secuencias depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), y/o secuencias obtenidas en nuestro laboratorio y sus características principales han sido resumidas en la Tabla III, así como su ubicación en el genoma mitocondrial es mostrada en la Figura 2. En el diseño de estos oligonucleótidos se tuvo especial cuidado en tratar de obtener las longitudes recomendadas, homologar las temperaturas de alineación, así como de evitar características indeseables como la formación de estructura secundaria y primers-dimers (Innis *et al.*, 1990; Singh y Kumar, 2001). Las amplificaciones de mtDNA fueron realizadas en un termociclador MJ Research PTC 200 DNA Engine (MJ Research, Inc., Waltham, MA) programado para 1 ciclo inicial de alta astringencia de 94°C durante 3 min, 55°C por 1 min y 72°C por 3 min, seguido de 1 ciclo de baja astringencia de 94°C durante 1 min, 42°C por 1 min y 72°C por 3 min. El programa de PCR continuó después con 33 ciclos de astringencia media, con 94°C durante 1 min, 52°C por 1 min y 72°C por 3 min, para finalizar con una extensión final de 72°C durante 10 min. El DNA amplificado fue posteriormente analizado en geles de agarosa al 1.2% en TAE

Tabla III. Características de oligonucleótidos diseñados para amplificación por PCR de genes mitocondriales. Los genes involucrados fueron *ND1*, *12S*, *16S* y la región control.

Nombre del Oligo	Longitud	Tm °C	% GC	Estructura Secundaria	Secuencia (5'-3')
ND1f	20	65	60	No	ggggTTCggTTAgTCTCTgC
16Sr	24	70	50	Débil	gCgACCTCgATgTTgAATTAAGgg
16Sf	19	61	53	Moderada	CCggTCTgAACTCAgATCA
12Sf	20	56	50	Moderada	ggTACACTTTCCAgTACACC
12Sr1	20	69	60	No	ACACATACgCCCgTCgCTCT
12Sf1.5	24	62	38	Muy Débil	ATTCACCCCTTTATCAGTACAAgC
12Sr2	20	66	60	No	AgCCgCggTTAgACTgAgAg
CTRLf	21	50	29	Débil	gTAgTTAAAgAATgTTCTTTg
CTRLr	26	60	35	Débil	gAAACTCTAATCTgCTAgAATTTgAg
tRNA ^{Met} r	18	60	56	Débil	ATgAgCCCACgAgCTTAC

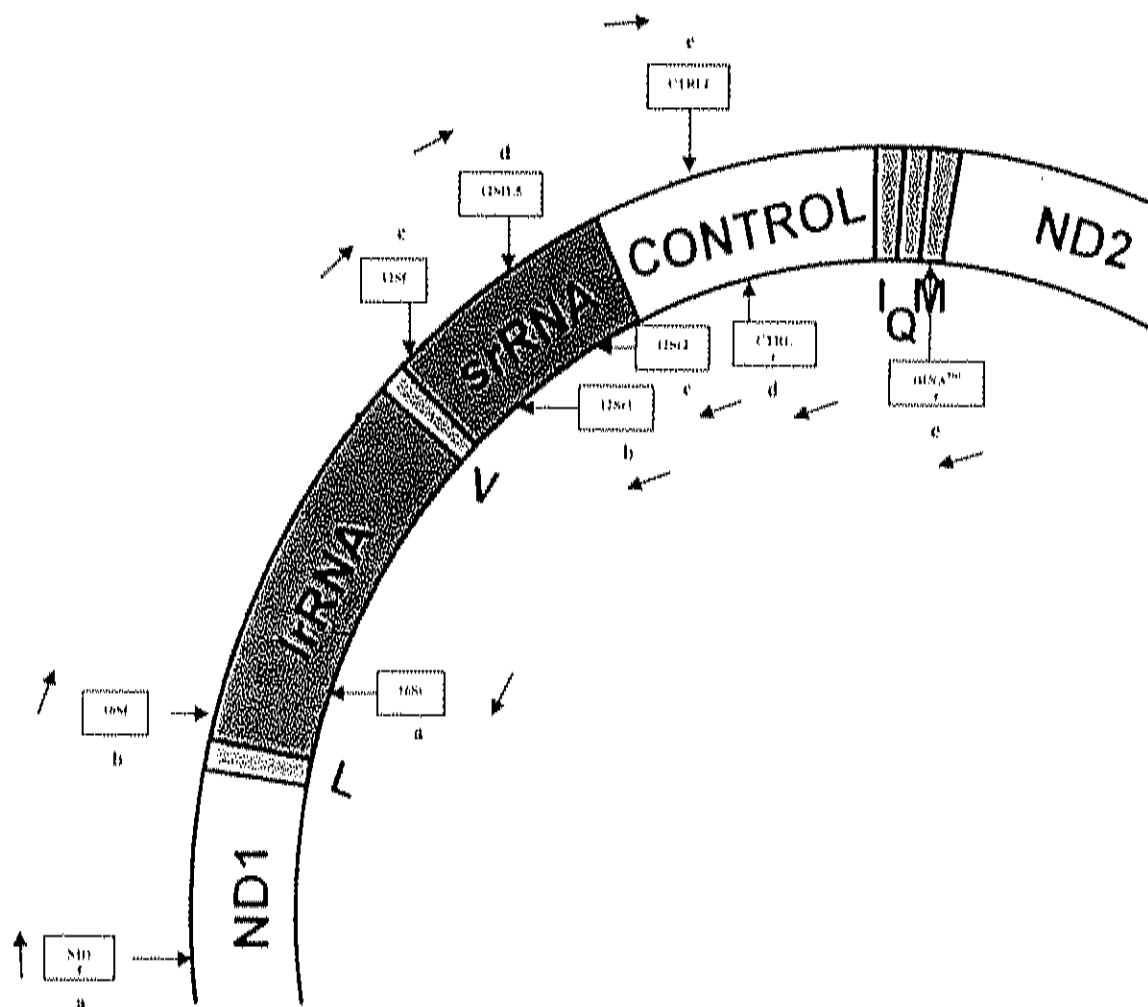


Figura 2. Localización de oligonucleótidos en el genoma mitocondrial de *Penaeus* spp. (literales iguales significan pares de primers usados en PCR).

(EDTA.Na₂ 1 mM, ácido acético glacial 20 mM, Tris base 40 mM, pH 8.0), teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), visualizados con luz UV y fotografiados para su registro (Sistema de fotodocumentación Kodak EDAS 120, Rochester, New York) y análisis posterior.

Amplificación del Genoma Mitocondrial Completo

Una de las estrategias seguidas en esta investigación fue el tratar de amplificar por PCR el genoma mitocondrial completo de las tres especies de peneidos estudiadas, para lo cual se siguió el protocolo seguido por Hwang *et al.* (2001).

Para lograr este tipo de amplificaciones, se requirieron dos condiciones fundamentales, entre otras: (1) obtener DNA de excelente calidad e integridad y (2) diseñar primers especiales que permitiesen temperaturas de alineación de alrededor de 65 °C, además de las características generales deseables en cualquier par de primers. Para ello, se diseñaron primers con base en la secuencia del gen 16S ribosomal mitocondrial obtenida en nuestra laboratorio, cuyas generalidades se muestran en la Tabla IV.

El DNA mitocondrial o genómico fue obtenido en acuerdo con los protocolos correspondientes anteriormente descritos. Cuando el templado fue mtDNA se usaron sólo 10 ng por reacción, mientras que en el caso de DNA genómico se usaron 400-500 ng igualmente por reacción. La reacción de PCR se preparó mediante dos mezclas separadas (sistema 3): (1) "master mix 1", conteniendo 2.5 µl de cada uno de los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 mM, para una concentración final de 500 µM, primers sentido y antisentido, para una concentración final de 300 nM, templado DNA en las concentraciones citadas con anterioridad y agua estéril hasta un volumen final de 25 µl; (2) "master mix 2", 5 µl de 10X PCR buffer 3 [20 mM TrisHCl, pH 7.5 (25°C), 100 mM KCl, 1 mM diltiothreitol (DTT), 0.1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P40, 50% glicerol (v/v)],

Tabla IV. Características de oligonucleótidos diseñados para la amplificación completa por PCR del genoma mitocondrial de *Penaeus* spp.

Nombre del Oligo	Long.	Tm °C	% GC	Est. Secund.	Secuencia (5'-3')	Posiciones con base en secuencias: <i>P. vannamei</i> (AYO46914.1) <i>P. stylirostris</i> (AYO46913.1) <i>P. californiensis</i> (AYO46912.1) (± 2 bp)
LE1minus	25	77	60	Débil	ATCgACAggAAgggTTgCgACCTCg	1283-1309
LE5minus	24	76	54	Débil	TgCgTTggggCgACgggAATATAA	1138-1163
LE7plus	38	75	45	Débil	GACTAATgATTATgCTACCTTCgCACggTCagTATACC	954-915
LE8plus	32	77	44	Débil	CAAgACgCATTgATTTgCACACgAACTTCTC	133-102

con $MgCl_2$ 2.25 mM y 0.75 μ l (2.625 U) de la mezcla de enzimas suministradas (Expand Long Template PCR System, Roche-Boehringer Mannheim).

El ciclo de amplificación por PCR empleado inició con una temperatura de desnaturalización de 94°C, por 2 minutos, seguida de 10 ciclos de desnaturalización a 94°C por 10 segundos, alineación a 65°C por 30 segundos y elongación a 68°C durante 13 minutos. Posteriormente, siguieron 20 ciclos de desnaturalización a 94°C por 10 segundos, alineación a 65°C por 30 segundos y elongación a 68°C durante 13 minutos, con la diferencia de que en cada ciclo de elongación se incrementaba el tiempo en 20 segundos adicionales. Finalmente, el programa de amplificación terminó con un tiempo de extensión de 7 minutos, a una temperatura de 68°C. Las reacciones fueron inmediatamente colocadas sobre hielo y posteriormente analizadas en geles de agarosa al 1% en buffer TAE.

Clonación y Análisis de Recombinantes

Los productos amplificados por PCR fueron ligados al vector pCR 2.1 TOPO y usados para transformar células TOP 10 F' *Escherichia coli* competentes One Shot, del sistema TOPO TA Cloning Versión J® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Una vez que los fragmentos de mtDNA son clonados, es necesario identificar los clones potenciales que portan el inserto de interés. Para ello, se recurrieron a dos estrategias distintas: (1) un método para detectar de forma rápida las diferencias en la migración de DNA superenrollado en geles de agarosa, entre plásmidos recombinantes y no recombinantes (Yepiz-Plascencia, 1998b), o bien (2) un método directo de extracción de DNA plasmídico (Ausubel *et al.*, 1994; Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989) y el posterior análisis de restricción (en este caso con la endonucleasa *Eco*RI) para la liberación de los insertos potenciales. Ambos protocolos se describen a continuación.

Extracción de DNA Superenrollado

La técnica de DNA superenrollado (Yepiz-Plascencia, 1998b) se inició con la inoculación de una colonia en el caldo de cultivo SOB conteniendo el antibiótico ampicilina y acompañando el procedimiento con la correspondiente réplica en una placa nueva. Posterior a esto, se incubó a 37°C, hasta tener el cultivo en fase estacionaria (12-18 horas o toda la noche). Se centrifugó después 1 ml de cultivo en microcentrífuga, a velocidad máxima, por 2 minutos y se guardó el resto del cultivo en refrigeración para su uso posterior. Después de centrifugado el cultivo se descartó el sobrenadante, en un vaso de precipitados con cloro, y se resuspendió el pellet en 100 µl de TE, mezclando vigorosamente en vortex. A esta mezcla, se le agregaron 100 µl de solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclando igualmente en vortex y se llevó después a centrifugación, durante 1 min, a velocidad máxima. Se tomaron posteriormente 5-10 µl de la fase acuosa y se les agregaron 1-2 µl de buffer muestra. Seguido a esto, se agregó 1 µl de RNasa A (1 mg/ml) e incubó por 10-15 min, a temperatura ambiente. Al final de la incubación, la muestra fue cargada en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE, con el correspondiente estándar superenrollado y una muestra de DNA plasmídico no-recombinante, y se comparó la migración diferencial entre los recombinantes potenciales, los cuales fueron seleccionados y finalmente sujetos al procedimiento de extracción de DNA plasmídico para su fehaciente confirmación.

Extracción de DNA Plasmídico

El protocolo empleado para extraer el DNA plasmídico es una adecuación del tradicional método de lisis alcalina presentado por Ausubel *et al.* (1994) y Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989).

Esta técnica se inició colocando 1.5 ml de cultivo en un microtubo y centrifugándolo a 12,000 x g en microcentrífuga, por 5 min, a temperatura ambiente (22-23 °C). Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 250 µl de la solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0, solución esterilizada 15 min a 10 libras/pulgada² en ciclo líquido y guardada a 4°C) y mezclada vigorosamente en vortex. Se agregaron después 250 µl de la solución II (NaOH 0.2 N –diluida recientemente de una solución stock 10 N- y SDS 1%) y se esperaron 5-10 min, hasta que la solución se tornó transparente. Posteriormente, se agregaron 250 µl de la solución III (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua; la solución resultante es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato), colocada previamente en hielo, y la mezcla resultante fue igualmente puesta en hielo por un periodo de 10-15 min. Seguido a esto, se centrifugó a 16,100 x g, durante 10 min, a temperatura ambiente (22-23 °C), después de lo cual se transfirió el sobrenadante a un microtubo limpio (aproximadamente 700 µl) y se le agregaron 500 µl de isopropanol a temperatura ambiente (22-23 °C). Después se centrifugó la muestra a 16,100 x g, por 30 min, a temperatura ambiente, se removió el sobrenadante y el pellet fue lavado con 300 µl de etanol al 70%. Este fue eliminado mediante centrifugación máxima, por 5 min, desechado y el procedimiento repetido hasta dos lavados, después de lo cual el pellet fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 50 µl de TE. Al buffer TE puede adicionársele 1 µl de RNasa A (1 mg/ml) por cada ml de TE, o bien la RNasa A ser agregada después de la solución II.

Finalmente, se realizó una extracción convencional con fenol (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989) y precipitación posterior con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y ½ vol de acetato de amonio 7.5 M, dejando la solución por al menos media hora a -20°C.

Secuenciación y Análisis de Secuencias

La secuenciación de los clones positivos fue realizada en DNA de doble cadena en nuestro laboratorio en un secuenciador automático ALF Express II (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), por el método de terminación con dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) usando el kit de secuenciación (Pharmacia) y el primer T7, o bien enviados a secuenciar al Laboratorio de Evolución Molecular y Sistemática (LMSE) de la Universidad de Arizona (Tucson, AZ). Los extremos fueron secuenciados empleando los primers universales T7 y M13Reverse. Se diseñaron además primers internos a partir de secuencias ya conocidas o secuencias consenso para la secuenciación de porciones internas de los fragmentos amplificados.

El análisis de similitud de nucleótidos se realizó a través del algoritmo BLAST en el sitio web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de U.S.A. Los datos de secuencia fueron analizados y editados mediante los programas DNAsys® y LaserGen®. Los alineamientos fueron originalmente realizados mediante el algoritmo de CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997), terminados en forma manual y posteriormente editados en el programa editor de secuencias alineadas BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Las estructuras secundarias de los tRNAs fueron predichas usando el programa Rna Viz (<http://rna.uia.ac.be/rnaviz/>) (De Rijk and De Wachter, 1997) y el software del servidor DNA mfold (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/>) (Zuker *et al.*, 1999; Mathews *et al.*, 1999).

Análisis Filogenético

Distancias Genéticas

Las distancias genéticas entre especies, con base en secuencias de ácidos nucleicos, fueron calculadas en acuerdo con el modelo de sustitución de 2 parámetros de Kimura (1980), usando el programa DNADIST del paquete computacional PHYLIP 3.5e (Felsenstein, 1993). Este programa lee secuencias nucleotídicas y proporciona una salida computacional de tipo matricial. A diferencia del modelo de sustitución de nucleótidos de Jukes y Cantor (1969) usado con anterioridad, el cual sólo consideraba cambios independientes en todos los sitios, con la misma probabilidad de ser, el modelo de Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980) considera probabilidades diferenciales, preferenciando las transiciones ($A \leftrightarrow G$, $C \leftrightarrow T$) sobre las transversiones ($A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow T$, $C \leftrightarrow G$, $G \leftrightarrow T$). Una transición es la sustitución de una purina (C,T) por otra, o bien la sustitución de una pirimidina (A,G) por otra; mientras que una transversión es la sustitución de una purina por una pirimidina, o viceversa. En este modelo, tanto las transiciones, como las transversiones, son las mismas para todos los sitios a lo largo de la secuencia de DNA. Este parámetro de diferente proporcionalidad entre ambos tipos de sustituciones puede ser prefijado en el análisis en cuestión [en este estudio se fijó a 2 esta tasa, por considerar frecuente la mayor desviación de esta proporción en genes mitocondriales, en comparación con genes nucleares o de cloroplasto (Wakeley, 1996; Yang y Yoder, 1999)], aunque existe ya otro modelo que considera también tasas desiguales de sustitución en diferentes sitios (Jin y Nei, 1990). Cada distancia, en cualquiera de estos modelos, es calculada por DNAML como una estimación, a partir de un par particular de especies, del tiempo de divergencia entre tales especies.

El modelo de 2 parámetros de Kimura (1980) relaja una de las principales suposiciones del modelo de Jukes y Cantor (1969), permitiendo tasas de sustitución

instantáneas diferentes entre transiciones y transversiones. Así, el modelo corregido de Kimura para distancias genéticas entre dos DNA considera:

$$d = \log(1/(1-2P-Q)) + \log(1/(1-2Q))$$

donde P y Q son las proporciones de las diferencias transicional y transversional entre las dos secuencias, respectivamente.

Análisis de Máxima Probabilidad

El análisis de Máxima Probabilidad ("Maximum Likelihood") fue desarrollado mediante el programa DNAML del mismo paquete de programas filogenéticos PHYLIP 3.5c (Felsenstein, 1993). Este análisis estima filogenias a partir de secuencias de nucleótidos por máxima probabilidad. El modelo empleado permite frecuencias esperadas desiguales para los cuatro nucleótidos, tasas desiguales de transiciones y transversiones, e incluso tasas diferentes de cambios (pre-especificadas) en diferentes categorías de sitios, con el programa infiriendo cuáles sitios tienen cuáles tasas.

Los métodos de probabilidad para filogenias fueron primeramente introducidos por Edwards y Cavalli-Sforza (1964) para datos de frecuencias génicas. Neyman (1971) aplicó la probabilidad a secuencias moleculares, trabajo posteriormente extendido por Kashyap y Subas (1974), pero fue Felsenstein (1973, 1981) quien estableció el marco conceptual de máxima probabilidad para realizar inferencias filogenéticas basadas en secuencias nucleotídicas.

Máxima Probabilidad (ML, "Maximum Likelihood") es una técnica estadística general para estimar parámetros y comparar hipótesis. Actualmente se aplica en las ciencias biológicas en general y es el método a elegir para analizar muchos problemas

biológicos, en los cuales permea la incertidumbre. Debido a los problemas de cálculo asociados a la construcción de árboles filogenéticos, el uso de las técnicas de máxima probabilidad hubo de esperar hasta el desarrollo de los poderosos sistemas actuales de cómputo. Las técnicas de estimación de ML son ahora uno de los métodos más usados en inferencia filogenética, si bien aún siguen requiriendo mucho tiempo computacional para su análisis.

En el contexto filogenético, ML requiere de 3 ingredientes: (1) datos (v.gr.: secuencias de DNA de los grupos cuyas relaciones filogenéticas se desean estimar), (2) una hipótesis filogenética (v.gr.: un árbol filogenético candidato a ser evaluado) y (3) un modelo de evolución [v.gr.: alguno de los modelos de sustitución anteriormente descritos, como el de Jukes y Cantor (1969), el de Kimura (1980), el de Jin y Nei (1990), o algún otro]. Así, es posible definir la probabilidad como:

$$\text{Prob} \propto P(R|H_{ip}, \text{Modelo})$$

lo cual es otra manera de decir que la probabilidad (Prob) es proporcional (\propto) a la probabilidad de observar los resultados (R, los cuales son los datos actuales), dada la hipótesis (Hip, la cual es el árbol candidato) y el modelo (Modelo de Sustitución). Máxima Probabilidad es entonces un criterio de optimización que establece que la hipótesis (el árbol) que obtiene la probabilidad más alta, debería ser preferido sobre otros árboles; de igual manera, Máxima Parsimonia (MP, "Maximum Parsimony") que representa otro método filogenético (Camin y Sokal, 1965), es el criterio de optimización que establece que el árbol más parsimonioso (el de longitud más corta), debería ser preferido sobre otros. En ambos métodos, la estrategia es similar en principio: primero se crean todos los posibles árboles filogenéticos, después de lo cual cada uno de ellos es evaluado y finalmente se elige el más probable (ML), o bien el más parsimonioso (MP), aunque en la realidad es posible que la naturaleza no siempre lleve a la evolución por el camino más corto (más parsimonioso).

Bootstrapping

El error del muestreo tiene que ver con el poder del método. Existen varias formas de estimar la influencia del muestreo sobre la estimación. El procedimiento normal para estimar la variación en el muestreo sería tomar un número de muestras y calcular alguna medición de la variación basada en tales muestras (v.gr., la varianza o la desviación estándar). Sin embargo, en el análisis filogenético sería problemático, si no imposible, hacer tal cosa, por lo cual se ha recurrido a otro tipo de técnicas para estimar la variación de los datos, tales como "bootstrapping" (Newton, 1996) o Jack-Knife (Shao y Tu, 1995), que son básicamente métodos de re-muestreo, para hacer inferencia estadística.

Cuando se quiere evaluar la calidad del árbol filogenético obtenido, es posible preguntarse: ¿qué tan confiable es realmente el árbol?; ¿qué tan buenos son los nodos internos?; ¿qué tan confiables son las longitudes de las ramas?. Estas preguntas tienen que ver con la "robustez" del árbol, es decir, ¿qué tan diferentes tendrían que ser las secuencias para generar árboles alternativos?; ¿tendrían éstos árboles alternativos la misma topología (misma estructura de los nodos internos) y diferentes longitudes de ramas?; o bien, ¿tendrían estos árboles alternativos diferentes topologías, indicando un esquema diferente de relaciones entre las secuencias?. Esa medida de confiabilidad puede ser obtenida a través del análisis de bootstrapping.

En un análisis de bootstrap, se crea un nuevo alineamiento múltiple de secuencias, a partir del alineamiento original, mediante el rearrreglo de columnas completas del alineamiento múltiple de secuencias. Ésto mantiene el alineamiento original, pero ofrece un orden diferente de columnas a ser considerado para los programas generadores de árboles filogenéticos. Hay muchas formas de generar estos nuevos alineamientos, aunque usualmente el nuevo alineamiento tiene el mismo número de columnas que el original, es decir, las secuencias mantienen el mismo número de columnas que el original (aunque hay opciones que consideran que el nuevo alineamiento tenga sólo la mitad de la longitud

del original). En la práctica, el proceso de bootstrapping es repetido muchas veces (v.gr.: 1000 veces) generando el nuevo alineamiento múltiple de secuencias vía un generador de números aleatorios, para posteriormente comparar todos los árboles generados, unos con otros. Se calcula después cuántas veces, del total de alineamientos replicados, cada uno de los nodos internos del alineamiento original se presenta (se repite) en los nuevos árboles y se presentan estos números como valores bootstrap. Así por ejemplo, si un nodo interno apareció 238 veces en los árboles generados por bootstrapping, tendrá entonces un valor de 238 (o bien, como un valor de proporción de 0.238, si se replicó 1000 veces) y si un nodo interno apareció 998 veces, tendría un valor de bootstrap de 998. De este ejemplo, se podría concluir que el nodo con el valor de bootstrap de 998 fue un nodo interno robusto y confiable, mientras que el nodo de valor 238 resultaría altamente cuestionable. La mayoría de los autores aceptan valores de bootstrap superiores a 500/1000, aunque hay quienes los prefieren superiores a 0.700.

Mientras bootstrapping aplica el re-muestreo *con reemplazo*, existe otra técnica alternativa para evaluar también robustez, llamada Jack-knife, que aplica el re-muestreo *sín reemplazo*, pero la primera técnica es la más popularmente empleada en la actualidad.

En esta investigación, se optó por que los datos fueron replicados 1000 veces mediante la modalidad "bootstrapping" para considerar la robustez de los nodos internos. Posterior a ello, se realizó el análisis de ML y la posterior generación de los mil árboles correspondientes para cada alineamiento de genes mitocondriales obtenido y sus respectivos árboles consenso, obtenidos por la regla de mayoría. La edición final de los árboles filogenéticos obtenidos se hizo mediante el programa TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de DNA Mitocondrial

La extracción de DNA mitocondrial a partir de tejido fresco de camarón realizada mediante el método de Carr y Griffith (1987) de centrifugaciones diferenciales, incluyendo un paso de "salting-out" (Aljanabi y Martínez, 1997) y modificada en acuerdo con Padilla-Sánchez (1999), fue exitosa, obteniéndose un mtDNA de alta calidad, no degradado y en cantidad suficiente (evaluadas por espectrofotometría la cantidad: A_{260} y la pureza: $A_{260/280}$) (Figura 3, Panel A) para los protocolos subsecuentes de amplificación por PCR y caracterización mediante enzimas de restricción. Si bien es cierto que el producto obtenido no es totalmente puro, por incluir también DNA genómico, además de mtDNA, es un método rápido, efectivo y barato, ya que no requiere costosos equipos, ni largos protocolos de ultracentrifugación (Carr y Griffith, 1987), con el único inconveniente que pudiese producir amplificación de pseudogenes mitocondriales (Williams y Knowlton, 2001) cuando se le utiliza como templado en reacciones de PCR. Existen también otros métodos no convencionales para el aislamiento de mtDNA, que excluyen la ultracentrifugación y producen también DNA mitocondrial de excelente calidad (Palva y Palva, 1993), incluso algunos de ellos probados exitosamente en otros crustáceos (Grandjean y Souty-Grosset, 1996).

Los problemas inherentes a la obtención, traslado y mantenimiento de organismos vivos, condujo a la búsqueda de un método alternativo de obtención de mtDNA, que no requiriera tejido fresco y sin menoscabo en la calidad y cantidad del material genético a obtenerse. Así, en acuerdo a lo propuesto por Palumbi y Benzie (1991) y Padilla-Sánchez (1999) se ensayó la extracción de mtDNA a partir de pleópodos conservados en etanol al 90%, no habiéndose encontrado diferencia significativa entre ambos tratamientos (Figura 3, Panel B), por lo cual se estandarizó la técnica de extracción a partir de estos tejidos preservados en etanol.

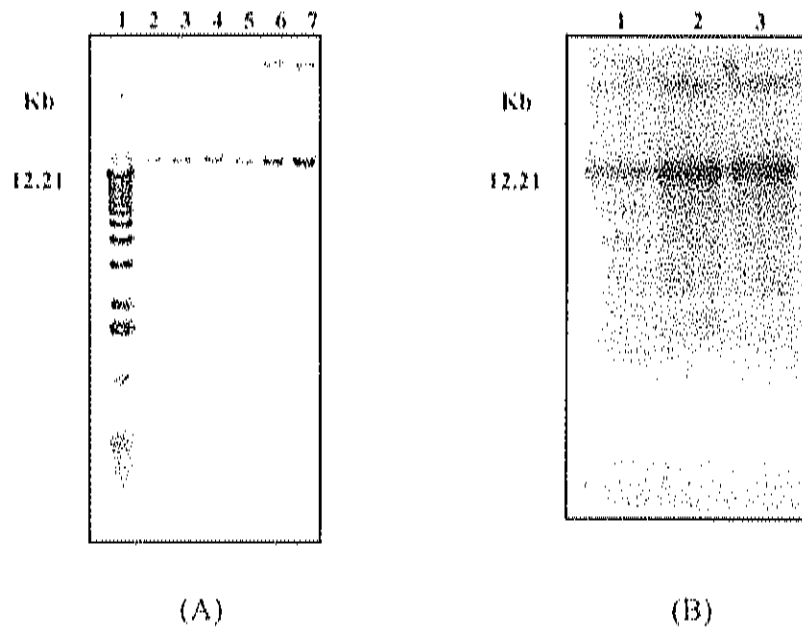


Figura 3. Aislamientos de mtDNA de *Penaeus* spp. **Panel A:** Aislamientos individuales de DNA mitocondrial de camarón blanco *Penaeus vannamei* (carriles 2 al 7). En el carril 1 se muestra el estándar de peso molecular 1 Kb ladder. **Panel B:** Comparación del método de extracción de mtDNA de camarón azul *Penaeus stylirostris* usando pleópodos frescos (carril 2) y preservados en etanol al 90% (carril3). En el carril 1 se muestra el estándar de peso molecular 1 Kb Ladder.

El aislamiento de DNA genómico resultó igualmente excelente en cantidad y calidad (Figura 4). Esta opción fue adecuada para obtener DNA templado para reacciones de PCR, cuando el mtDNA resultó inadecuado para ello, por la posible presencia de químicos o moléculas inhibidoras de PCR, específicamente de la acción de la DNA polimerasa. El DNA genómico resultó también excelente como templado para la amplificación por PCR del genoma mitocondrial completo (Hwang *et al.*, 2001) de camarón, como se presenta más adelante.

Amplificación de Genes Mitocondriales

Para lograr la amplificación de los genes ribosomales, NADH1 y región control mitocondriales, se diseñaron primers específicos con base en secuencias de artrópodos depositadas en bases de genes (GenBank) y posteriormente con base en secuencias generadas en nuestro propio laboratorio (Tabla III). Las parejas de primers utilizadas en PCR fueron: ND1F-16Sr, 16Sf-12Sr1, 12Sf-12Sr2, 12Sf1.5-CTRLr, CTRLf-tRNA^{Met}r, obteniéndose amplicones de 900, 1400, 650, 1100 y 700 bp, respectivamente, en las tres especies de camarón estudiadas. No obstante, al clonar y secuenciar estos productos, y la posterior eliminación de secuencias correspondientes al vector de clonación y oligonucleótidos empleados, pudieron corregirse y conocerse con precisión los tamaños obtenidos (Tabla V). Los tamaños de los fragmentos homólogos en otros artrópodos seleccionados: el camarón asiático *Penaeus monodon* (Wilson *et al.*, 2000), el cangrejo ermitaño *Pagurus longicarpus* (Hickerson y Cunningham, 2000), la langosta espinosa japonesa *Panulirus japonicus* (Yamauchi, Miya y Nishida, 2002), los branquiópodos cladóceros camarón salino *Artemia franciscana* (Valverde *et al.*, 1994) y pulga de agua *Daphnia pulex* (Crease, 1999), el copépodo *Tigriopus japonicus* (Machida *et al.*, 2002), los insectos mosca *Drosophila yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985) y mosquito *Anopheles gambiae* (Beard, Hamm y Collins, 1993), y el quelicerado *Limulus*

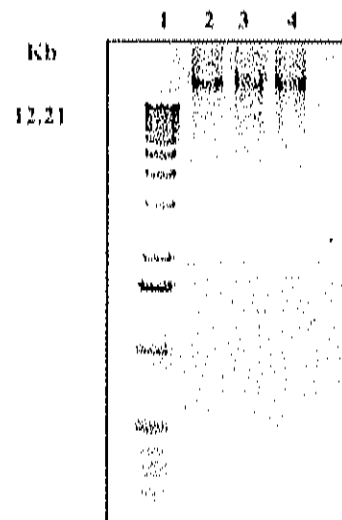


Figura 4. Aislamiento de DNA genómico de camarón café *Penaeus californiensis* (carriles 2 al 4). En el carril 1 se muestra el estándar de peso molecular 1 Kb Ladder.

Tabla V. Fragmentos de mtDNA de *Penaeus* spp. amplificados por PCR. Se presentan sus tamaños estimados y observados de las especies de camarón café *Penaeus californiensis*, azul *P. stylirostris* y blanco *P. vannamei*.

Fragmento Amplificado por PCR	Tamaño Estimado en Gel (incluye primers) (bp)	Tamaño Observado Promedio (3 spp.) de la Secuencia Depurada (sin vector y sin oligonucleótidos) (bp)
ND1f-16Sr	900	844
16Sf-12Sr1	1400	1385
12Sf-12Sr2	650	592
12Sf1,5-CTRLf	1100	1026
CTRLf-tRNA ^{Met} f	700	611

polyphemus (Lavrov, Boore y Brown, 2000), fueron semejantes, a excepción de la región control, que resultó ser muy variable en su tamaño, posiblemente debido a sus VNTRs – por sus siglas en inglés: “Variable Number of Tandem Repeats”- (Lunt, Whipple y Hyman, 1998).

Los productos amplificados por PCR no fueron siempre únicos, presentando en ocasiones bandas adicionales inespecíficas, por lo general de bajo peso molecular, por lo cual hubo de recurrirse a técnicas auxiliares como “hot-start” y “touchdown” PCR (Don *et al.*, 1991) e incrementos sustanciales en las temperaturas de alineación, hasta lograr amplificaciones primer-específicas.

En la Figura 5 se muestran los amplicones de aproximadamente 900 bp, obtenidos con el par de oligonucleótidos ND1f-16Sr para las tres especies de *Penaeus*. En el panel C de esta figura puede apreciarse la consistente amplificación de dos bandas en el caso de camarón azul *P. stylirostris*, pero por la homología esperada de este gen dentro de los tres penéidos se consideró que el fragmento correcto era el mayor (equivalente también a 900 bp), lo cual fue posteriormente confirmado con la clonación y secuenciación del mismo.

El fragmento 16Sf-12Sr fue consistentemente amplificado por PCR en las tres especies investigadas y resultó ser de aproximadamente 1400 bp (Figura 6, Panel A), aunque su secuenciación mostró un tamaño corregido de 1379 ± 1 bp (excluyendo las secuencias de los primers), fragmento mayor al correspondiente de *Drosophila yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985) de 1304 bp y de otros crustáceos reportados, como el fragmento homólogo de 1182 bp de *Artemia franciscana* (Valverde *et al.*, 1994), el de 1322 bp de *Daphnia pulex* (Crease, 1999) y equivalente al fragmento reportado para *Penaeus monodon* (Wilson *et al.*, 2000) [(ver Tabla I, del Apéndice I (Gutiérrez-Millán

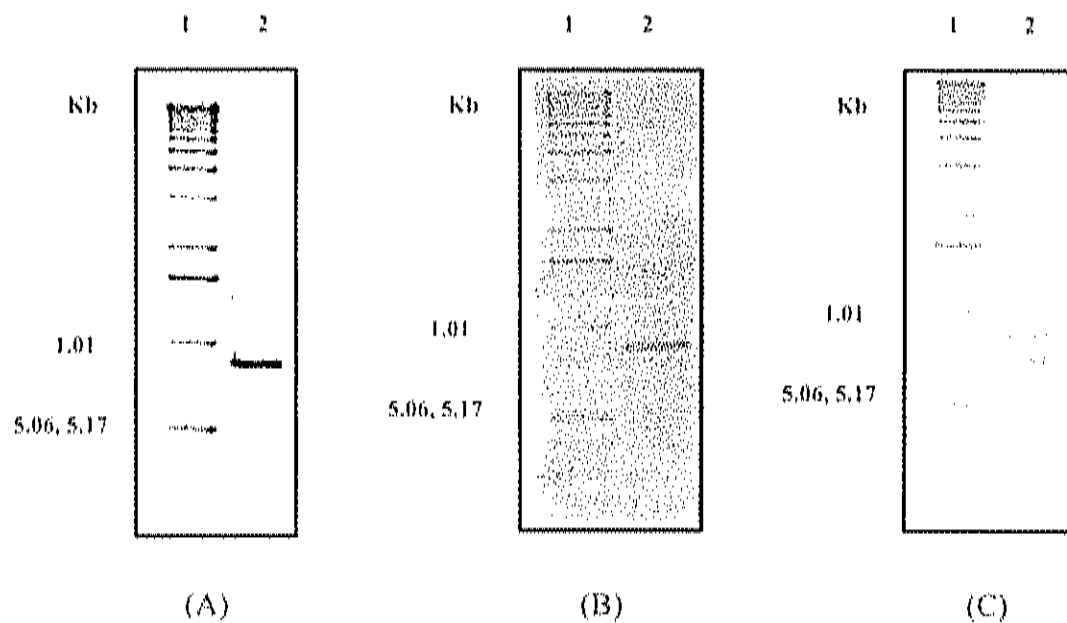


Figura 5. Amplificación por PCR del fragmento ND1F-16SR mtDNA de *Penaeus* spp. **Panel A**, carril 2: Camarón blanco *Penaeus vannamei*; **Panel B**, carril 2: Camarón café *P. californiensis*; **Panel C**, carril 2: Camarón azul *P. stylirostris*. En el carril 1 de los tres páneces se muestra el estándar de peso molecular 1 Kb ladder Plus.

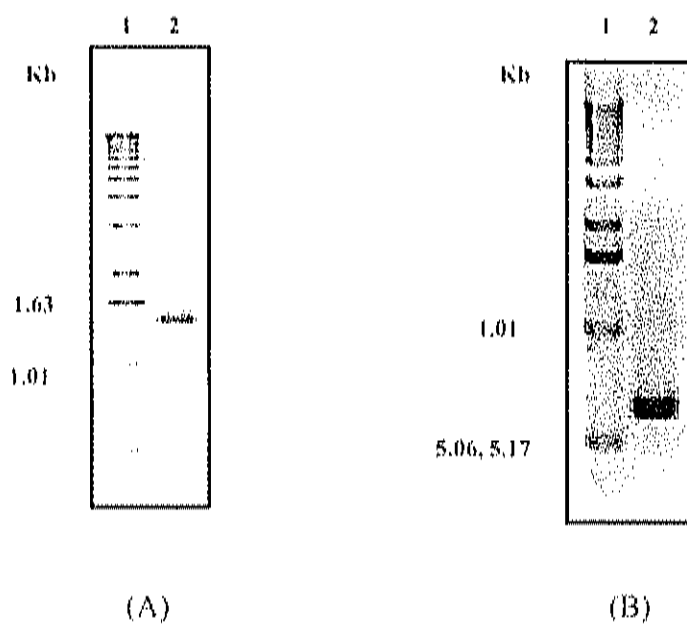


Figura 6. Amplificación por PCR de los fragmentos génicos ribosomales mitocondriales de *Penaeus* spp. **Panel A**, carril 2: Fragmento 16SF-12SR mtDNA de camarón azul *Penaeus stylirostris*; **Panel B**, carril 2: Fragmento 12SF-12SR2 mtDNA de camarón blanco *P. vannamei*. En el carril 1 de ambos paneles se muestra el estándar de peso molecular 1 Kb ladder Plus.

et al., 2002a)]. Es posible que el tamaño original de este fragmento en artrópodos haya sido semejante al de *D. yakuba* y que por procesos de inserción se haya incrementado hasta el tamaño actual observado en los peneidos.

Al igual que el fragmento de DNA mitocondrial 16Sf-12Sr, el segmento 12Sf-12Sr2 siempre amplificó de manera consistente, tanto en tamaño, como en robustez de las bandas obtenidas, en las tres especies de camarón (Figura 6, Panel B). Su tamaño estimado fue de 650 pares de bases, mientras que su tamaño corregido resultó ser de 592 bp (excluyendo la secuencia de los primers) (Tabla V). Por su tamaño, conservación en regiones adyacentes (secuencia origen de primers conservados) y facilidad, consistencia y calidad en su amplificación, este segmento ha sido propuesto como un potencial marcador molecular para la identificación y/o autenticación de especies de camarón, observación deducida con base en el análisis de restricción de este fragmento de mtDNA (PCR-RFLP) [Apéndice 2 (Gutiérrez-Millán *et al.*, 2002b)].

La región control mitocondrial hubo de ser dividida en dos segmentos para su amplificación por PCR, apoyándose el diseño de primers en la conservación de las secuencias adyacentes del gen *12SrRNA* y del *tRNA^{Met}*, así como en una pequeña porción conservada central del propio D-loop. Así, se obtuvieron dos amplicones correspondientes a las parejas de oligonucleótidos 12Sf1.5-CTRLr y CTRLf- *tRNA^{Met}*r, de aproximadamente 1100 y 700 bp, respectivamente, amplificados exitosamente en camarón café *Penaeus californiensis* (Figura 7, Panel A) y camarón azul *P. stylirostris* (Figura 7, Paneles B y C), pero no así en camarón blanco *P. vannamei*, en donde tenuemente pudo obtenerse solamente el fragmento CTRLf- *tRNA^{Met}*r a partir de DNA genómico (Figura 8) y escasamente visible en raras ocasiones el segmento 12Sf1.5-CTRLr de tamaño esperado. Posiblemente esto se haya debido a un remanente excesivo de carbohidratos en los aislamientos de DNA que pudieran inhibir la acción de la DNA polimerasa (Aubert y Lightner, 2000).

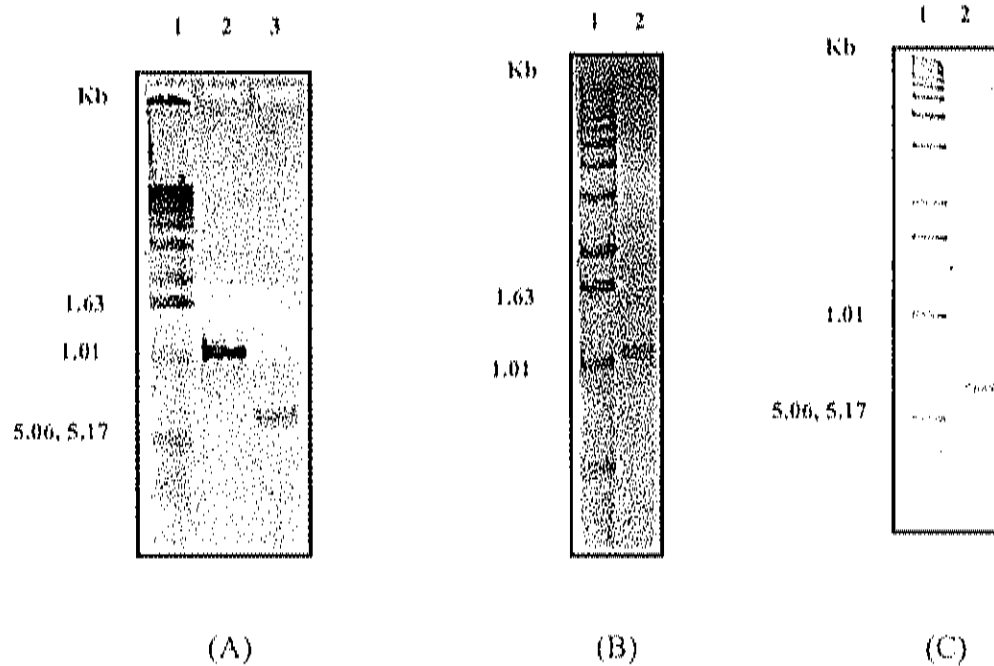


Figura 7. Amplificación por PCR de la región control mitocondrial de *Penaeus* spp. **Panel A:** Fragmentos 12SF1.5-CTRLR (carril 2) y CTRLF-tRNAMetR (carril 5) de camarón café *Penaeus californiensis*. **Panel B:** Fragmento 2SF1.5-CTRLR de camarón azul *P. stylirostris* (carril 2). **Panel C:** Fragmento CTRLF-tRNAMetR de camarón azul *P. stylirostris* (carril 2). En el carril 1 de los tres paneles se muestra el estándar de peso molecular 1 Kb ladder.

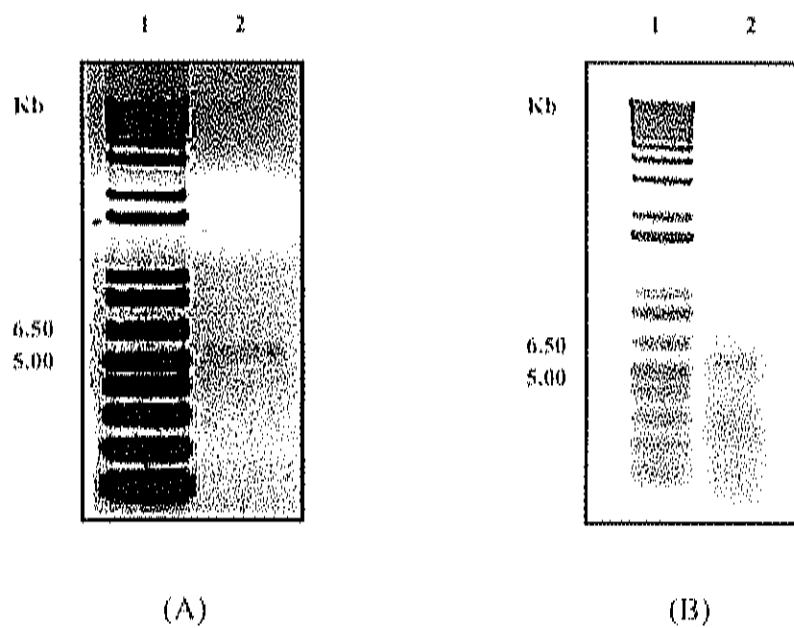


Figura 8. Amplificación por PCR del fragmento CTRLF-*uRNAMetR* del D-loop mitocondrial de camarón blanco *Penaeus vannamei*. En el carril 1 de ambos paneles se muestra el estándar de peso molecular 1 Kb ladder Plus.

Pseudogenes y/o Heteroplasma

En algunas muestras amplificadas por PCR se observaron dos bandas de pesos moleculares muy cercanos –fenómeno especialmente frecuente en el segmento 16Sf-12Sr mitocondrial de *P. vannamei*- por lo cual se pensó en un inicio que pudiera tratarse de un artefacto de la técnica de PCR, por lo cual se incrementó la astringencia –hasta en 5 °C adicionales a los 55 °C del programa original- de la PCR para evitar este problema. Sin embargo, el fenómeno se siguió presentando consistentemente, por lo que se pensó en una posible explicación alternativa: quizás fuese posible que la muestra de DNA haya provenido de material genético agrupado (más de un individuo por muestra de mtDNA), lo cual sería indicativo simplemente de polimorfismo poblacional (Figura 9, Panel A). Para eliminar esta sospecha, se repitieron las extracciones teniendo excesivo cuidado de obtener aislados individuales no contaminados de mtDNA de otros individuos y, sin embargo, el fenómeno siguió apareciendo con frecuencia (Figura 9, Panel B).

Las otras dos explicaciones plausibles pudiesen ser: heteroplasma o pseudogenes. A pesar de ser aceptado en general que el DNA mitocondrial no presenta recombinación y que es heredado uniparentalmente (vía materna) (Brown, George y Wilson, 1979; Harrison, 1989; Birky, 1995), existen evidencias en sistemas naturales (Saville, Kohli y Anderson, 1998) y experimentales de que este fenómeno sucede con relativa frecuencia, en el cual se da un ligero “derrame” de material genético paterno durante la reproducción sexual de organismos eucarióticos (Saville, Kohli y Anderson, 1998; Stepien, Hubers y Skidmore, 1999). Así, esto podría evidenciarse en una corrida electroforética como bandas diferentes (aunque de tamaño muy semejante), como reflejo de dos tipos de mtDNA en un mismo individuo (heteroplasma). Otra hipótesis viable para la explicación de este fenómeno observado, pudiese ser la amplificación de pseudogenes presentes en el DNA genómico. Debe recordarse que la extracción de mtDNA incluye también DNA nuclear, que aunque está presente en una mínima proporción (1-5%), resulta suficiente para servir también de templado en la reacción de PCR.

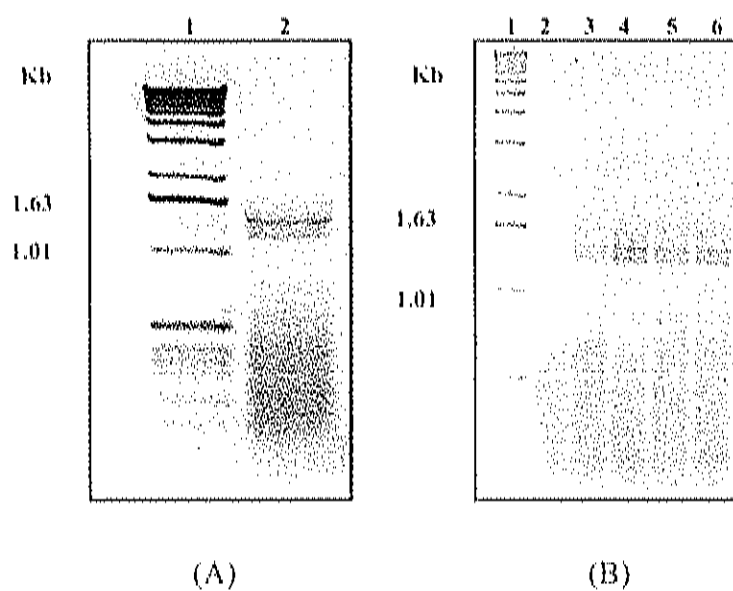


Figura 9. Pseudogenes/Heteroplasma en genes ribosomales de *Penaeus* spp. Duplicación de bandas amplificadas por PCR del fragmento 16SF-12SR mtDNA de camarón blanco *Penaeus vannamei* en muestras agrupadas (**Panel A**, carril 2) e individuales (**Panel B**, carriles 2 al 6). En los carriles 1 de ambos paneles se presenta el estándar de peso molecular 1 Kb ladder.

Los pseudogenes son componentes inactivos pero estables del genoma, derivados por mutación de un gen activo ancestral (Lewín, 1997), es decir, son "copias" truncadas y/o modificadas no funcionales de genes activos, que se han mantenido en el genoma a lo largo del procesos evolutivo. Es posible que estos pseudogenes tengan relación con uno de los modelos que explica la reducción de la capacidad codificante de los genomas mitocondriales (de las aproximadamente 1600 proteínas que había en el ancestro mitocondrial de vida libre).

Uno de los modelos que explica esta reducción codificante es el modelo reductivo, que afirma que se han perdido secuencias codificantes no esenciales (Berg y Kurland, 2000). Por ejemplo, la mitocondria importa, más que sintetizar, sustratos tales como aminoácidos, nucleósidos y piruvato (Gray, 1992). Por lo tanto, es posible que los genes codificantes para las enzimas participantes de estas rutas biosintéticas hayan sido eliminados del genoma mitocondrial mediante mutaciones aleatorias. El segundo modelo de pérdida genética, involucra la transferencia de genes desde el genoma mitocondrial hasta el genoma nuclear (Berg y Kurland, 2000), incluyendo muchos de los genes actualmente activos en la mitocondria, los cuales pudieron haber caído en desuso a través del curso evolutivo, hasta convertirse en lo que hoy conocemos como pseudogenes mitocondriales, como en el caso del gen citocromo oxidasa I, COI) del camarón *Alpheus* (Williams y Knowlton, 2001) y la presente investigación pudiera ser un segundo informe en otra especie de camarón, a reserva de su posterior comprobación mediante clonación y secuenciación de los posibles pseudogenes.

Amplificación del Genoma Mitocondrial Completo de *Penaeus*

Una estrategia para obtener los genes de mtDNA camarón fue la amplificación completa por PCR de este genoma plásmico, su posterior purificación y restricción mediante endonucleasas y finalmente la clonación de todos los fragmentos amplificados

("shotgun"). Para lograr esto, se diseñaron primers específicos al gen *16SrRNA* mitocondrial con base en la secuencia generada en nuestro laboratorio [Apéndice 1 (Gutiérrez-Millán *et al.*, 2002a)]. Estos oligonucleótidos debieron de tener las características básicas de cualquier par de primers para PCR, especialmente en cuanto temperaturas semejantes de alineación y evitar la potencial formación de "hairpins" (estructura secundaria) o primers-dimers (Janis *et al.*, 1990; Singh y Kumar, 2001), además de un diseño especial (Tabla IV) que permitiese las altas temperaturas de alineación requeridas por este protocolo. En todas las amplificaciones por PCR del genoma mitocondrial completo de camarón se usó exitosamente el mtDNA como templado.

Los resultados logrados con las cuatro diferentes combinaciones de primers se muestran en la Figura 10 (Panel A). En todos los casos apareció la banda deseada de alto peso molecular, cercana a los 16,000 bp, con abundancia de DNA, además de una banda adicional de menor peso y menor intensidad (¿pseudogenes o heteroplasmia?), la cual no pudo ser evitada con el incremento en la astringencia durante el protocolo de PCR. A pesar de que ha sido amplificado el genoma mitocondrial completo de otros artrópodos [*Macrobrachium nipponense* (Crustacea), *Anopheles sinensis* (Insecta), *Lithobius forficatus* y *Megaphylum* sp. (Myriapoda) y *Limulus polyphemus* (Chelicerata) (Hwang *et al.*, 2001)], no se han informado bandas adicionales en la electroforesis. Sin embargo, si se escinde la banda superior del gel y se purifica (Figura 10, Panel B) el resultado obtenido es semejante en calidad y cantidad a lo obtenido por estos autores.

Si bien la amplificación por PCR de todo el genoma mitocondrial se logró para los tres crustáceos sujetos a investigación (Figura 10, Panel B), los cuatro pares de primers empleados no fueron igualmente efectivos en la intensidad de las bandas logradas, habiéndose obtenido mejores resultados con la pareja LE7plus-LE5minus, por lo cual todas las amplificaciones subsecuentes se realizaron con estos primers en las tres especies.

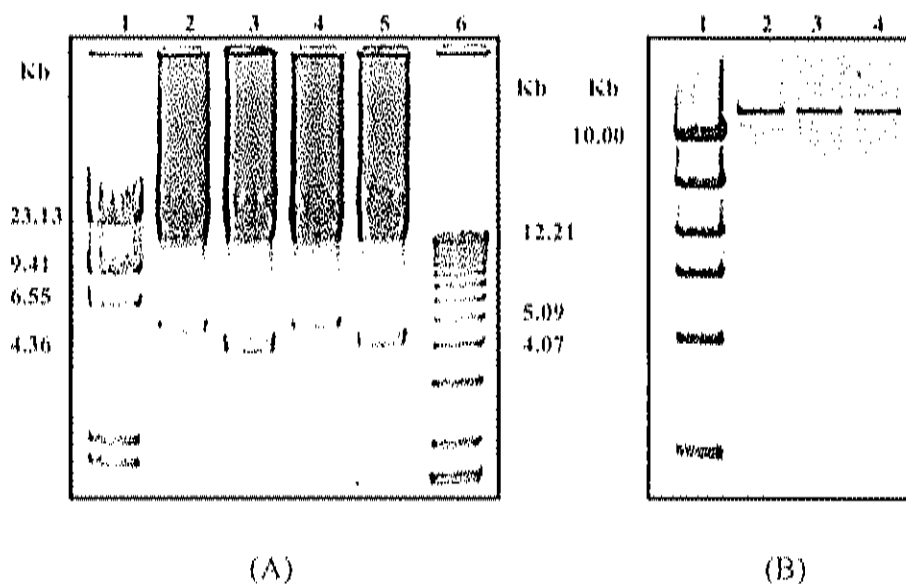


Figura 10. Amplificación por PCR del genoma mitocondrial completo de *Penaeus* spp. **Panel A.** Amplificaciones de mtDNA de camarón blanco *P. vannamei* con los primers LE1Minus-LE7Plus (carril 2), LE1Minus-LE8Plus (carril 3), LE5Minus-LE7Plus (carril 4) y LE5Minus-LE8Plus (carril 5). En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular λ /HindIII, mientras que en el carril 6 se presenta el estándar de peso molecular 1 Kb ladder. **Panel B.** Genomas mitocondriales completos -amplificados con los primers LE5Minus-LE7Plus- purificados por GeneClean de los camarones café *P. californiensis* (carril 2), blanco *P. vannamei* (carril 3) y azul *P. stylirostris* (carril 4). En el carril 1 se muestra el estándar de peso molecular High Mass ladder.

Los resultados de la digestión enzimática con *Hind* III de los tres genomas mitocondriales obtenidos (Figura 11), muestran un patrón característico especie-específico, lo cual constituye una "huella genética" de especies de camarón, fácil de obtener e interpretar y muy confiable en sus resultados, por lo que se ha propuesto esta metodología como una alternativa apropiada para autenticación e identificación de especies de camarón, especialmente si se cuenta con tejidos frescos o preservados en etanol, que permitan la obtención de moléculas íntegras de DNA mitocondrial [Apéndice 2 (Gutiérrez-Millán *et al.*, 2002b)]. Las sumas de los fragmentos obtenidos fueron: 12.9 Kb, 11.3 Kb y 16.2 Kb, para camarón café (*P. californiensis*), blanco (*P. vannamei*) y azul (*P. stylirostris*), respectivamente. La diferencia de tamaños con respecto al valor promedio esperado (aproximadamente 16 Kb) pudo deberse a que sólo se consideraron las bandas de mayor intensidad, ya que las bandas tenues pudieran representar productos intermedios de digestiones incompletas. Además, es posible que haya habido también fragmentos muy pequeños que no hayan sido vistos en el gel y no hayan sido, por lo tanto, cuantificados.

Al realizar el "shotgun" e intentar clonar los fragmentos obtenidos de la digestión con *Hind*III de los genomas mitocondriales completos de camarón, sólo se lograron clones con insertos menores a los 200 bp, por lo cual se decidió seguir por la estrategia de búsqueda específica de genes a través de PCR y la clonación individual de los fragmentos generados.

Clonación de Genes Mitocondriales

Los amplicones resultantes de PCR pueden ser analizados por PCR-RFLP para la identificación de organismos, autenticidad de especies o evaluación de variabilidad genética (polimorfismo) [Bouchon, Souty-Grosset y Raimond, 1994; Hrineevich y Foltz, 1996; Borgo *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 2000; Litjens, Lessinger y Azeredo-Espin, 2001; Apéndice 2 (Gutiérrez-Millán *et al.*, 2002b)], o bien pueden ser secuenciados

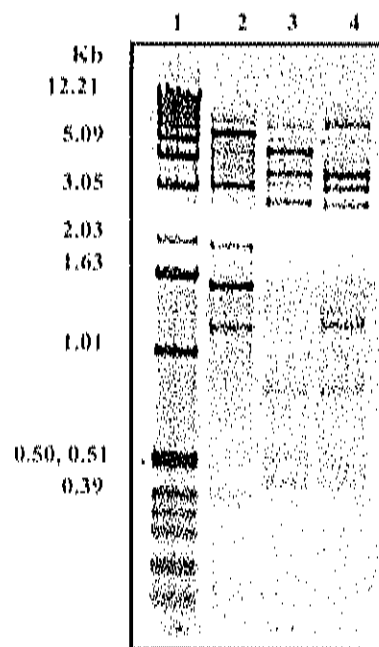


Figura 11. Huella genética de *Penaeus* spp. Digestión enzimática con *Hind*III de los genomas mitocondriales completos obtenidos por PCR de los camarones café *P. californiensis* (carril 2), blanco *P. vannamei* (carril 3) y azul *P. stylirostris* (carril 4). En el carril 1 se muestra el estándar de peso molecular 1 Kb ladder.

directamente (Hoelzel y Green, 1992) o llevados a clonación para su estabilización y posterior análisis [Stanton, Crease y Hebert, 1991; Hoelzel y Green, 1992; Weiner *et al.*, 1995; Apéndice 1 (Gutiérrez-Millán *et al.*, 2002a)].

Existen muchos métodos para clonar fragmentos derivados de PCR, pero en términos generales estos pueden ser divididos en aquellos que requieren la adición de bases extras (sitios de enzimas de restricción) a los primers de PCR y aquellos que no lo requieren (Weiner *et al.*, 1995). En la presente investigación se probaron las dos estrategias, intentando primero la clonación de fragmentos que contenían en los extremos sitios de restricción, agregados a las secuencias de los primers, mediante PCR y posteriormente el ensayo de nuevos primers sin la adición de estos sitios. Esta última estrategia, basada en el sistema de clonación TOPO TA® (Invitrogen), mediante el vector pCR 2.1 TOPO, fue finalmente adoptada para todos los experimentos siguientes, por su facilidad y alta eficiencia en el logro de clones recombinantes.

En la Figura 12, Panel A, puede apreciarse el resultado de la clonación del fragmento ND1f-16Sr, en la cual se muestra el inserto esperado, de aproximadamente 900 bp, liberado de su vector mediante la restricción con la enzima *EcoRI*. De igual forma, el Panel B de la misma figura muestra la clonación y screening mediante restricción con esta misma enzima, del fragmento mitocondrial 16Sf-12Sr de camarón azul, *P. stylirostris*, aunque se obtuvieron resultados semejantes para las otras dos especies de camarón estudiadas. Los clones de este fragmento se mantuvieron siempre estables y el inserto liberado mostró ser de aproximadamente 1400 bp. Este fragmento ha sido analizado a profundidad [Apéndices 1 y 3 (Gutiérrez-Millán *et al.*, 2002a; Yepiz-Plascencia, Gutiérrez-Millán y Villalpando Canchola, 2002)] y ha mostrado ser un excelente marcador molecular para diferenciación de especies, evaluación de variabilidad genética intra- y supra-específica e incluso en estudios evolutivos para estimar las relaciones filogenéticas entre taxa superiores. Por otro lado, la clonación del fragmento 12Sf-12Sr2 fue igualmente exitosa en las tres especies de camarón (Figura 12, Panel C), con clones recombinantes con un inserto de aproximadamente 650 bp.

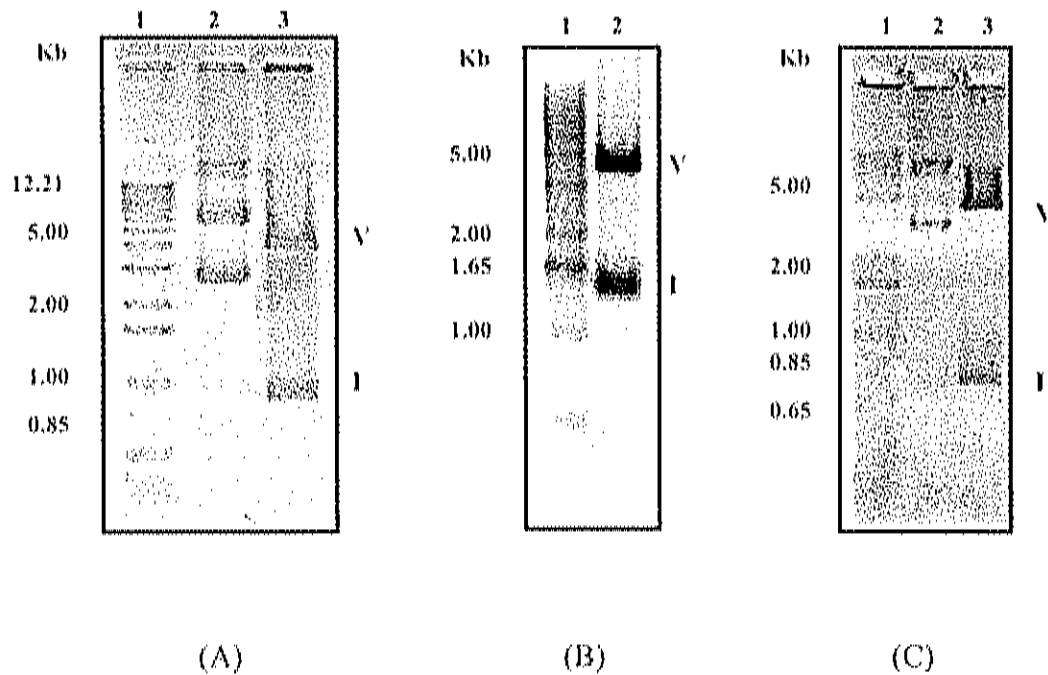


Figura 12. Clonación de genes mitocondriales de *Penaeus* spp. **Panel A.** Clonación del fragmento ND1F-16SR mtDNA de camarón café *Penaeus californiensis*, (Carril 3). El carril 2 muestra el DNA no-digerido. **Panel B.** Clonación del fragmento 16SF-12SR mtDNA de camarón azul *Penaeus stylirostris*, (Carriles 2). **Panel C.** Clonación del fragmento 12SF-12SR2 mtDNA de camarón café *P. californiensis* (carril 3). El carril 2 muestra el DNA no-digerido. En el carril 1 de los tres paneles se presenta el estándar de peso molecular 1 Kb ladder Plus. En todos los casos el screening de recombinantes se realizó mediante digestión enzimática con *EcoRI*. V = Vector, I = Inserto.

La clonación de la región D-loop mitocondrial se hizo considerando los dos amplicones obtenidos (12Sf1.5-CTRLr y CTRLf-tRNA^{Met}r), cuyos resultados exitosos para camarón café *Penaeus californiensis* y azul *P. stylirostris* se presentan en la Figura 13. No obstante, la región control de camarón blanco *P. vannamei* no pudo ser clonada por no poderse tener los amplicones obtenidos en cantidad y calidad suficientes para el protocolo de clonación, a pesar de repetidos intentos de re-amplificación y nuevas extracciones de mtDNA y DNA genómico que pudiesen servir como material templado para las reacciones de PCR.

Secuenciación y Análisis de Genes Mitocondriales

Los fragmentos de mtDNA clonados exitosamente fueron secuenciados en ambas cadenas, en algunas ocasiones repitiendo el proceso de secuenciación para eliminar ambigüedades y a veces secuenciando clones diferentes para la misma región. Esta estrategia de secuenciación se presenta resumida en las Figuras 14 y 15, para camarón café *P. californiensis* y camarón azul *P. stylirostris*, respectivamente, en las cuales puede observarse que para ambas especies se secuenciaron un total de 18 clones para cada una de ellas, variando sólo en ocasiones en la extensión de la secuencia “confiable” (sin N’s) obtenida. En el caso de camarón blanco *P. vannamei* sólo se obtuvieron 11 clones positivos (Figura 16), quedando excluida la región control mitocondrial. Las secuencias totales consenso obtenidas (5’-3’) para las tres especies se muestran en las Figuras 17, 18 y 19, para los camarones café *P. californiensis*, azul *P. stylirostris* y blanco *P. vannamei*, respectivamente, en las cuales se puede apreciar que los totales de secuencia nucleotídica fueron de 4140, 4148 y 2716 bp, en el mismo orden anteriormente presentado.

Los fragmentos 16Sf-12Sr (1379 ± 1 bp) secuenciados en las tres especies de camarón *Penaeus californiensis*, *P. stylirostris* y *P. vannamei*, fueron depositadas en el

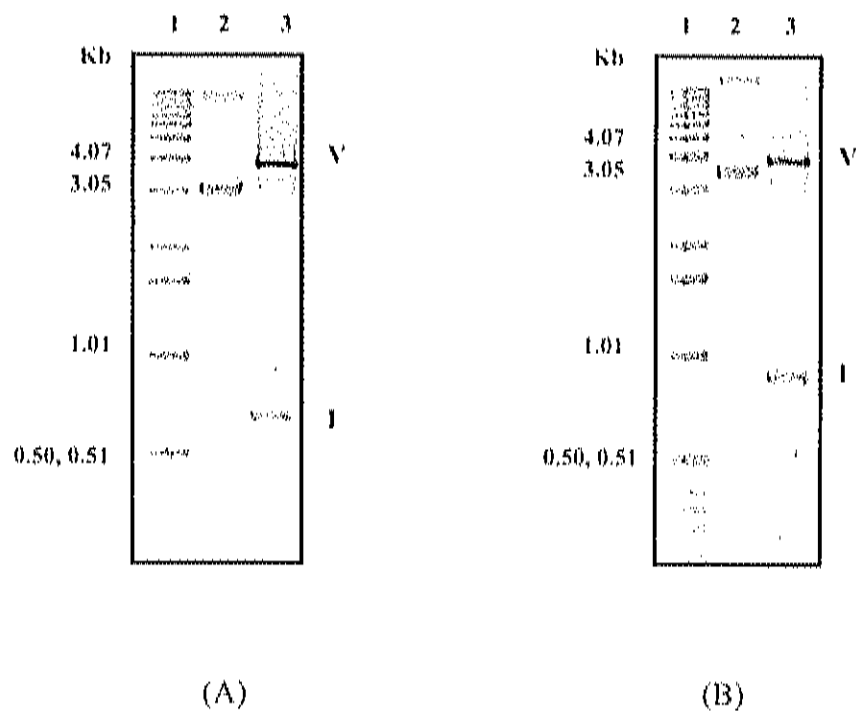


Figura 13. Clonación de la región control de mtDNA de *Penaeus* spp. **Panel A.** Clonación del fragmento 12SF1.5-CTRLR (carril 2) de camarón café *P. californiensis*. **Panel B.** Clonación del fragmento CTRLF-tRNAMetR (carril 2). En ambos paneles se presenta en el primer carril el estándar de peso molecular 1 Kb ladder y en el carril 2 DNA no-recombinante, V = Vector, I = Inserto.

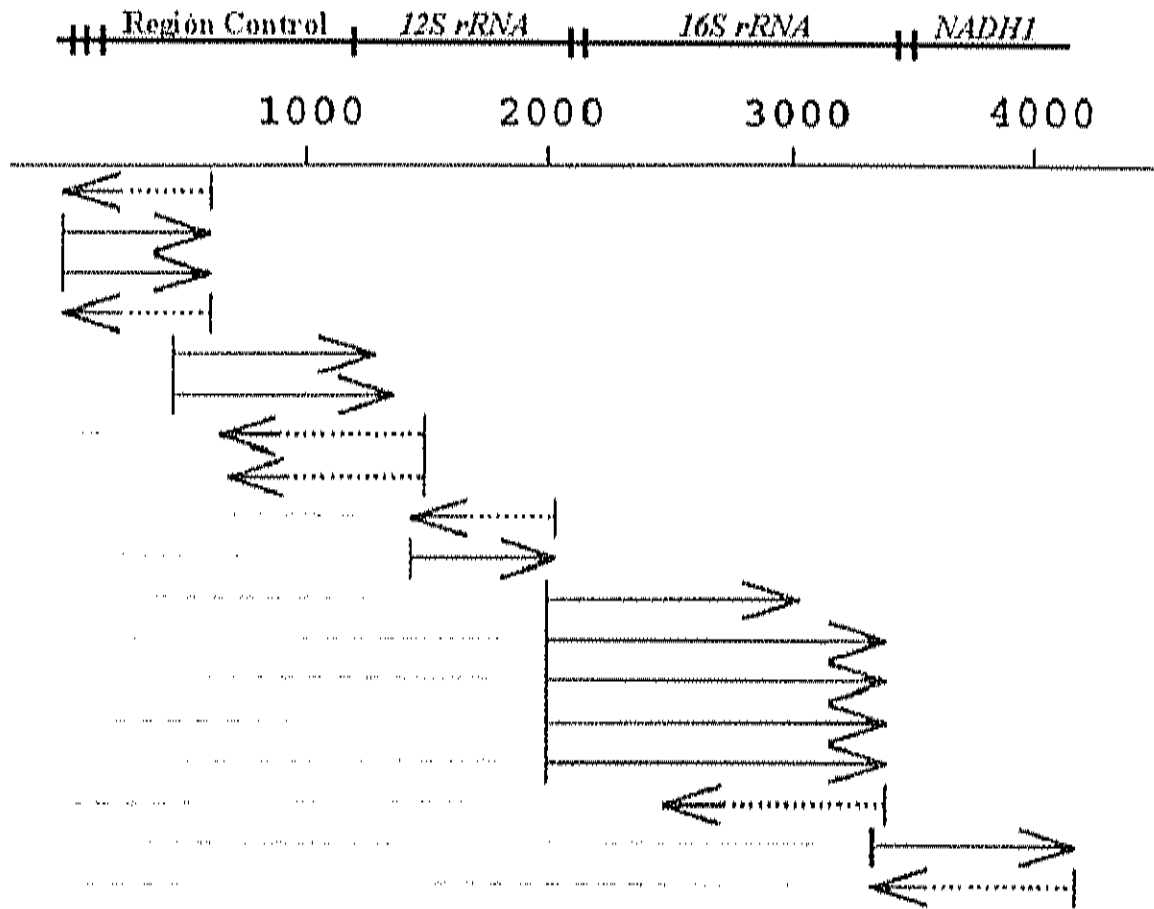


Figura 14. Estrategia de secuenciación de la porción ND1F-tRNA^{Met}R del genoma mitocondrial de camarón café *Penaeus californiensis*. Espacios cortos (aprox. 70 bp) entre dos barras verticales representan tRNAs.

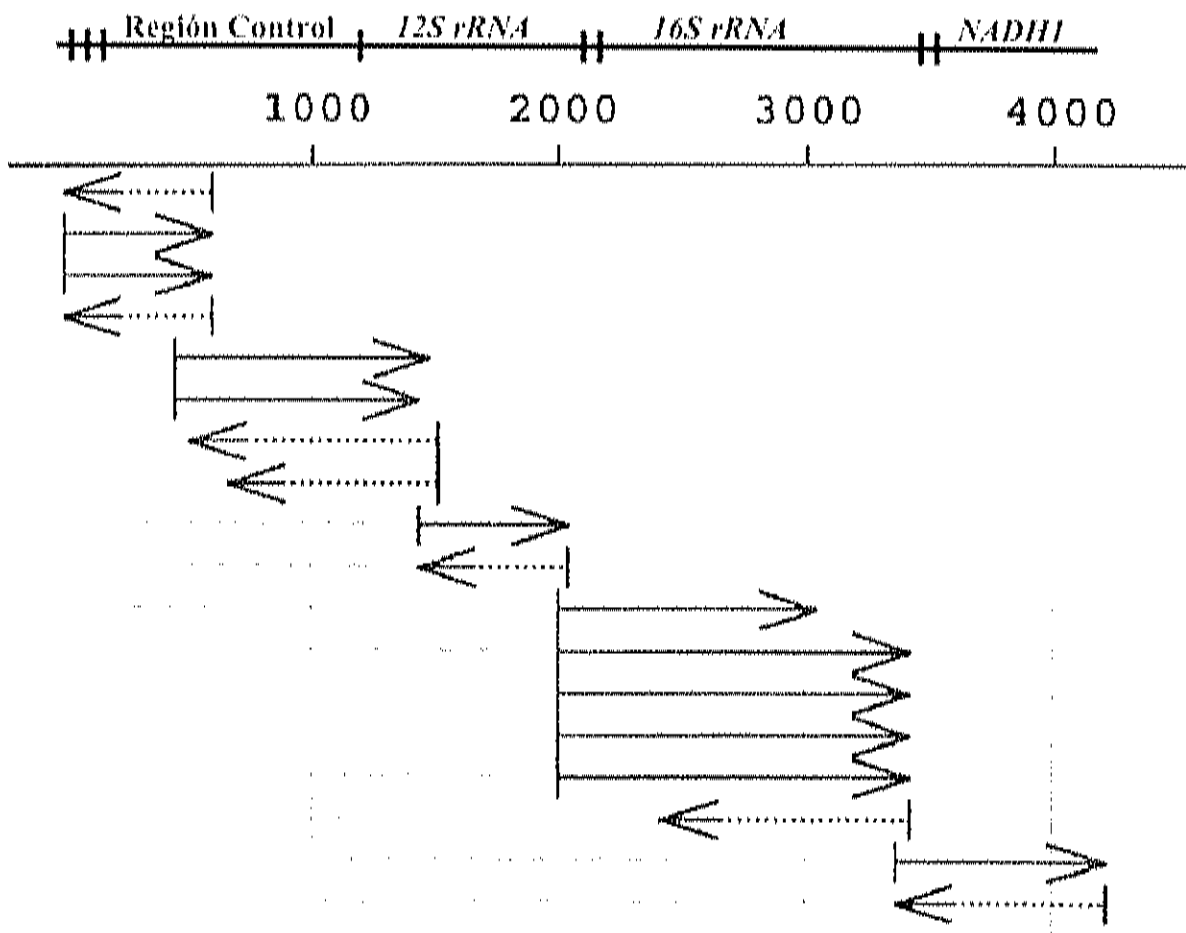


Figura 15. Estrategia de secuenciación de la porción ND1F-tRNA^{Met}R del genoma mitocondrial de camarón azul *Penaeus stylirostris*. Espacios cortos (aprox. 70 bp) entre dos barras verticales representan tRNAs.

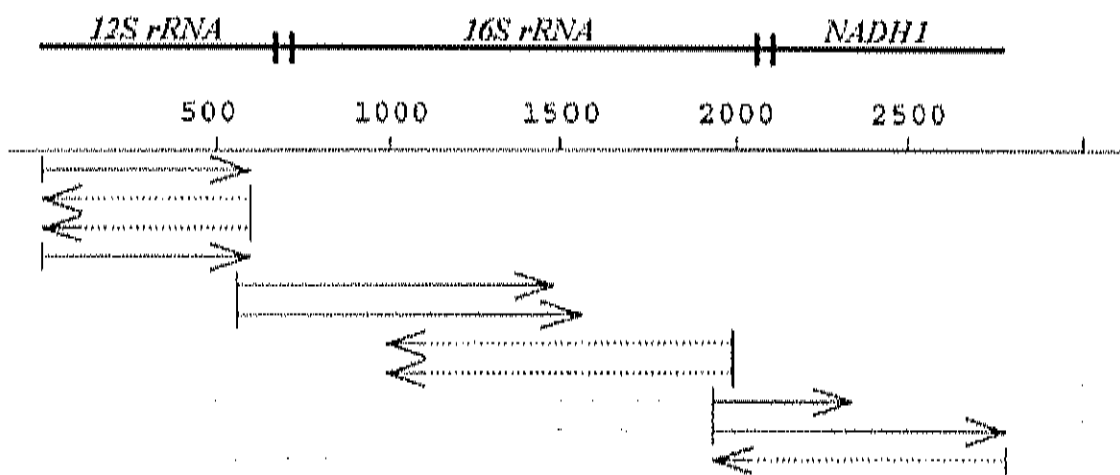


Figura 16. Estrategia de secuenciación de la porción ND1F-12SR del genoma mitocondrial de camarón blanco *Penaeus vannamei*. Espacios cortos (aprox. 70 bp) entre dos barras verticales representan rRNAs.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTAGCTTATC TTTTATATA TAAAAAAGGA TAAACTACTA AAAAAATATA CTCTGGTCTA TAGTGCACAC AAAGTTTGA

      90     100     110     120     130     140     150     160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCTTTGGGGG AATGGTGTG ATTCCATTGG GTCTAAAAAA AAAAGGGGGA AAAAATAATG AAGGTAAGGC TTTACTTACA

      170     180     190     200     210     220     230     240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGTTTACCC TATCAAGATA ATCCTTTTTC AGGCACCTCA TTTTATATAA AAGTAAAAAA TTAATCAAAA TAACAAAAAA

      250     260     270     280     290     300     310     320
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAATTTCTTT TATTGCACTA AATTGTGATT TGGTTCACCTG AAAAACTTA CAGGTTATTA AAAAAACAAG TAATTCGAAT

      330     340     350     360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TATTTATATT AAATTAATC TATGTAAGCT GAAATTAATT TTAATTTAT CTTTTAATT AAATAGATTA ATTTATTTT

      410     420     430     440     450     460     470     480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAAAGATCGG TATAAAAAAT AGTGTCTTCT TTTGTATGA AACTTAATC CTCTAGAATT TAAGTTTCGA AGAAGAAGAC

      490     500     510     520     530     540     550     560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCTATTTTAT TTAACAAAAA ATAATCTTAT TGAATATAA ATGGAACCTAG ATTTATTTAC TAGTCTTTT ATCAATATAT

      570     580     590     600     610     620     630     640
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GAAAAACAA TTAATTCAC ATAAATATTT ACACTATTTA TGTATAGATC AAAGAACATT CTTAACTAC GCCTACTAT

      650     660     670     680     690     700     710     720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TFACTTTAAA TATAATAGAT TTTGGTGAAT ATTAACATTA AATAAACATT TAAATTTCAI TCAGATAGAA TAATTCGTTA

      730     740     750     760     770     780     790     800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACCGCATTTA AATTAATATA TTATTAATG ACAGATATAT AAAGTCTTCT TAAAAATTAA TTGCTTCTAA ATATATATTT

      810     820     830     840     850     860     870     880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAAAAGAGCA ATCTATATCT TCTATATAAG TCATTTATTT ATACATGTTA ATAAATTAAT AACTTAAATA AAATGTATAT

      890     900     910     920     930     940     950     960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATACTGGCT GTTCTAAAAA AGAGTGGAGT GATTTTTTGA AAATTCCTCA TAAATAGAAG GTAGTAATAT AGAGTTTAAA

      970     980     990    1000    1010    1020    1030    1040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGTAAAGCTT GGCAAAATTC TAAAAAAAAA AAAACTAAAT TAACTTAAA GAATTATGGT ACTATATGTY TAGGATTTTA

    1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TACAAAAAAG GGCAAAACCG GGGGAGGAAA TAATTCCTAC TTTTCTTCT TATTAGTTTA TAAAAGGTAT ATCCTTTTTT

    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAGCAGTACG AAAATTCGTTA CATATTTTAT TATATTTAGG GTGTATAATT ATATAAAAAG TTTACATTAT AAAGGTTTTA

    1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCTAGCTTTS TCTTTTCATT TTTAGCTCAA TGGTACATGT AAATTTTGAT GGGCCAATAA GATTTATATA GGTGGGAAGG

```

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 OTATAGATTG TAAAGGAATC GGGTTCCGT TGAATAATGA ATTCTCAGTA CCTAGTACTA ATTATATAAA TGTAAAGTTAG

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AATTGATGAT CCTAATAATA TACCTGGCTA AAATTGTGTC CAGCCGCCGC GGTATACTCG AGAGGTCAAT TGAAGAAGAA

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TTGGTTAAAA ATAGTTAAAT GTCATAAAGT AATAAACTTT TAGGGGCTTG TACTGATAAA GGGTGAATTC GATTTTTTGG

1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TATACAAGGA ATTAAAGTTC TTAGTTTAAA TTGAAGCTAT TAAAAAAGG GAATGAAACA GGATTAGATA CCTGTGTACA

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 CTTTATATAA ATTATAAAT TACCTGGGTA TTAACAGGTT ATTTGCTTGA AACTCAAAGG ATTTGGCGGT AATTTAGTCT

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 ATTTAGAGGA ACCTGTCTCG TAATCGATAG TCCACGAGAA ATCTACTTCT ATCTTGTAGA AAACAGTTTG TATACCCTCA

1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TTATTAGATA ACTTTAATAA AATGTAAAGT TATTGAAAGA GTGTAGCTAA TATATTAGAT CAAGGTGCAG CTTATGGTAA

1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AGAAGAGAT GGGTTACAAT ATATTGAATA TAAACGGAGT AATAATTGAA TATTTGTTAT TGAAGGTGGA TTTAAAAAGTA

1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AGAAGATTT AATAAGATCT TTGACCTTA GCCCTAGATT ATGTACACAT GGGCCGTCCG TCTCGTTAAT TAAAGCGAGA

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TAACTCGTAA CATAGTAGGT GTACTGGAAA GTGTACCTAG AAATCAAGA CCGAGCTTGA ATAGTTAAGC ATCTCACTTA

2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 CGTTGAGAAG TCCGTTTTCG AAATCAATGC GTCTTGAAA TTAATCTTA TTAATTTAAT TAAATATAGT CGGTATCTTT

2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AAAAACTAAT AAAAAATTT TAAAAAGTAA TTAATTTAGT AGAATGAATC GAAAAAGAAA GTAAGAAGAG TTATAGTCTA

2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AAGTACTGTA AAGGAAGAT GAAATAAGTT GAAACTTAA TTAAGAAGAA GTAGAGTTAA AAACCTGTAC CTTGTGTATT

2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AGGAAAAATC AAATAACCT TATTAATAA AGTATTCCTG AAAAAAAGA GCTAATATAG TTGTAGACTT TTCTATTTAA

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TGAATTTGTA AAATCTATAT TAGTACTGAA ATGCTACTCG ATTTTTTATA TCTGGTGTCT GAGAAATTA ATTAATTTTA

2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TGTATCTTGA GGTGATATAA ACTTCAATAT AAAAAAGAGT AAAAAAGAAA AGCTTCTTAT TTTAATAATA GGTGAGTTAT

```

2570      2580      2590      2600      2610      2620      2630      2640
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AATAAAGGAA ATCAAAATAT TATTGAATTA GGCTTAAAAA CAGCCATATT ATTAAGCCGT TCTAGTTAAT GTAAAAATAGC

2650      2660      2670      2680      2690      2700      2710      2720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGAGTAATAT TTATATAATT GAAATTACC AGTAGTATCT AACCTTTTTA ATAAATATAA TATTAAGAGT AATACTGATT

2730      2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTATTAGTAG AAATAAAGTG TGATTGACCA AAAATGAAAT AGTAAAAAAG TTTTATAAG ATAAAAGATA TAATTAAGGA

2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870      2880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACTGGGCAAC CAATGCTTTT GCTGTATTAY CAAAAACATG TCTATATGAT TGTATATAA AGTCTGGCCT GCCCAGTAT

2890      2900      2910      2920      2930      2940      2950      2960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTAATTTAAA GGGCCGCGGT TACTGACCG TCGGGAGSTA GCATAATCAT TAGTCTTTTA ATGGAAGCCT TGTATGAATG

2970      2980      2990      3000      3010      3020      3030      3040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTTGGACAAA AAGCAAACTG TCTCAATTAT AATAATTGAA TTTAACTTTT AAGTGAAGAG GCTTAAATAA ATTAAGGGGA

3050      3060      3070      3080      3090      3100      3110      3120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGATAAGACC CTATAAAGCT TGACAATAAG TCGTTTATAT TATAAATTGT TAGTGTAACT TGATTTTAAA CCGTGTTTGT

3130      3140      3150      3160      3170      3180      3190      3200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TSCGTTGGGG CGACGGGAAT ATAAAAGSTA ACTGTCTTA TAATATTTAA TAACAGAAAT ATTTGGAAA TTAATGATCC

3210      3220      3230      3240      3250      3260      3270      3280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTTCTTAAAG ATCATAAGAT TAGTFACTT TAGGGATAAC AGCGTAATCT TCTTTGAGAG TCCATATCGA CAGGAAGGCT

3290      3300      3310      3320      3330      3340      3350      3360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGCACCTCG ATGTTGAATT AAGGTATCCT TATAATGCAG CAGTATAAAA GGAAGGTCTG TCGACCTTT AAATCCTTAC

3370      3380      3390      3400      3410      3420      3430      3440
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATGATTTGAG TTCAGACCGG CGTGAACCCAG GTCGGTTTCT ATCTCTTAAT TTTATAAAGG TTATCTTAGT ACCAAAGGAT

3450      3460      3470      3480      3490      3500      3510      3520
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAGATAGCTG GAATAGTCC TATTTGTAT GTATAAGTAT AATCGACTTG TTGCCTTGGC AGAGTTATGC ACTGGACTTA

3530      3540      3550      3560      3570      3580      3590      3600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGATCCATAA ATGTGGGTTT AACCCACAG GTAATACTGT GATAACATTA ATTATGTTG TTAATTATTT ATTAATTAAT

3610      3620      3630      3640      3650      3660      3670      3680
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATTGTGTCT TAGTGGAGT AGCTTTGTT ACAATATTGG AACGTAAAA TCTAGGTTAT ATTCAAATTC GTAAGGGACC

3690      3700      3710      3720      3730      3740      3750      3760
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAATAAAGTA GGATTTATGG GGTATTACA ACCATTCCCT GATGCGGTTA AGTTGTTTAC TAAAGAGCTA ACATTGCCAG

3770      3780      3790      3800      3810      3820      3830      3840
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTATGTCTAA TTTCCTCCTT TATTATTTAT CTCAGTTTTC TAGTTEATTC GTGTCTTTAA TTGYATGATT AGTTATGCC

```

```

      3850      3860      3870      3880      3890      3900      3910      3920
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TACGAGTTAG GGCTAATAAA CTTTAGTATG AGAAGTTTAT TCTTTTGTG TTTTACAAGT CTAGGGGTAT ACACAAGTAT

      3930      3940      3950      3960      3970      3980      3990      4000
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAAGACAGGA TGGGCTTCAA ATTCTAAATA TTCTTACTC GGAGTCTGC GGGCAGTAGC TCAAACTATT TCTTATGTAG

      4010      4020      4030      4040      4050      4060      4070      4080
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAAGATTAGC TTTAATTTTA CTGTCGCTCA TTTTTTACT GGGAGGATTT GATCTAAGAT TATTTAGTCT ATTCCAACGA

      4090      4100      4110      4120      4130      4140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GATGTGTGGT TACTATGATT TACTTTTCTT TGGGCTTAA TTTGATTTC TTCTTGTTA

```

Figura 17. Secuencia nucleotídica total ND1F-(rRNAMetR) mtDNA de camarón café *Penaeus californiensis*.


```

10      20      30      40      50      60      70      80
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTAGCTTATC TTTTATGAT AAAAAGAATA AACTATTATA AAGATATACT CTGGTGTAAA GCGCACACAA AGTTTGTATC

90      100     110     120     130     140     150     160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTTGGGGGAA TGGTGTGAT TCCATTGGGT ATAAAAAATA AGGGGGGGAT AATTAAATGA AGGTAAGGCT TTACTTACAT

170     180     190     200     210     220     230     240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTTTACCCTT ATCAAGATAA TCGTTTTTCA GGCACCTCAT TTTATGTTAA GAAATAAATA ATGTCTTAAA TAAAGACTAT

250     260     270     280     290     300     310     320
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AACCTTATTA CTCTGCATTA AATTGGGATA TGGGAGTTTA AAGACTTTTA GATTAAATGA AAAAAGAATA GAATAGCAAG

330     340     350     360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CTAATATATT AAATTAAGAAG TGTATAACCC AAGATTAAA TAAACCCTT TTAATAAATT AAATAGATTA ATTTTATTTT

410     420     430     440     450     460     470     480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAAAGATATG TATAAAAAAT AGTGTCTTCT TTTTGTATGA AACTTAAATC TGTAGAATT TAAGTTTGA AGAAGAAGAC

490     500     510     520     530     540     550     560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACTATTTTAT TTGATAAGAT ATACCCTTAT TGAATTACAA ATGGTCTTAS ATGTATACTC TAGTATTTT AFGCTTAAA

570     580     590     600     610     620     630     640
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAAATACAAA CATAAAAATC TATAAATATT TACACTATTT ATATAATGAT CAAAGAACAT TCTTAACTA CACTTCATAA

650     660     670     680     690     700     710     720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AATTCTTTAA ATATAATAGA TTTTAAAGCA TATTATTTT AAATAAACAT TTATAATTAA TATAGATAGA ATAAATGTTT

730     740     750     760     770     780     790     800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AACCACATTT AAATTAATAT ATAATTAAAT GACAGATATA TAAAGTCTTA TTAALACTTA ATTATTTCAA GGTATATAT

810     820     830     840     850     860     870     880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AATGTATAGC AATATATATC TACTATATAA TGTCATTTAG TTATAAAGT AAATAAATTT TTTACALATA ATTAGATATA

890     900     910     920     930     940     950     960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATATATTTAT GGGGTCTA ATAAAAAATT GAGGGATTTT TCGAAAAATC CTAAGTTATA TAGATGCAA TATATAAATA

970     980     990    1000    1010    1020    1030    1040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGCAATAAAT TGTTTAATTA CTTCTAAAAA TAAAGCTTGG CTTTACAGTA TATAAGTTAT AGTGTAAATC ATTATAAGTT

1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTATACAAAA AGGGGAAAAA AGAAAGGGG AATTAAATCT AAAAGTAGGT AAATCTAAAT TGATTTTAT TTTTGTAAAT

1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CTTAGATATA TCCAAAAATC TTTGCATAAA ATAAAAATA TTTGTTTTAT AAGTTAATAT TAAATGTTAT TTCAGAAAA

1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTTTATGCTT AGTTATCTT TTAATTTTA GGTCAATGGT ACATGTAAGT TTTGATGGG CAATAAGATT TATGCTAAT

```

```

1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350      1360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGAGGAGCAT AATATCTTG AAGTAGGGG TTCTAGTAAA TAATAAATTC TCAGTACCTA GTACTAATTA AATAAATGTA

1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430      1440
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGTTOGAATT GATGATCTTA ATTATATACC TGGCTAAAAA TTGTGCCAGC AGCCGCGGTT ATACTGAGAG GTTAATTGAA

1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGAAAAATGG TAAAAAATAG TTATATTTAT TGATTAATGA TATTCAAGA GCTGTACTG ATAAAGGGTG AAATCGATT

1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTAGTATAC AAGGGAATGA GAATATTAAT CTGAATTGAA GCTATTAATA TAAAGGAATG AACGAGATT AGATACCCCTG

1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTACACTTTA TATAAATTA AAAATTACCT GGTATTAAA CAGTATTTGT CTTGAAACTC AAAGGATTTG GCGGTAACTT

1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750      1760
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGTCTATTTA GAGGAACCTG TCCTGTAATC GATAGTCCAC GAAGAATCTT ACTTTGCTTT GTAGGAATCA GTTTGTATAC

1770      1780      1790      1800      1810      1820      1830      1840
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGTCATTATT AGATAACTTT AATAAGATAT AAAGTTATPG GAATAGTTTA GCTAGTATAT TAGATCAAGG TSCGTCTTAT

1850      1860      1870      1880      1890      1900      1910      1920
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGTAAAGAAA GAGATGGGTT ACATTATAAT AATATAAAC GGATCAATGA ACGAATGTTG GTTGTAAAG GGGATTTAA

1930      1940      1950      1960      1970      1980      1990      2000
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAGTAAAGAG ATTTTAAACA GATCTTTTGA CTTAGCTCT AGGTTATGTA CACATCGCCC GTCGCTCTCG TTAATTAAG

2010      2020      2030      2040      2050      2060      2070      2080
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGAGATAAAT CGTAAATAG TAGGTGTACT GGAAAGTGTG CTTAGAAATT CAAGATGGAG CTTGAACAGT TAAGCATCTC

2090      2100      2110      2120      2130      2140      2150      2160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACTTACGTTG AGAAGTTCGT TGTGCAATC AATGCATCTT GAAATTAATA CCTTGCATAT ATAAATAGTC CGCAATAAAT

2170      2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAATTTAAAA GTAATAAAAA TATTTTGAAT TATTATTGTT TTAGTAGAGT GAATCGAAAA AAAATTAATA AGAGTTATAG

2250      2260      2270      2280      2290      2300      2310      2320
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AATAAGTAC TGTAAAGGAA AGGTGAAATA AATTGAAAT TTAATTAATA TAAAGTAGAG TTAACACTT GTACCTTGTG

2330      2340      2350      2360      2370      2380      2390      2400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TATTAGGCAA AATCAAAATA ATCTTAATAA GATAAGTAAT CCGGAAGAG AAAGAGCTAA TATAAATAGA TAGTTTTGCT

2410      2420      2430      2440      2450      2460      2470      2480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATTAATGAAA TTATAAATTT TATATTAGTA GTGAAATGCT AGTCGATTTT TCATATCTGG TTGATAGAGA ATTAALTTAA

2490      2500      2510      2520      2530      2540      2550      2560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATTTAGTTGC TTTCAAGTTG AAGAAAACCT TAAAGTAATA AAGAGTAGGA GCGAAGAGCT TCTTATTCTA ATAATAAATTT

```

2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640

 TACTATAATG AAATGGATT T AACTATTATT GAATTAGGCT TAAAAACAGC CATATTAATA AAGCGTCTA GTTAATGTAA

2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720

 ATTCATTAAT TAATATTTAT ATAGTGAAGG TTFAGTAGTA ATTATCTGTC TCTTTAATA AATATATCAT TGAAGTAAT

2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800

 AATGATTTTA TTAGTAGAAA TAACTTGGGT AGTAACCAAT TAAAAATAAG AAAGGAATTT TTAGTAAATA TGAGATATAA

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880

 TTAAGGAAC TCGCAAAATAA TGCTTTGCC TGTATACAA AAACATGTCT ATATGATTGG TATGTAAAGT CTGGCCTGCC

2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960

 CACTGATTTA TTTTAAAGGG CCGCGGTATA CTGACCGTGC GAAGGTAGCA TAATCAATTAG TCTCTTAATT GGAGGCTTGT

2970 2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040

 ATGAATGGTT GGACAAAAAG CAAACTGTCT CAATTATATT TATTGAATTT AACTTTAAG TGAAGAGGCT TAAATAACTT

3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120

 AAGGGAGCA TAAGACCCTA TAAAGCTTA CAATAAGTA TCTATATTAT AAATGTTAG TATAACTTGA TTTTAGATAA

3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200

 TATTTGTTCC GTTGGGGCGA CCGGAATATA ATGAGTAACT GTTCTTAAGC TATTTAATA CAGGAATTTT TGAALAAATA

3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280

 ATGATCCTTT TTAGAGATC ATAAGATTA GTTACTTTAG GGATAACAGC GTAATCTTCT TTGAGAGTCC ATATCGACAG

3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360

 GAAGGGTTCC GACCTCGATG TGAATTAAG GTTCTCTTAT AATGCAGCAG TTATAAAGGA GGGTCTGTTT GACCTTAAA

3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440

 TCTTACATG ATTFGAGTTC AGACCGGCGT GAGCCAGSTC GGTTCCTATC TCTTAATTTT ATTAAGTTA TCTTAGTACC

3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520

 AAAGGATTAG ATAATTGAAA TAATCTTAT TTTATATGTA TAAGTTAAT TGGTCTGTTG CTTTGGCAGA GTTATGCATT

3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600

 GGACTTAGGA TCGAATAATG TGGGTGTTAA TCCCACAGGT AATACTGTGA TAACATTGAT TATAGTTATT AATTATTTAT

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680

 TATGATTAT TTGTGATTA GTTGGAGTAG CCTTGTGTAC ATFACTAGAG CAAAAAATTT TGGGTACAT TCAAAATCTT

3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760

 AAAGGACCTA ATAAAGTAGG ATTTACAGGG TTGTACAAAC CATTTGCTGA TGCTGTAAAG TTGTTCAC TAAGAACAGC

3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840

 ATTAGCAGTT ATTCAGATTT TTCTTCTTA TTAGTTGTAA CCGTGTGTTA GTTTATTTGT GTCTTAAAT GTATGTTAG

```

      3850      3860      3870      3880      3890      3900      3910      3920
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
TTATACCTTA TGAATTAGGG TTAATAAACT TTAGTATAAG TACTTTGTTT TTCTTATGTT GFACTAGCTT GGGGGTATAC

      3930      3940      3950      3960      3970      3980      3990      4000
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
ACAACCTATAA GAGCTGGGTG AGCTTCAACT TCTAAGTATT CTTTATTGGG AAGTCTACGA GCGGTGGCTC AGACTATTTC

      4010      4020      4030      4040      4050      4060      4070      4080
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
TTATGAAGTA AGATTAGCTT TAATTTATC ATCATTTATT TTCTTAGTAG GTGGATTGA TCTAAGATTA TTTAGCTTAT

      4090      4100      4110      4120      4130      4140
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
ATCAGCGGGA TGTATGATTA TTATGATTTA CCTTCGCATT ATCTTTAATT TGATTGCTT CTTGTTTA

```

Figura 18. Secuencia nucleotídica total ND1F-tRNAMetR mtDNA de camarón azul *Penaeus stylirostris*.

```

10      20      30      40      50      60      70      80
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTAAATTGAA AGAAAATTGG TTA AAAATAG TTATATTATT GATTGATAAT TTCCTAAGAG CTTGTACTGA TAAAGGGTGA

90      100     110     120     130     140     150     160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AATCAATTTT TTAGTATACA AGGTAATAAA AATATCAATC TGAATTGAAG CTATCAAAAT AAAGGAATGA ACCAGGATTA

170     180     190     200     210     220     230     240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GATACCCGTG TACACTTTAT ATAAATATA AAATTACCTG GGTATTAAC AGCTATTGTC TTGAAACTCA AAGCATTTGG

250     260     270     280     290     300     310     320
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGTAACTTA GTCTATTAG AGGAACCTGT CCTGTAAATG ATAGTCCAGC AAAAATCTTA CTTTATCTTG TAGAAATCAG

330     340     350     360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTGTATACC GTCAATTA TAATACTTA ATAAAATTA AAGTTGTTGG AATAGTCTAG CTAATAATAT AGATCAAGGT

410     420     430     440     450     460     470     480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCAGCTTATG ATAAAGAAG AGATGGGTTA CATTGTAATA AATATAAAGC GAACAACAAA TGAACGTTTG TTGTTGAAGG

490     500     510     520     530     540     550     560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGGATTTAAA AGTAATAAGA TTTAATAAG ATCTTCTGAG TTTAGCTCTA GGTATGTAC ACATGCCCGC TCGCTCTCGT

570     580     590     600     610     620     630     640
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAATTAAGC GAGATAAGTC GTAACATATG AGGTGTACTG GAAAGTGTAC CTAGAANTTC AAGATGGAGC TTGAATAGTT

650     660     670     680     690     700     710     720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAGCATCTCA CTTACGTTGA GAAGTTCGTT GTGCAATCA ACCCATCTTG AAAATTAAGT CTTACTAATA CTAGCTATC

730     740     750     760     770     780     790     800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATAGTGTATA TATTTAAAGG TAATAAAGG ATTTTGGAGT ATTATTGTTT TAGTAGAGTG AATCGAAAAA AAATTA AAAA

810     820     830     840     850     860     870     880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GAGTTATAGA ATAAAGTACT GTAAGGAAA GATGAAATAA ATTGAAATT TAATTA AANT AAAGTAAAGT TAAATACTTG

890     900     910     920     930     940     950     960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TACCTTGTGT ATTAGGGAGG ATTA AAAATA TCTTATTAGA STAAGTAGTC CCGAAAGAAA AAGAGCTAAC ATAAATAAAT

970     980     990    1000    1010    1020    1030    1040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGTTTTCGTA TTAATGAAAT TATTA AATTT ATGTTAGTAG TGA AATCGTA GACCATTTTT CATATCTGGT TGAAGGAGAA

1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAAATTAATA TTTAGTTATT TTGAGGTAA AAAGGCTTTA AAATAATAAA GAGTAGGAGG GAAGAGCTTC TTATCTAAT

1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AATAAGTAAA CTATAATAAA AGTAATTTAA GTATTACTGA ATTAGGCTTA AAAACAGCCA TATTAGTAAA GCGTTCTAGT

1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAATGTAAACA TCTTCGATTA ATATTTATAT AAGTAAAAAT TTAGTAGTAA TTATCCGACT CTCCTAAGTA ATATGTTATT

```

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AAAAGTAATA ATGATTTTAT TAGTAGAAAT AAACGTGTAT ATTATAATTT GAAATGAAAA AAGATTTCTY ATTTAATACA

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AGATAAATTT AAGGAACTCG GCAAATAATG CTTTTCCTCG TTATCAAAA ACATGTCTAT ATGATTGGTA TGTAAAGTCT

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 GCGCTGCCCA CTGATTTAT TTAAAGGGCC GCGGTATACT GACCGTCCGA AGGTAGCATA ATCATTAGTC TTTAALTGG

1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AGGCTCGTAT GAATGGTTCG ACAAAAAGCA AACTGTCTCA ATTATATTTA TTGAATTTAA CTTTAAAGTG AAAAAGGCTA

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AATAAATTA GGGGACGATA AGACCCTATA AAGCTTTACA ATAAGTTACC TATATTATAA ATTGTTAGTA TAACTTGAGT

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TTAGGTAACG TTTGTTGCGT TGGGGGACG AGAATATAAT AAGTAACTGT TCTTAAAGTTA TTTAATGACA GAAATTTCTG

1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 GAAATTAAT GATCCTCTAC TAGAGATCAT AAGATTAAGT TACTTTAGGG ATAACAGCGT AATCTTCTTT GAGAGTCCAC

1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 ATCGACAGGA AGGTTGGCA CTCGATGTT GAATTAAGGG TTCCTTATAA TGCAGCAGTT ATAAAGGAGG GTCGTGTCGA

1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 CCTTAAATC CTACATGAT TTGAGTTCAG ACCGGGCTGA GCCAGGTCCG TTTCTATCTC TTAATTTAT AAAAATATC

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TTAGTACGAA AGGATTAAGT AATTGGAATA ATTCTTGCTT TGTATGTATA ACTATAATCG GTCTGTGCT TTGGCAGAA

2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TATGCATTGG ACTTAGGATC CAATAATGTG GGTGTTAATC CCACAGGTAA TACTGTGATA ACATTAATTA TAGTTATTA

2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TTACTTACTG TTGATTTATT GTGTTTACT AGGAGTTGGG TTTGTTACAT TACTAGAGCG TAAAATTTG GATTATATC

2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AAATCCGTAA GGTCCCAAC AAGGTGGGAT TTATGGGTT GTTACAACCA TTGCCGATG CTGTTAAGTT GTTCACTAA

2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 GAACAGACTC TACCGGTTAT ATCAAAATTT CTCCTTATC ACTATCTCC TGTTTTACT CTTTTGTCT CTTAATTTG

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 ATGGCTAGTT ATGCCATATG AACTGGGTTT AATAAATTTT AGTATGAGAA CTTTGTTTT TCTATGTTT ACAAGTCTAG

2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 GAGGTATATC GACTATAAGA GCAGGTTGAG CTCCAATTTG TAAAATTTCC TTATTAGGAA GCTTCCGAGC GTTAGCCGAG

GenBank bajo los números de acceso AY0446912, AY046913 y AY046914, respectivamente y su variación en la secuencia analizada y reportada por Gutiérrez-Millán *et al.*, 2002a (Apéndice 1).

El total de genes obtenidos para las tres especies de camarón, así como las regiones no codificantes, se muestran en la Tabla VI, junto con su ubicación en la secuencia. Aquí puede observarse que la región analizada comprendió cinco genes de RNA de transferencia (*tRNA^{Met}*, *tRNA^{Gln}*, *tRNA^{Ile}*, *tRNA^{Val}* y *tRNA^{Leu(CUN)}*), dos genes de las subunidades ribosomales grande y pequeña (*16SrRNA* y *12SrRNA*), un gen que codifica para una subunidad enzimática (*NADH1*) y una gran región no codificante (Región Control).

El arreglo génico de las tres especies de peneidos analizadas (Figura 20) resultó ser el mismo que el del camarón asiático *Penaeus monodon* (Wilson *et al.*, 2000), la langosta espinosa japonesa *Panulirus japonicus* (Yamauchi, Miya y Nishida, 2002) y la pulga de agua *Daphnia pulex* (Crease, 1999), pero diferente de otros crustáceos como el cangrejo ermitaño *Pagurus longicarpus* (Hickerson y Cunningham, 2000), el camarón salino *Artemia franciscana* (Valverde *et al.*, 1994) y el copépodo *Tigriopus japonicus* (Machida *et al.*, 2002). Los únicos genes que se mantuvieron bajo el mismo arreglo génico en todas las especies de artrópodos estudiados –a excepción de *Tigriopus japonicus* (Machida *et al.*, 2002)- fue la tríada formada por *12SrRNA-tRNA^{Val}-16SrRNA*.

La polaridad de transcripción de los genes mitocondriales investigados (Figura 20; Tabla VII) es una característica no considerada normalmente en los estudios de evolución y que, sin embargo, pudiese ser de gran valor informativo en términos filogenéticos. El análisis de este rasgo nos permitió concluir que la polaridad de los genes de las especies de camarón, incluyendo a *Penaeus monodon* (Wilson *et al.*, 2000), es la misma que la presentada por *Daphnia pulex* (Crease, 1999), los insectos *Drosophila yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985) y *Anopheles gambiae* (Beard, Hamm y Collins, 1993), y el quelicerado *Limulus polyphemus* (Lavrov, Boore y Brown, 2000). El genoma

Tabla VI. Identificación de genes y regiones no-codificantes de las secuencias nucleotídicas obtenidas de *Penaeus* spp.

Identificación de Secuencia	<i>P. californiensis</i> Localización /total bp	<i>P. stylirostris</i> Localización / total bp	<i>P. vannamei</i> Localización / total bp
<i>tRNA^{Met}</i>	1-15 / 15 Parcial 21,74%	1-15 / 15 Parcial 21,74%	-
Espacio	15-46 / 31	16-44 / 29	-
Intergénico			
<i>tRNA^{Gln}</i>	47-116 / 70	45-114 / 70	-
Espacio	117-135 / 19	115-134 / 20	-
Intergénico			
<i>tRNA^{Leu}</i>	136-202 / 67	135-201 / 67	-
Región Control	203-1189 / 987	202-1195 / 994	-
<i>12SrRNA</i>	1190-2045 / 856	1196-2050 / 855	1-619 / 619 Parcial 72,65%
<i>tRNA^{Val}</i>	2046-2117 / 72	2051-2122 / 72	620-691 / 72
Espacio	2118-2120 / 3	2123-2125 / 3	692-694 / 3
Intergénico			
<i>16SrRNA</i>	2121-3489 / 1369	2126-3496 / 1371	695-2064 / 1370
<i>tRNA^{Leu(CUN)}</i>	3490-3556 / 67	3497-3564 / 68	2065-2132 / 68
Espacio	3557-3561 / 5	3565-3569 / 5	2133-2137 / 5
Intergénico			
<i>NAD1</i>	3562-4140 / 579 Parcial 61,66%	3570-4148 / 579 Parcial 61,66%	2138-2716 / 579 Parcial 61,66%
TOTAL	1-4140 / 4140	1-4148 / 4148	1-2716 / 2716

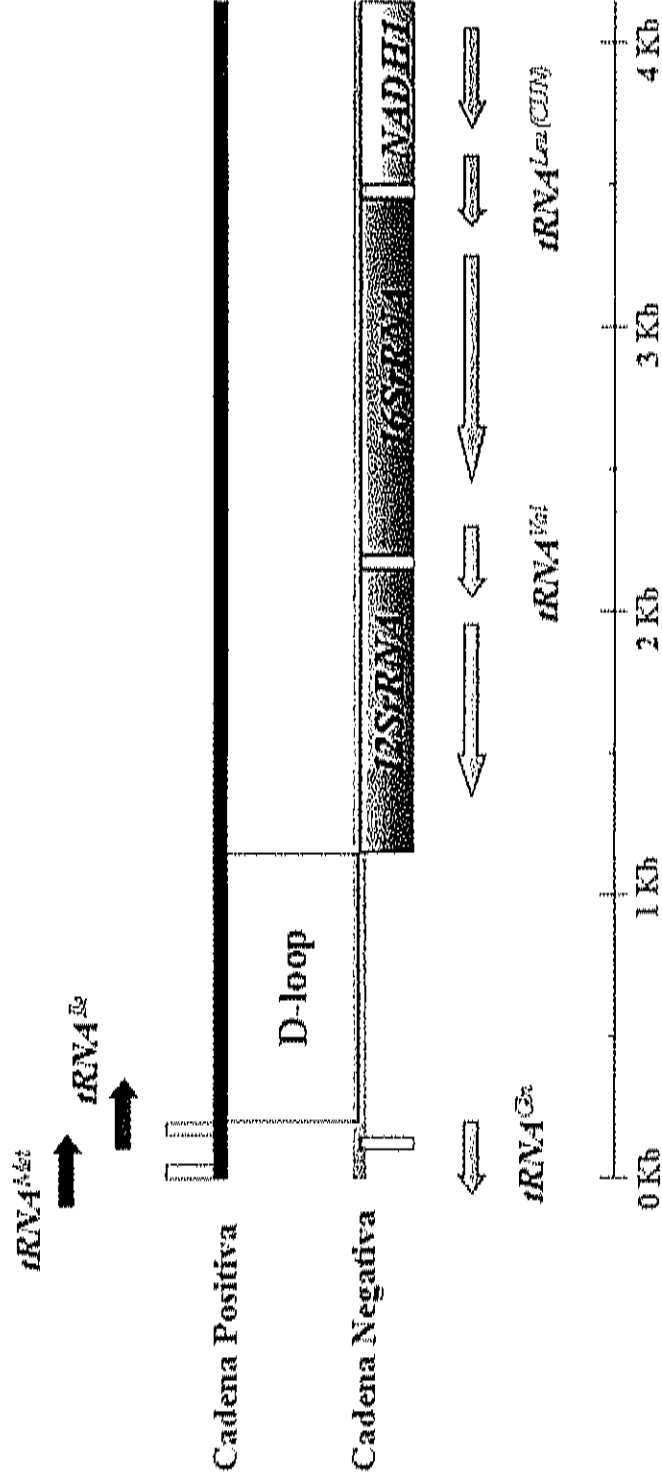


Figura 20. Orden génico y polaridad transcripcional de genes mitocondriales de *Penaeus* spp. Los segmentos NDIF-12SR mtDNA de camarón café *Penaeus californicus*, azul *P. stylirostris* y blanco *P. vannamei*, son semejantes a los de *P. monodon*, *D. yakuba*, *A. gambiae* y *L. polyphemus*. El arreglo génico de *D. pullex* es similar sólo en la porción NAD1-D-loop. En *P. japonicus* el orden génico es similar, pero la polaridad del gen *rRNA^{16S}* está cambiada a la cadena positiva. Los otros artrópodos *P. longicarpus*, *A. franciscana* y *T. japonicus* muestran arreglos génicos diferentes.

Tabla VII. Polaridad de la transcripción de los genes mitocondriales analizados de *Penaeus* spp. y su comparación con otros artrópodos seleccionados.

Gen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>tRNA^{Met}</i>	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tRNA^{Gln}</i>	ND	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>tRNA^{Ile}</i>	ND	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>12SrRNA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>tRNA^{Val}</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>16SrRNA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>tRNA^{Leu(CUN)}</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>NAD1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

+ = Producto (Cadena Positiva)

- = Complemento (Cadena Negativa)

ND = No Determinada

1 *Penaeus vannamei*

2 *Penaeus stylirostris*

3 *Penaeus californiensis*

4 *Penaeus monodon*

5 *Pandalirus japonicus*

6 *Pagurus longicarpus*

7 *Artemia franciscana*

8 *Daphnia pulex*

9 *Tigriopus japonicus*

10 *Drosophila yakuba*

11 *Anopheles gambiae*

12 *Limulus polyphemus*

de *Artemia franciscana* (Valverde *et al.*, 1994) sólo difirió de este arreglo en la polaridad del gen *tRNA^{Leu}*, lo cual pudiera considerarse un carácter evolutivo reciente en este cladóceros. Los otros dos crustáceos decápodos analizados, diferentes de *Penaeus* spp. [*Panulirus japonicus* (Yamauchi, Miya y Nishida, 2002) y *Pagurus longicarpus* (Hickerson y Cunningham, 2000)], difirieron de este patrón básico de polaridad en sólo el gen de *tRNA^{Leu(CUN)}*, lo cual podría ser un rasgo distintivo de este clado. Finalmente, es interesante notar que la polaridad de esta porción del genoma mitocondrial estudiada en *Tigriopus japonicus* (Machida *et al.*, 2002) muestra que todos estos genes son transcritos a partir de la cadena positiva, indicando tal vez los caracteres evolutivos más primitivos de los artrópodos.

La composición de bases nucleotídicas de los genes mitocondriales *12SrRNA* y *16SrRNA* para los tres crustáceos del Pacífico estudiados y su comparación con otros artrópodos seleccionados, se presenta en las Tablas VIII y IX, respectivamente. En ellas puede apreciarse una significativa desviación del par AT –tal y como ha sido observado en otros genomas mitocondriales de artrópodos (Simon *et al.*, 1994)- que mostró un porcentaje cercano a 70% en ambos genes, para las tres especies (promedios: 69.67%, *12SrRNA* y 71.82%, *16SrRNA*), en comparación al par GC (30%), valor prácticamente idéntico al promedio global para las 12 especies analizadas (70.41%, *12SrRNA* y 72.74%, *16SrRNA*.) y ligeramente inferior al 75% de AT reportado por Palumbi y Benzie (1991) para camarones e insectos. Estas semejanzas en composición nucleotídica eran de esperarse dada la conservación en la escala evolutiva de estos genes ribosomales mitocondriales. Por otro lado, la misma composición nucleotídica para la porción estudiada del gen *NADH1* de las tres especies de camarón (Tabla X), mostró en promedio 68.56% de AT's, igual al promedio global para las doce especies de artrópodos (68.08%) y ligeramente inferior al de los genes ribosomales mitocondriales. Sin duda alguna, la porción del genoma mitocondrial que más alto porcentaje de AT mostró fue la región control (precisamente llamada "AT-rich") en los tres camarones del Pacífico (81.19%), superior incluso que el promedio global de 10 especies selectas de artrópodos (74.71%)

Tabla VIII. Composición de bases nucleotídicas del gen *12SrRNA* de *Penaeus* spp. y su comparación con otros artrópodos seleccionados.

Especie	A	C	G	T	GC	AT
<i>Penaeus vannamei</i>	0.3296	0.1826	0.1163	0.3716	0.2989	0.7011
<i>Penaeus stylirostris</i>	0.3355	0.1984	0.1097	0.3565	0.3081	0.6919
<i>Penaeus californiensis</i>	0.3317	0.1916	0.1111	0.3655	0.3027	0.6973
<i>Penaeus monodon</i>	0.3544	0.1731	0.1068	0.3657	0.2799	0.7201
<i>Panulirus japonicus</i>	0.3350	0.2163	0.1106	0.3382	0.3268	0.6732
<i>Pagurus longicarpus</i>	0.3795	0.1538	0.0821	0.3846	0.2359	0.7641
<i>Artemia franciscana</i>	0.2888	0.2139	0.1682	0.3291	0.3821	0.6179
<i>Daphnia pulex</i>	0.3339	0.1972	0.1298	0.3391	0.3270	0.6730
<i>Tigriopus japonicus</i>	0.3190	0.1931	0.1500	0.3379	0.3431	0.6569
<i>Drosophila yakuba</i>	0.3776	0.1327	0.0799	0.4099	0.2126	0.7874
<i>Auopheles gambiae</i>	0.4000	0.1378	0.0840	0.3782	0.2218	0.7782
<i>Limulus polyphemus</i>	0.3969	0.2112	0.1005	0.2913	0.3118	0.6882

Tabla IX. Composición de bases nucleotídicas del gen *16SrRNA* de *Penaeus* spp. y su comparación con otros artrópodos seleccionados.

Espece	A	C	G	T	GC	AT
<i>Penaeus vannamei</i>	0.3438	0.1803	0.1036	0.3723	0.2839	0.7161
<i>Penaeus stylirostris</i>	0.3501	0.1802	0.0992	0.3705	0.2794	0.7206
<i>Penaeus californiensis</i>	0.3382	0.1812	0.1008	0.3798	0.2820	0.7180
<i>Penaeus monodon</i>	0.3802	0.1546	0.0967	0.3685	0.2513	0.7487
<i>Panulirus japonicus</i>	0.3373	0.1941	0.1137	0.3550	0.3077	0.6923
<i>Pagurus longicarpus</i>	0.3799	0.1527	0.0760	0.3914	0.2287	0.7713
<i>Artemia franciscana</i>	0.3053	0.1899	0.1700	0.3348	0.3599	0.6401
<i>Daphnia pulex</i>	0.3607	0.1941	0.1240	0.3212	0.3181	0.6819
<i>Tigriopus japonicus</i>	0.3221	0.1915	0.1364	0.3501	0.3279	0.6721
<i>Drosophila yakuba</i>	0.4155	0.1071	0.0596	0.4178	0.1667	0.8333
<i>Anopheles gambiae</i>	0.4347	0.1162	0.0589	0.3902	0.1751	0.8249
<i>Limulus polyphemus</i>	0.4074	0.2099	0.0802	0.3025	0.2901	0.7099

Tabla X. Composición de bases nucleotídicas del gen *NADH1* de *Penaeus* spp. y su comparación con otros artrópodos seleccionados.

Espece	A	C	G	T	GC	AT
<i>Penaeus vannamei</i>	0.2556	0.1347	0.1969	0.4128	0.3316	0.6684
<i>Penaeus stylirostris</i>	0.2746	0.1209	0.1796	0.4249	0.3005	0.6995
<i>Penaeus californiensis</i>	0.2642	0.1295	0.1813	0.4249	0.3109	0.6891
<i>Penaeus monodon</i>	0.2729	0.1399	0.1468	0.4404	0.2867	0.7133
<i>Panulirus japonicus</i>	0.2199	0.1478	0.2320	0.4003	0.3797	0.6203
<i>Pagurus longicarpus</i>	0.2615	0.1009	0.1812	0.4564	0.2821	0.7179
<i>Artemia franciscana</i>	0.2404	0.1947	0.1807	0.3842	0.3754	0.6246
<i>Daphnia pulex</i>	0.1937	0.1710	0.2216	0.4136	0.3927	0.6073
<i>Tigriopus japonicus</i>	0.2021	0.1157	0.2988	0.3834	0.4145	0.5855
<i>Drosophila yakuba</i>	0.3024	0.0876	0.1237	0.4863	0.2113	0.7887
<i>Anopheles gambiae</i>	0.2615	0.0855	0.1538	0.4991	0.2393	0.7607
<i>Limulus polyphemus</i>	0.2038	0.0846	0.2383	0.4732	0.3230	0.6770

(Tabla XI), lo cual es una característica del mtDNA y más aún de la región control y de genes ribosomales.

En las Figuras 21, 22 y 23, se presentan las secuencias nucleotídicas y deducidas de aminoácidos, con base en el código genético mitocondrial de invertebrados, de los genes parciales de *NADH1* de las especies de camarón blanco *Penaeus vannamei*, camarón azul *P. stylirostris* y camarón café *P. californiensis*, respectivamente. En el análisis de la composición aminoacídica deducida de este fragmento génico mitocondrial (Tabla XII) se observa que el aminoácido menos (no) representado fue la histidina, aunque presente también en proporciones muy bajas (0.52 y 0.93) en *Daphnia pulex* (Crease, 1999) y *Tigriopus japonicus* (Machida *et al.*, 2002), respectivamente y ausente totalmente en el resto de los artrópodos analizados (Wilson *et al.*, 2000; Hickerson y Cunningham, 2000; Yamauchi, Miya y Nishida, 2002; Valverde *et al.*, 1994; Clary y Wolstenholme, 1985; Beard, Hamm y Collins, 1993; Lavrov, Boore y Brown, 2000). Por el contrario, el aminoácido no-polar leucina fue el mayormente representado en las tres especies de *Penaeus* (19.86% promedio) apenas ligeramente superior al 18.33% de promedio estimado para las doce especies de artrópodos comparadas.

Estructuras Secundarias de tRNAs

Las estructuras secundarias predichas de los *tRNA^{Leu(CUN)}* de los tres camarones estudiados se muestran en la Figura 24. Estos modelos fueron fácilmente obtenidos para *Penaeus californiensis* y *P. vannamei* con los algoritmos de Zuker, Mathews y Turner (1999) y Mathews *et al.* (1999), pero no así para *P. stylirostris*, cuya estructura no pudo ser originalmente predicha con el software utilizado, por lo cual se hizo manualmente, tomando como modelo la estructura de camarón blanco. El bosquejo gráfico de la estructura propuesta para el *tRNA^{Leu(CUN)}* de camarón azul, permitió identificar una base citosina en la posición 47 (correspondiente a una guanina en los camarones café y blanco)

Tabla XI. Composición de bases nucleotídicas del D-loop mitocondrial de *Penaeus californiensis*, *P. stylirostris* y otros artrópodos seleccionados.

Espece	A	C	G	T	GC	AT
<i>Penaeus stylirostris</i>	0.4326	0.0805	0.1066	0.3803	0.1871	0.8129
<i>Penaeus californiensis</i>	0.4195	0.0851	0.1074	0.3880	0.1925	0.8075
<i>Penaeus monodon</i>	0.4087	0.0888	0.0959	0.4067	0.1847	0.8153
<i>Panulirus japonicus</i>	0.3499	0.1718	0.1221	0.3562	0.2939	0.7061
<i>Pagurus longicarpus</i>	0.3507	0.1824	0.1563	0.3106	0.3387	0.6613
<i>Artemia franciscana</i>	0.3571	0.1435	0.1757	0.3237	0.3192	0.6808
<i>Daphnia pulex</i>	0.3237	0.1756	0.1538	0.3469	0.3295	0.6705
<i>Tigriopus japonicus</i>	0.3356	0.1601	0.2788	0.2255	0.4389	0.5611
<i>Anopheles gambiae</i>	0.4566	0.0385	0.0193	0.4855	0.0578	0.9422
<i>Limulus polyphemus</i>	0.3879	0.1006	0.0862	0.4253	0.1868	0.8132

```

.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATAACATTAATTATAGTTATTAATTACTTACTGCTGATTATTTGTTGTTTACTAGGAGTTGGGTTTCTTACATTACTAGAGGTTAAAATT
M T L Y H V I N Y L L L X I C V L V Q V A F V T L L E R K X

.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGGGTTATATTCAAATCCGTAAGGGTCCCAACAAGGTGGGATTATGGGGTTGTTACAACCATTTGGCGATCGCTTAAGTTGTTCACT
L G Y I Q I R K G P N K V G F M G L L Q P F A D A V K L F T

.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAAGAACAGACTCTACCGGTTATATCAAAATTTCTCCCTTATTACTTATCTCCCTGTTTTAGTCTTTTTGTGCTTAAATTGATGGCTA
K E Q T L P V M S N F L P Y Y L S P V F S L F V S L I V W L

.....280.....290.....300.....310.....320.....330.....340.....350.....360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTTATGGCATATGAACTGGGGTAAATAAATTTAGTATGAGAACTTTTGTTTTCTATGTTTACAAGCTCTAGGAGTGTATACGACTATA
V M P Y E L G L M N F S M E T L F F L C C T S L G V Y T T M

.....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGAGCAGGGTGACCTTCAAATTCATAAATATTCCTTATTAGGAAGCCTGGAGCGGTAGCCAGACTATTTCTATGAGGTAAGATTAGCT
S A G W A E N S K Y S L L Q S L R A V A Q T Y S Y E V S L A

.....460.....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTGATTTACTATCAATTCATTTTTTACTAGTAGGAGGGTTGACTTAAGATTATTTAGTTTATATCAGCGAGATCTGTTATATTATGGTTT
L E L L S F I F L V G G F D L S L F S L Y Q R D V W L L W F

.....550.....560.....570
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACTTTCCGCTGGCTTTAATTTGATTGCTTCTTGTTTA
Y F P L A L I W F A S C L

```

Figura 21. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del gen parcial de *NADH1* mitocondrial de camarón blanco *Penaeus vannamei*.

Tabla XII. Composición (%) deducida de aminoácidos del gen parcial de *NADH1* mitocondrial de *Penaeus* spp. y otros artrópodos seleccionados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ala	5.18	5.18	5.18	4.15	4.64	4.62	3.68	4.71	3.26	3.61	4.10	6.22
A												
Cys	2.07	2.07	1.55	2.59	2.58	2.56	2.11	2.62	0.93	2.58	3.08	4.15
C												
Asp	1.55	2.07	1.55	1.55	0.52	0.51	1.05	0.52	0.93	0.52	1.54	1.55
D												
Glu	2.07	2.07	1.55	2.07	3.09	2.56	2.11	2.62	2.33	2.06	1.54	2.59
E												
Phe	8.81	8.81	9.33	9.33	7.73	8.21	8.42	10.47	7.91	9.28	10.26	10.36
F												
Gly	5.70	5.70	5.70	5.70	6.70	6.67	6.32	8.90	9.77	6.19	7.18	7.77
G												
His	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.52	0.93	0.00	0.00	0.00
H												
Ile	6.22	6.22	5.70	6.22	7.22	6.67	7.89	6.28	4.19	9.79	7.18	6.74
I												
Lys	3.11	3.11	3.11	3.11	3.61	3.08	5.26	3.66	1.86	3.09	3.08	1.55
K												
Leu	19.69	19.17	20.73	19.17	17.01	19.49	18.42	17.28	17.21	18.04	18.46	15.03
L												
Met	4.15	3.63	4.15	4.15	4.64	6.67	3.16	1.05	4.19	4.64	2.56	4.15
M												
Asn	2.59	2.07	2.59	2.59	3.09	4.10	2.11	3.14	1.86	3.09	4.10	2.59
N												
Pro	3.63	3.11	3.63	3.63	4.12	3.59	4.74	3.66	2.33	3.61	3.59	3.11
P												
Gln	2.59	2.59	2.07	2.59	2.58	2.56	2.11	2.62	2.33	2.58	2.56	2.59
Q												
Arg	2.07	2.07	2.07	2.07	1.55	1.54	1.58	1.57	0.47	1.55	1.54	1.55
R												
Ser	9.33	10.36	9.33	9.33	9.79	9.74	11.05	11.52	13.95	9.79	8.72	10.36
S												
Thr	5.18	5.70	5.18	5.70	3.61	2.56	2.63	2.62	0.93	3.61	3.08	1.04
T												
Val	8.81	8.81	9.84	8.81	9.79	7.18	10.09	10.99	15.81	6.70	8.21	10.88
V												
Trp	2.59	2.59	2.59	2.59	2.58	2.56	2.11	2.09	4.65	2.06	2.05	3.11
W												
Tyr	4.66	4.66	4.15	4.66	5.15	5.13	5.26	3.14	4.19	7.22	7.18	4.66
Y												

1 *Penaeus vannamei*

2 *Penaeus stylirostris*

3 *Penaeus californiensis*

4 *Penaeus monodon*

5 *Paralichthys japonicus*

6 *Paragus longicarpus*

7 *Artemia franciscana*

8 *Daphnia pulex*

9 *Tigriopus japonicus*

10 *Drosophila yakuba*

11 *Anopheles gambiae*

12 *Limulus polyphemus*

que no permitía el correcto apareamiento con su contraparte citosina en el otro lado del brazo T ψ C. Al cambiar temporalmente esta base citosina por guanina, el software empleado pudo realizar la predicción esperada mostrada en la Figura 24 (Panel B). Es posible que esta “mutación” sea simplemente un error de secuenciación, ya que de ser veraz, implicaría que el T ψ C loop se vuelva más amplio, acortando anticipadamente el brazo que lo sostiene.

En la Figura 25 se presentan las estructuras secundarias predichas de los tRNA^{Val} de los tres camarones en cuestión. En general, la estructura y el número total de bases se mantiene, tanto entre los tres peneidos de este estudio, como en *Penaeus monodon* (Wilson *et al.*, 2000). Este gen es 58.33% AT-rich, es decir, cerca de 12% menos de la composición de los genes ribosomales mitocondriales. Este porcentaje es idéntico al reportado para *P. notialis* (García-Machado *et al.*, 1996), pero inferior al 62.5% de *P. monodon* (Wilson *et al.*, 2000). El anticodón predicho en este gen está compuesto por el triplete UAC, semejante al de otros peneidos (García-Machado *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2000). Entre las tres especies del Pacífico estudiadas, se detectaron sólo ligeras variaciones nucleotídicas en las posiciones del par 6-66 del brazo aceptor y en la base 17 del loop del brazo D. Las principales variaciones con respecto al tRNA^{Val} de *P. monodon*, se observaron en las posiciones 49, 62 y 63 del tallo del brazo T ψ C [Apéndice 1 (Gutiérrez-Millán *et al.*, 2002a)], así como en la posición 65 en la base del tallo del brazo aceptor. Se observaron también apareamientos no-ortodoxos entre bases semejantes a los reportados para *P. notialis* (García-Machado *et al.*, 1996) y *P. monodon* (Wilson *et al.*, 2000).

Si se observan las Figuras 26 y 27, se apreciará que sólo aparecen las estructuras secundarias predichas de los tRNA^{Gln} y tRNA^{Met} respectivamente, de los camarones café *P. californiensis* y azul *P. stylirostris*. Esto es debido a que estos genes fueron obtenidos de manera colateral cuando se amplificó, clonó y secuenció la porción CTRL-tRNA^{Met} correspondiente a la región control mitocondrial, misma que no pudo ser clonada para

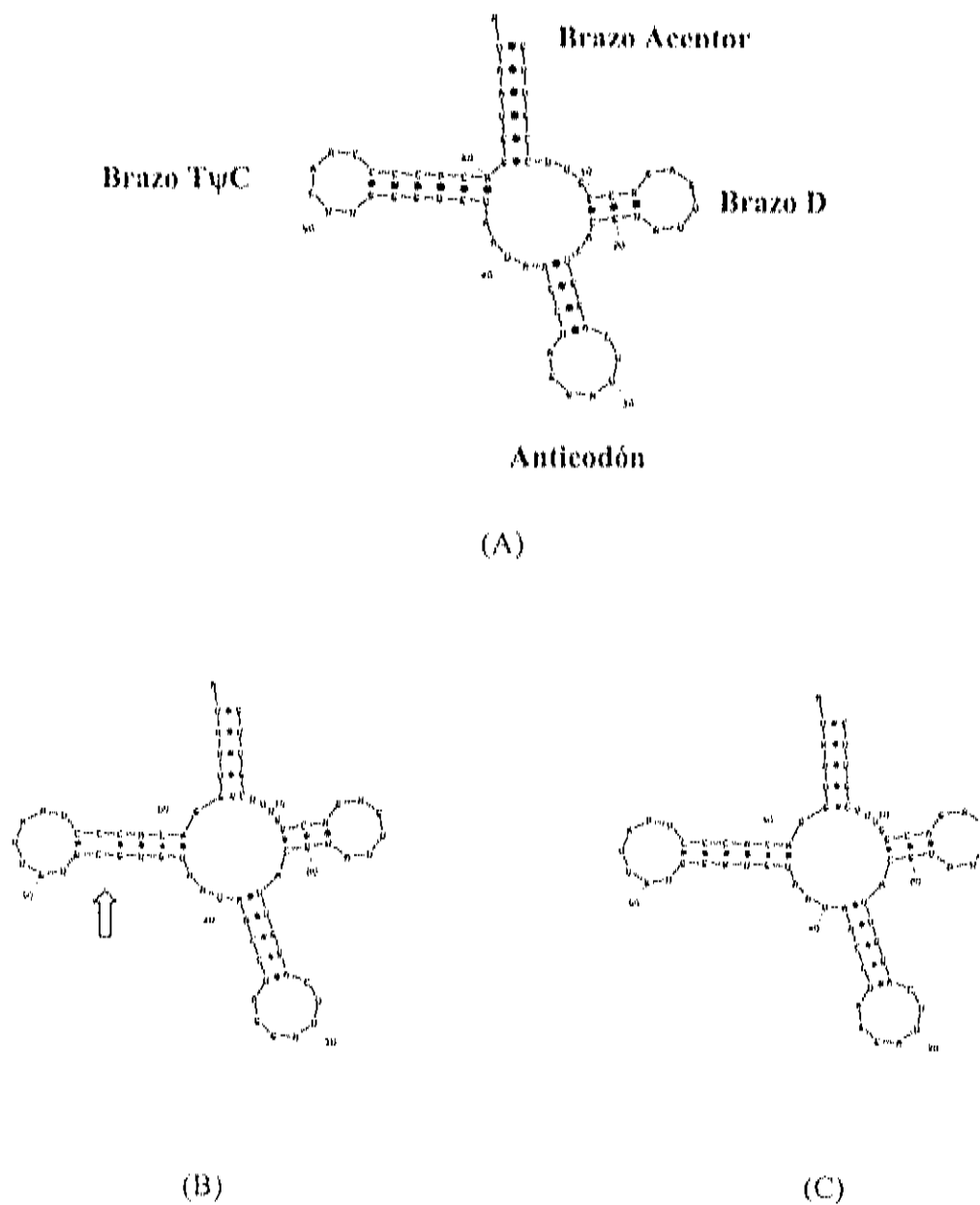


Figura 24. Estructuras secundarias predichas de los *tRNA^{Leu}(UUN)* de los camarones café *Penaeus californiensis* (A), azul *P. stylirostris* (B) y blanco *P. vannamei* (C). La flecha marca el cambio de G por C que disminuye el número de bases complementarias en el brazo TψC de *P. stylirostris*.

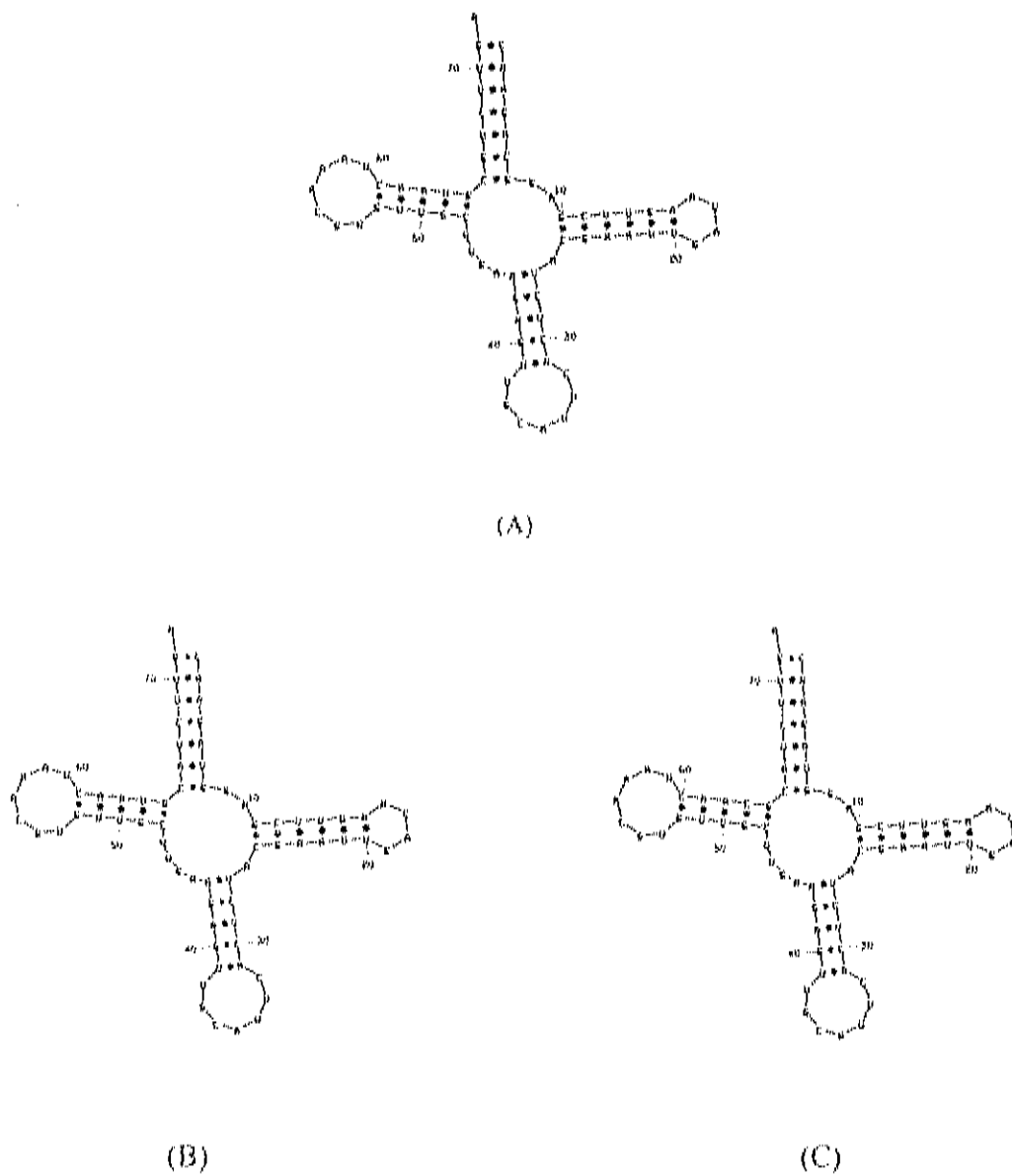


Figura 25. Estructuras secundarias predichas de los *tRNA^{Val}* de los camarones café *Penaeus californiensis* (A), azul *P. stylirostris* (B) y blanco *P. vannamei* (C).

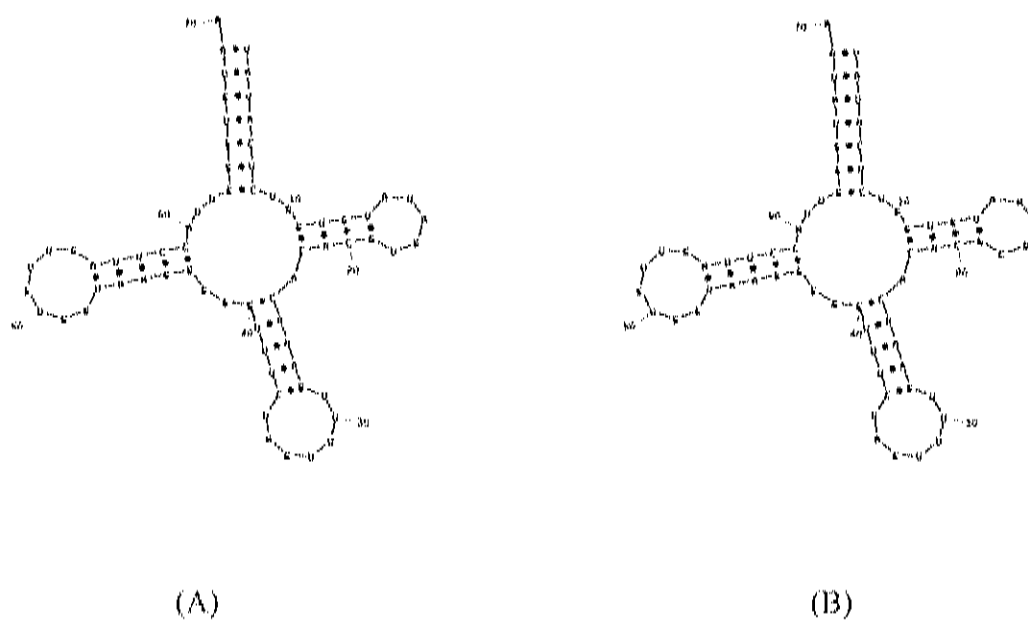


Figura 26. Estructuras secundarias predichas de los $tRNA^{Gln}$ de los camarones café *Penaeus californiensis* (A) y azul *P. stylirostris* (B).

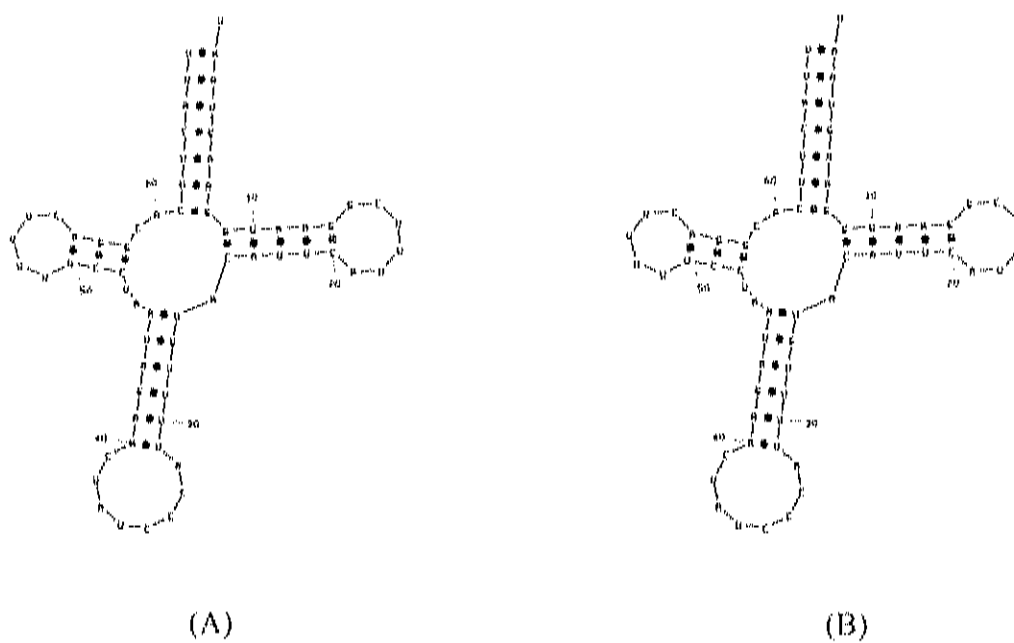


Figura 27. Estructuras secundarias predichas de los *tRNA^{Ile}* de los camarones café *Penaeus californiensis* (A) y azul *P. stylirostris* (B).

camarón blanco *P. vannamei*. Los modelos de estructura secundaria propuestos para *tRNA^{Gln}* y *tRNA^{Leu}* de camarón café y blanco, resultaron ser semejantes en número de bases y forma a la reportada para el camarón asiático *P. monodon* (Wilson *et al.*, 2000). Estas estructuras, al igual que las anteriormente descritas, muestran con frecuencia apareamientos inusuales del tipo GU (Lewin, 1997).

Variabilidad e Identidad Genética en mtDNA de *Penaeus* spp.

Con base en el alineamiento realizado según el algoritmo de CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) de secuencias nucleotídicas entre el gen parcial *12SrRNA* mitocondrial de las tres especies de camarón de esta investigación y los fragmentos homólogos de otros artrópodos seleccionados (Figura 28), se hizo el cálculo de identidad de secuencias nucleotídicas y de distancias genéticas en acuerdo con el modelo de 2-parámetros de Kimura (1980) (Tabla XIII). Resaltan de inmediato los altos valores de identidad entre *Penaeus vannamei* y *P. stylirostris* (0.938), lo cual es lógico si se considera que ambas especies pertenecen al mismo subgénero (*Litopenaeus*) y con respecto a *P. californiensis* (0.911) y *P. monodon* (0.872). Ahora bien, altas identidades en la secuencia se esperaría estuviesen correlacionadas inversamente con bajos valores de distancias genéticas, tal y como se observa entre los peneidos *P. vannamei* y *P. stylirostris* (0.0624). Distancias genéticas intermedias pudieron observarse entre los peneidos y otros crustáceos e insectos (0.38-0.58), e incluso entre aquellos y el quelicerado *Limulus polyphemus*. Un resultado sorprendente fue la gran distancia genética presente entre el crustáceo copépodo *Tigriopus japonicus* (Machida *et al.*, 2002) y el resto de los crustáceos e incluso todos los artrópodos analizados en general (siempre por arriba de 1.3). Cabría aquí preguntarse qué tan válido resulta comparar genes ribosomales –de secuencia supuestamente conservada– entre taxa, cuando en realidad la “conservación” observada proviene de la estructura secundaria funcional, más que de su estructura primaria. A pesar de todo, el gen *12SrRNA* ha sido amplia y efectivamente

		10	20	30	40	50
<i>P. vancouveri</i>	AATTTCTAGG	TACACTTTCC	AGTACACCTA	CTATGTTACG	ACTTATCTCG	
<i>P. stylirostris</i>	AATTTCTAGG	CACACTTTCC	AGTACACCTA	CTATGTTACG	ACTTATCTCG	
<i>P. californiensis</i>	AATTTCTAGG	TACACTTTCC	AGTACACCTA	CTATGTTACG	ACTTATCTCG	
<i>P. monodon</i>	AATTTCTAGG	TACACTTTCC	AGTACACCTA	CTATGTTACG	ACTTATCTCG	
<i>P. japonicus</i>	--CTTCTAGG	TGCACCTTCC	AGTACACCTA	CTATGTTACG	ACTTATCTCA	
<i>P. longicarpus</i>	AACTTCTAGA	TACACCTTCC	AGTACACCTA	CTTTGTTACG	ACTTATTTCA	
<i>A. franciscana</i>	TCTTTCAAGA	TACACCTTCC	GGTATACCTA	CTTTGTTACG	ACTTATCTCT	
<i>D. pulex</i>	TCATTCTAGA	TGCACCTTCC	AGTACACCTA	CTTTGTTACG	ACTTATCTCC	
<i>T. japonicus</i>	-----CAAC	GCCTGATTCC	GCACACCTTA	CTTTGTTACG	ACTTATCTCA	
<i>D. yakuba</i>	TCATTCTAGA	TACACTTTCC	AGTACACCTA	CTATGTTACG	ACTTATCTTA	
<i>A. gambiae</i>	TCATTCTAGA	TACACTTTCC	AGTACACCTA	CTATGTTACG	ACTTATCTCA	
<i>L. polyphemus</i>	GCCTCCTAGA	TACATTTTCC	AATACACCTA	CTATGTTACG	ACTTATCTCA	
		60	70	80	90	100
<i>P. vancouveri</i>	CTTTAATTAA	CGAGAGCGAC	GGGCG-ATGT	GTACATAACC	TAGAGCTAAA	
<i>P. stylirostris</i>	CTTTAATTAA	CGAGAGCGAC	GGGCG-ATGT	GTACATAACC	TAGAGCTAAA	
<i>P. californiensis</i>	CTTTAATTAA	CGAGAGCGAC	GGGCG-ATGT	GTACATAATC	TAGAGCTAAG	
<i>P. monodon</i>	CTTTAATTAA	CGAGAGCGAC	GGGCG-ATGT	GTACATAACC	TAGAGCTAAA	
<i>P. japonicus</i>	TCTAATTATA	TGAAAGCGAC	GGGCA-ATAT	GTACATACCT	TAGAGCTATT	
<i>P. longicarpus</i>	CTT--TTAGG	TGAAAGCGAC	GGGCG-ATAT	GTACATATTT	TAGAGCTATT	
<i>A. franciscana</i>	TCC--G-ACA	AGAGAGCGAC	GGGCGTATGT	GTACATTTCT	CAGAGCTTCC	
<i>D. pulex</i>	TCT--TGAGA	AGAGAGTGAC	GGGCG-ATAT	GTSCACATCC	TATTTGCCTTA	
<i>T. japonicus</i>	T-T-----A	CGAGAGCGAC	GGACA---AT	ATSACTTTT	ATGTTTCACA	
<i>D. yakuba</i>	CCTT-AATAA	TAAGAGCGAC	GGGCG-ATGT	GTACATATTT	TAGAGCTAAA	
<i>A. gambiae</i>	TTTT-AAAAA	TGAGAGCGAC	GGGCG-ATGT	GTSCATSTTT	TAGAGCTATA	
<i>L. polyphemus</i>	CCT--AAAAA	CGAGAGCGAC	GGGCG-ATGT	GTACATSCCT	TAGAGCCCTA	
		110	120	130	140	150
<i>P. vancouveri</i>	CTCAGAAGAY	CTTATTAA--	-ATCTTATTA	CTTTTAAATC	CACCTTCAC	
<i>P. stylirostris</i>	CTCAAAAGAY	CTTGTAA--	-ATCTCTTA	CTTTTAAATC	CACCTTTAAC	
<i>P. californiensis</i>	CTCAAAAGAY	CTTATTAA--	-ATCTTCTTA	CTTTTAAATC	CACCTTCAAT	
<i>P. monodon</i>	ATCAAAAGAT	CTTGTAA--	-ATCTTTTA	CTTTTAAATC	CACCTTCAAT	
<i>P. japonicus</i>	ATCATTTTAC	CTTATTAAAT	CTAAAAATTA	CAATTAAATC	CATCCTCATA	
<i>P. longicarpus</i>	ATCAAAATTA	TAAATAA--	-TTAATTTA	CAATTAAATC	CACCTTCAT	
<i>A. franciscana</i>	TTCAAGTTGA	TAGACC----	-----TTA	CTTTTAAATC	CACCTTCTTC	
<i>D. pulex</i>	TTCAACTTAC	TGTACTTAA--	-CTAAATTTA	CTAATTAAATC	CACCTTCACC	
<i>T. japonicus</i>	TTCAACTTCT	TTAGCTTACT	ATAAAATCTT	CTAATTAAATA	AATTTCTCTC	
<i>D. yakuba</i>	ATCAAAATTA	TAACTCTT--	-ATAATTTA	CTACAAATC	CACCTTCAAA	
<i>A. gambiae</i>	ATCAATATAA	TAACTCTAT--	-TTATATTA	CTAATTAAATC	CACCTTCAAA	
<i>L. polyphemus</i>	TTCAAAATTA	CATATTTAA	-AAAAATTA	CTTTTAAATC	CACCTTCAAT	

	160	170	180	190	200
<i>P. vannamei</i>
	AACAAACGTT	CATTCGTTGT	TCCGTTTATA	TTTATTACAA	TGTAACCCAT
<i>P. stylirostris</i>
	AACCAACATT	CGTTCATTGA	TCCGTTTATA	TTTATTATAA	TGTAACCCAT
<i>P. californiensis</i>
	AACAAATATT	CAATTATTAC	TCCGTTTATA	TTCAATATAT	TGTAACCCAT
<i>P. monodon</i>
	AATAAACGATT	CCTTTATTAT	TTCGTATAT	TTAAATATAT	TGTAACCCAT
<i>P. japonicus</i>
	TGTCAAT-TT	CCCAACATAA	TCAGCCTCT	TTAAAAATAT	TGTAACCCAT
<i>P. longicarpus</i>
	ATTTAAT-TT	CATYAAAPAAA	TCCATTTAAA	CTATTATTAT	TGTAACCCAT
<i>A. franciscana</i>
	TCCATGA-TA	AAATGAAAAGT	TCCGTTTAA-	--GTTCTTAT	TGTAACCCAC
<i>D. pulex</i>
	--TGAGTTTT	AAGCCYAAAA	TCCGTATETC	TATPAAAAAT	TGTAGCTCAT
<i>T. japonicus</i>
	AAAGAGATTT	--TTTGCAA	TYCGAGTTAA	TTTTTTAAGT	TGAATGTTAT
<i>D. yakuba</i>
	AATTT-T-TT	CATRAATTTTA	TCCGTTTAA-	ATAAATTTAT	TGTAACCCAT
<i>A. gambiae</i>
	TTTTTAT-TT	CAAAAAATTA	TCCGTATAA-	ATATATTTAT	TGTAATCCAT
<i>L. polyphemus</i>
	TCTATCGCTT	CAATAAAAACA	TCCGTATTA-	ATAAATTAAT	TGTAATCCAC
	210	220	230	240	250
<i>P. vannamei</i>
	CTCTTCCTTT	ATCATAAGCT	GCACCTTGAT	CTAATATATT	AGCTA---GA
<i>P. stylirostris</i>
	CTCTTCCTTT	ACCATAAGCA	GCACCTTGAT	CTAATATACT	AGCTA---AA
<i>P. californiensis</i>
	CTCTTCCTTT	ACCATAAGCT	GCACCTTGAT	CTAATATATT	AGCTA---CA
<i>P. monodon</i>
	CTCTTCCTTT	ATCATAAGCT	GCACCTTGAT	CTAATATACT	AGCTA---AA
<i>P. japonicus</i>
	TTATACCTAT	-TCATAAGCA	GCACCTTGAT	CTAATATATT	TGATTTCTAT
<i>P. longicarpus</i>
	CTTCTCCTAT	-TTATAAACT	GCACCTTGAT	CTAATTTACT	TACTT---AAG
<i>A. franciscana</i>
	CCTCTCCTGG	-ACATAAGCT	ACACCTTGAT	CTGATTTATT	AGCCT---AAG
<i>D. pulex</i>
	CACTGCCTTT	-TTATAAACT	GCACCTTGAC	CTGAAGTAAG	AAAAA---TAT
<i>T. japonicus</i>
	CTGACCTATA	ATTTTAAAGTC	TTAAGAATTT	TTAGACAACC	ACACA-CAAA
<i>D. yakuba</i>
	TATTACTTAA	-ATATAAGCT	ACACCTTGAT	CTGATATAAA	TTTTTATTAA
<i>A. gambiae</i>
	TTCTACTTAA	-CCATAAACT	GCACCTTGAC	CTGACATATT	ATTTAATGAA
<i>L. polyphemus</i>
	TTCAACCTTT	ACCATAAGCT	GCACCTTGAC	CTGACATAAA	AAATA---AAT
	260	270	280	290	300
<i>P. vannamei</i>
	CTATTCCAAAC	AACTTFAAAT	TTTATTAAGG	TTATCTAATA	ATGACGGTAT
<i>P. stylirostris</i>
	CTATTCCAAAT	AACTTFAAT	CTTATTAAGG	TTATCTAATA	ATGACGGTAT
<i>P. californiensis</i>
	CTCTTTCAAAT	AACTTFACAT	TTTATTAAGG	TTATCTAATA	ATGACGGTAT
<i>P. monodon</i>
	CTATTCCAAAT	AACTTFACAT	CTTATTAAGG	TTACCTAATA	ATGACGGTAT
<i>P. japonicus</i>
	CAATTACAAT	AATTT---CGT	AAA---TAAA	TTATCTAACA	ATGAAGGTAT
<i>P. longicarpus</i>
	TAATTTACAAC	AACTTT---AAT	TTTATCAAAG	TTATCTAATA	ATGACGGTAT
<i>A. franciscana</i>
	CAATTTAAGAG	CAATTT---T	ATTTATTTAA	TCCCTTAA--	AGGACGGTAT
<i>D. pulex</i>
	TTTTTCTCAA	AACTTT---T	TCTTTTAAAG	TAATCTGACA	AGGCCGGTAT
<i>T. japonicus</i>
	CAATTTAATA	AACTGACAAT	ACCG---GGCA	TGCCCCAAA	CTCAATTTTC
<i>D. yakuba</i>
	AATTTATTCAA	TATTTATTAT	CTTA-TAAAA	TATTTCTGATA	AGGACGGTAT
<i>A. gambiae</i>
	ATATCTAAGAA	AACTTATTAAT	CTTA-TAATA	TATTTCTGATC	AGGCCGATAT
<i>L. polyphemus</i>
	TTTTAAACGAT	AGCTTFAACT	CTA---TAAAG	CTAATCAAAG	AGGCCGGTAT

	310	320	330	340	350
<i>P. vannamei</i>	ACAAACTG--	ATTTCTACAA	GATAAAGTAA	GATTTTTCGT	GGACT-ATCG
<i>P. stylirostris</i>	ACAAACTG--	ATTTCTACAA	GATAAAGTAA	GATTTTTCGT	GGACT-ATCG
<i>P. californiensis</i>	ACAAACTG--	ATTTCTACAA	GATAAAGTAA	GATTTTTCGT	GGACT-ATCG
<i>P. monodon</i>	ACAAACTGTA	ATAATTACAA	AATAAAGTAA	GATATTTCGT	GGTTT-ATCG
<i>P. japonicus</i>	ACGGGCTCG-	-----ACAA	GAACAAGAAA	GATTCTACGT	GGTTT-ATCG
<i>P. longicarpus</i>	ACAAACTT--	-----AA	AAATAGGTAA	GATATT-CGT	GGTTT-ATCG
<i>A. franciscana</i>	ATAAGCTG--	-TT-TTACAA	GAACGGCTCG	GTTGTCTCGT	GGATT-CTCG
<i>D. pulex</i>	ACAAACTT--	-----AACAA	AAAAGGGTAA	GATAAAATGG	GGACT-ATCA
<i>T. japonicus</i>	TCATTTTTT	TTCATGGAAA	CAGCCATAAA	GTTTGGGTTT	GTACCCAACT
<i>D. yakuba</i>	ATAAAGTG--	A---TTACAA	ATTTAAGTAA	GTTCCATCGT	GGATT-ATCG
<i>A. gambiae</i>	ACAAATG--	A---AAACAA	AAATTAAGTAA	GTTCCAACTG	GGATT-ATCA
<i>L. polyphemus</i>	ACAAACTGTA	A---TAACAA	AATAAAGTAA	AATTAACCGA	GGACC-ATCG

	360	370	380	390	400
<i>P. vannamei</i>	ATTACAGSAC	AGGTTCCCTCT	A-AATAGACT	AAATTACCGC	CAAATCCTT-
<i>P. stylirostris</i>	ATTACAGSAC	AGGTTCCCTCT	A-AATAGACT	AAATTACCGC	CAAATCCTT-
<i>P. californiensis</i>	ATTACAGSAC	AGGTTCCCTCT	A-AATAGACT	AAATTACCGC	CAAATCCTT-
<i>P. monodon</i>	ATTATAGSAC	AGGTTCCCTCT	A-AATAGACT	AAATTACCGC	CAAATCCTT-
<i>P. japonicus</i>	TTTATACAAC	AGGTTCCCTCT	A-AACAGACT	AAAGTACCGC	CAGGTTCTT-
<i>P. longicarpus</i>	TTTATAGAGAC	AGGTTCCCTCT	A-ASAGGACT	AAAACACCGC	CAAATTCCT-
<i>A. franciscana</i>	TTTATGGGGC	AGGTTCCCTCT	--ASTAAGTT	TAGAAACCGC	CAAATTCCT-
<i>D. pulex</i>	ATTATAGSAC	AAGTCCCTCT	--ATTAGTAT	AAGATGCCCGC	CAAATTCCT-
<i>T. japonicus</i>	TTGTTYGAGC	GGATTACCGC	GGAAACAATC	CGATTCAATG	TACCGGTTG
<i>D. yakuba</i>	ATTACAAAAC	AGGTTCCCTCT	G-GATAGACT	AAATACCGC	CAAATTTTT-
<i>A. gambiae</i>	ATTACAGAAC	AGATTCCCTCT	A-AATAGACT	AAAACACCGC	CAAATTCCT-
<i>L. polyphemus</i>	ATTACAGACC	AGATTCCCTCT	G-AACAGTAT	AAAGCACCGC	CAAATTTTT-

	410	420	430	440	450
<i>P. vannamei</i>	-TCAGTTTCA	AG-ACAATAA	CTGTTTAATA	CCCAGGTAAT	TTTATAATTT
<i>P. stylirostris</i>	-TCAGTTTCA	AG-ACAATAA	CTGTTTAATA	CCCAGGTAAT	TTTATAATTT
<i>P. californiensis</i>	-TCAGTTTCA	AG-ACAATAA	CTGTTTAATA	CCCAGGTAAT	ATTATAATTT
<i>P. monodon</i>	-TCAGTTTCA	AG-ATAATAA	CTGTTTAATA	CCCAGGTAAT	-TTATAATTT
<i>P. japonicus</i>	-TCGAATTTA	AACAATTAAG	TTATA-AATA	CTCAGGCAAT	CGTTTCCTAT
<i>P. longicarpus</i>	-TCGAATTTA	AG-AAATATAA	CTATT-AATA	TTCTAGTAAA	TTTTCACTTT
<i>A. franciscana</i>	-TAGGTTTGA	A-----TAA	T-----ACTA	CCCAGGTTAA	TT--AGAAAT
<i>D. pulex</i>	-TCGTTTTCG	AG--AACCAA	CTTTT-ATTA	CCCTATTTAC	ACTATATTTT
<i>T. japonicus</i>	ATAAATCTCA	AG----TTA	CAATT-AGTT	TCAGTACAA	ATTATTTCTT
<i>D. yakuba</i>	-TAGTTTTCG	AG-AACATAA	CTATT-ACTA	CTTTAGCAAT	TT---ATTTA
<i>A. gambiae</i>	-TAAATTTTA	AG-AAATATAA	CTAAT-ACTA	CTTAAGTATT	CTTATAATTT
<i>L. polyphemus</i>	-TAGTTTTCG	TG--ATCAA	CAATT-ATTA	CCCTATTTTC	CTTACACCTT

	460	470	480	490	500
<i>P. vannamei</i>	ATATAA--AG TGTAAACAGGG TATCTAATCC TGGTTCATTC CTTTATTTTG				
<i>P. stylirostris</i>	ATATAA--AG TGTAAACAGGG TATCTAATCC TGGTTCATTC CTTTATTTTA				
<i>P. californiensis</i>	ATATAA--AG TGTAAACAGGG TATCTAATCC TGGTTCATTC CTTTATTTTA				
<i>P. monodon</i>	AAATAA--AG TGTAAACAGGG TATCTAATCC TGGTTCATCC CTTTATTTTA				
<i>P. japonicus</i>	TATTTTCCAG TGTAAACAGGG TATCTAATCC TGGTTCATAT CTGAASCTTC				
<i>P. longicarpus</i>	AAAT-----ATAATAGGG TATCTAATCC TAGTTTATAA ATTAANAATT				
<i>A. franciscana</i>	GAAC-----TAATAGGG TATCTAATCC TAGTTGTTTG GCC-ATCTAA				
<i>D. pulex</i>	AGAA-----TAACAGGG TATCTAATCC TGGTTTTTFA CCTAANAATT				
<i>T. japonicus</i>	TAATTT-----TAAGA TTTCTGATY TAACTTTTGG CTCNAAGCTTA				
<i>D. yakuba</i>	CAATTT--A- AATAATAGGG TATCTAATCC TAGTTTTTFA TTAANAATTT				
<i>A. gambiae</i>	TAATTT--T- AATAATAGGG TATCTAATCC TAGTTTTTFA TAAANAATTT				
<i>L. polyphemus</i>	TAAA-----ATAACAGGG TATCTAATCC TGGTTCATAA TCAAAGCTTC				

	510	520	530	540	550
<i>P. vannamei</i>	ATAGCCTCAA TTGAGATTTGA TATTTTT-- -ATTACCTTG TATA--CTAA				
<i>P. stylirostris</i>	ATAGCCTCAA TTGAGATTTGA TATTTCTC-- -ATTCCCTTG TATA--CTAA				
<i>P. californiensis</i>	ATAGCCTCAA TTTAAACTTA GAACCTT-- -AATTCCCTTG TATA--CCAA				
<i>P. monodon</i>	ACAGCCTCAA TTAAGATTTGA AACCTTT-- -ATTTACTTA TTTA--TCAA				
<i>P. japonicus</i>	TTGGCCTCAA CCTAAGCTTA CCCCTACAAG AACTCAATTA CTTAGCCTAA				
<i>P. longicarpus</i>	ATAGCCT--A TTTTAAATTA TACTTA--A ACTTTTATTA TT--CTCAA				
<i>A. franciscana</i>	AGAGT----G CTT-----TATTCG---- -AACAAATGG AG----AATA				
<i>D. pulex</i>	TTAGCCTCAA CAG-----A TTTCTTAAGA ATTTCCCTTA AA----TTAA				
<i>T. japonicus</i>	ACCGCGGCTG CTGGCAGCTG CTTCCCCAGC AATTCTTTGA TAACCTCAA				
<i>D. yakuba</i>	TTAACCTCAA TTA---TTA TTTTATAA-- -AATAATTTA AA----TATA				
<i>A. gambiae</i>	ATAGCCTAAA TTAA--TCTA CATTTTYAAT- -AATRAATTA AT----TTAA				
<i>L. polyphemus</i>	AAAAA---AA CAAAAACTAA CCTATT---- -ATCCCTAA CT---ATAA				

	560	570	580	590	600
<i>P. vannamei</i>	AAAATGGATG TCACCCCTTA -TCAGTACAA GCTCTTAAGA AATTAATCAAT				
<i>P. stylirostris</i>	AAAATGGATG TCACCCCTTA -TCAGTACAA GCTCTTGAAA TATCAATTAAT				
<i>P. californiensis</i>	AAAATGGATG TCACCCCTTA -TCAGTACAA GCTCTTAAAA GTTTATTACT				
<i>P. monodon</i>	AAAACTGATG TCACCCCTTA -TTAATATAG GCTTTTAAAA GAA-AAAAAT				
<i>P. japonicus</i>	TAAACCAATG TCACCTCTTA -TTATTTTAA G-CACTAAAT AAGGAAGACT				
<i>P. longicarpus</i>	AAATTTAATG TCACT-----TTATATAAA GATAATPAAA ATCAATTAAT				
<i>A. franciscana</i>	AAATGCAATG TCACCCCTTA -TTGATCTAA AATAACTTGT CCCAAGCTC				
<i>D. pulex</i>	AAATTCAGC TTATCAACAA AATTTACCA TCTTTTAAAG GATCAATGT				
<i>T. japonicus</i>	AAAATAAAA ATTGAGAC-- -TTTTTACCT CATTCAAAA ATTTTTCAC				
<i>D. yakuba</i>	AAATTCAGC TAATATATT- -TAATTTTAT TTT--TAAA TA-AATCAAT				
<i>A. gambiae</i>	AAATTCAGC TAAFAAATT- -TATATATAA ATTAATAAAT TATAAACAAT				
<i>L. polyphemus</i>	AAATTCAGC TTTCAAGATA AATATAATTA G-TATTAATA ACTCAATAT				

	610	620	630	640	

<i>P. vannamei</i>	CAATAA--TA	TAACATATTT	TAACCAATTT	TCCTTCAATT	TAC
<i>P. stylirostris</i>	CAATAA--TA	TAACATATTT	TAACCAATTT	TCCTTCAATT	AAC
<i>P. californiensis</i>	TATTGACATY	TAACATATTT	TAACCAATTT	TCCTTCAATT	GAC
<i>P. monodon</i>	TAATAAA--TA	TAACATGTTT	TAACCAAAATT	TCCTTCAATT	TAC
<i>P. japonicus</i>	CATTTT--CA	T-CTAACCGA	TGACTTATAC	TTCTTCACTG	GAC
<i>P. longicarpus</i>	CAAAATY--TA	TACTACATAC	TAATTTATAT	TTACTCAC--	---
<i>A. franciscana</i>	CTCTGTTCAC	CTAAAAATTT	TGCTCTAG--	-----	---
<i>D. pulex</i>	TAACATA--A	ACAAAATTT	TACTCTACTA	-----	---
<i>T. japonicus</i>	ACAGCTAATA	ACAAAATTT	T-----	-----	---
<i>D. yakuba</i>	TTAATTCATA	CTAAAAAAAT	TTATTTGTAT	TA-----	---
<i>A. gambiae</i>	TTAACTAATA	CTAAAAATTT	TTACTTGC--	-----	---
<i>L. polyphemus</i>	TTAAAA--A	TCAAAAAGTT	TAACATAGGT	C-----	---

Figura 28. Alineamiento de secuencias nucleotídicas entre el gen parcial *12S rRNA* mitocondrial de *Penaeus* spp. y otros artrópodos seleccionados. Se presentan sombreadas las bases nucleotídicas con al menos 70% de identidad entre las doce especies analizadas.

Tabla XIII. Identidad y distancia genética con base en el gen *12SrRNA* mitocondrial de *Penaeus* spp. y otros artrópodos seleccionados. Por arriba de la diagonal se presentan los valores de Identidad, mientras que por debajo de ella se muestran las Distancias Genéticas.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.938	0.911	0.872	0.637	0.667	0.545	0.596	0.381	0.632	0.630	0.610
2	0.0624	0.904	0.872	0.639	0.653	0.536	0.591	0.387	0.632	0.627	0.609
3	0.0916	0.1005	0.871	0.646	0.662	0.536	0.585	0.381	0.628	0.626	0.611
4	0.1285	0.1303	0.1308	0.651	0.675	0.533	0.585	0.387	0.627	0.633	0.618
5	0.4693	0.4577	0.4489	0.4280	0.665	0.492	0.544	0.375	0.592	0.593	0.557
6	0.3841	0.4072	0.3951	0.3559	0.3759	0.560	0.589	0.376	0.659	0.643	0.578
7	0.5804	0.6129	0.6122	0.6062	0.6978	0.5593	0.536	0.355	0.553	0.564	0.522
8	0.5189	0.5303	0.5407	0.5249	0.6407	0.5729	0.6957	0.396	0.595	0.609	0.620
9	1.3825	1.3665	1.4196	1.3711	1.4240	1.3817	1.5158	1.2354	0.390	0.394	0.372
10	0.4664	0.4675	0.4812	0.4758	0.5295	0.3930	0.6083	0.5451	1.3514	0.799	0.613
11	0.4766	0.4849	0.4974	0.4680	0.5465	0.4347	0.5793	0.5352	1.3562	0.2170	0.656
12	0.5121	0.5160	0.5083	0.4954	0.6213	0.5938	0.6998	0.4964	1.4516	0.5067	0.4305

1	<i>Penaeus vannamei</i>	7	<i>Artemia franciscana</i>
2	<i>Penaeus stylirostris</i>	8	<i>Daphnia pulex</i>
3	<i>Penaeus californiensis</i>	9	<i>Tigriopus japonicus</i>
4	<i>Penaeus monodon</i>	10	<i>Dreosephila yakuba</i>
5	<i>Panulirus japonicus</i>	11	<i>Anopheles gambiae</i>
6	<i>Pagurus longicarpus</i>	12	<i>Limulus polyphemus</i>

usado en estudios de evolución y variabilidad genética entre diversos artrópodos (Ballard *et al.*, 1992; Lehman *et al.*, 1995; Wüßle y Stanjek, 1995; Hwang *et al.*, 1999; Koufopanou *et al.*, 1999; Richter *et al.*, 2001) sobre la base de comparación de secuencias selectas conservadas de este gen.

El alineamiento de las secuencias del gen *16SrRNA* entre los peneidos del presente trabajo y otros artrópodos cuyos genomas mitocondriales ya han sido secuenciados (Wilson *et al.*, 2000; Hickerson y Cunningham, 2000; Yamauchi, Miya y Nishida, 2002; Valverde *et al.*, 1994; Crease, 1999; Machida *et al.*, 2002; Clary y Wolstenholme, 1985; Beard, Hamm y Collins, 1993; Lavrov, Boore y Brown, 2000) se presenta en la Figura 29, mientras que los resultados de identidades y distancias genéticas generados a partir de tal matriz de alineamiento se presenta en la Tabla XIV. Las identidades entre *Penaeus vannamei* y *P. stylirostris* (0.916) y con respecto a *P. californiensis* (0.875) y *P. monodon* (0.824) fueron muy semejantes a las observadas anteriormente para el gen *12SrRNA* y lo mismo puede decirse para los valores de distancias genéticas estimadas, que mostraron valores también equiparables. Los valores de similitud de secuencia son también semejantes al dato 0.904 deducido del trabajo de Palumbi y Benzie (1991) con base al gen ribosomal *12SrRNA* de *P. vannamei* y *P. stylirostris*, e igualmente cercano a la identidad nucleotídica (0.89) reportada entre *P. notialis* y *P. schmitti* para un fragmento del gen *16SrRNA* (García-Machado *et al.*, 1993). De igual forma, los valores de distancia genética observados entre *P. vannamei* y *P. stylirostris* (0.0871) fueron equiparables, aunque ligeramente inferior al 0.11-0.19 reportado por Baldwin *et al.* (1998) para un fragmento de *COI*, pero superior al bajo valor de 0.038 reportado por Maggioni *et al.* (2001) para una secuencia parcial del gen *16SrRNA*. Las distancias entre los dos camarones del subgénero *Litopenaeus* y *Penaeus* (*Farfantepenaeus*) *californiensis* estuvieron en el rango de 0.1328-0.1373, valores dentro del intervalo reportado de 0.08-0.24 entre subgéneros de peneidos con base en secuencias del gen *COI* (Baldwin *et al.*, 1998), mientras que la distancia entre *P. monodon* y las tres especies de camarones del Pacífico fue entre 0.1902 y 0.1965, ligeramente superiores,

	10	20	30	40	50
<i>P. vannamei</i>
<i>P. stylirostris</i>AGAC	CGATTACT	TATACATACA	AAGCAAGAAT	TATTCCAATT
<i>P. californiensis</i>AGAC	CAATTAACT	TATACATATA	AAATAAGAAT	TATTCCAATT
<i>P. monodon</i>AAGT	CGATTACT	TATACATACA	AAATAGGAAC	TATTCCAGCT
<i>P. japonicus</i>AAAT	AAATTAATA	TATTCATATA	AA...TAAAT	TATTTAAGT
<i>P. longicarpus</i>GATAAAATA	AC...TAAAT	TATTCCAACT
<i>A. franciscana</i>	TTAAATTAAG	CAGTTGTTAA	TANTATTCCA	TTTATAAANA	TATTTTAATT
<i>D. pulex</i>ATAA	AATCTCAAGA
<i>T. japonicus</i>GA	AAGTTTATTT	TGATTCTTCA	TT...GTAAAG	CTTCCCCTA
<i>D. yakuba</i>ACAAA	TGTTTAAAT
<i>A. gambiae</i>	..TTATTATAT	ATTAATAATA	TTCTTATATA	AAAAATAAT	TATTTTAATA
<i>L. polyphemus</i>TAAAT	ATTTTAAATA	TTTTCAATTA	AAFAAAATTA	TATTTTTTAT
TA	ACATAAATA	AAATAAATA	AAATAAACAA	AATTATTAAT
	60	70	80	90	100
<i>P. vannamei</i>
<i>P. stylirostris</i>	ACCTAATCCT	TTCGTACTAA	GATAATTTTT	ATAAAATTAA	GAGATAGAAA
<i>P. californiensis</i>	ATCTAATCCT	TTCGTACTAA	GATAACTTTA	ATAAAATTAA	GAGATAGAAA
<i>P. monodon</i>	ACTTAATCCT	TTCGTACTAA	AGTAATTATA	ATAAAATTAA	GAGATAGAAA
<i>P. japonicus</i>	TTCTAATCCT	TTCGTACTAA	GAAGTTATC	TCTATTATAG	GAGATAGAAA
<i>P. longicarpus</i>	ATTTGCTCCT	TTCGTACTAA	AATAATTTTA	TTCTCAATRA	AAGATAGAAA
<i>A. franciscana</i>GCTCCT	TTCGTACTAA	CATGAGTGGG	TT...TGCCTTG	GGGATAGAAA
<i>D. pulex</i>	TCTTAATCCT	TTCGTACTAA	AAATAGGCCA	TA...AAATTTG	AGGATAGAAA
<i>T. japonicus</i>TCCT	TTCGTACTAC	ATAAAAACC	AT...AAAACC	AAGATAGAAA
<i>D. yakuba</i>	..TTTGTCTCCT	TTCGTACTAA	AATATTATAA	TT...TTTTA	AAGATAGAAA
<i>A. gambiae</i>	ATTAGCTCCT	TTCGTACTAC	AATATAATAA	TT...TATTA	AAGATAGAAA
<i>L. polyphemus</i>	GTTTGTCTCCT	TTCGTACTAA	AACATCTCTC	CTAATRACTA	AAGATAGAAA
	110	120	130	140	150
<i>P. vannamei</i>
<i>P. stylirostris</i>	CCACCTGGC	TCACGCCGGT	CTGAACTCAA	ATCATGTAAG	GATTTAAAGG
<i>P. californiensis</i>	CCACCTGGC	TCACGCCGGT	CTGAACTCAA	ATCATGTAAG	GATTTAAAGG
<i>P. monodon</i>	CCACCTGGC	TCACGCCGGT	CTGAACTCAA	ATCATGTAAG	GATTTAAAGG
<i>P. japonicus</i>	CCACCTGGC	TCACGCCGGT	CTGAACTCAA	ATCATGTAAA	GATTTAAAGG
<i>P. longicarpus</i>	CCACCTGGC	TCACGCCGGT	CTGAACTCAA	ATCATGTAAA	GTATTAAGG
<i>A. franciscana</i>	CCACCTGGC	TCACGCCGGT	CTGAACTCAG	ATCAGGTAGG	GGTTTAAAGG
<i>D. pulex</i>	CCACCTGGC	TCACGCCGGT	CTGAACTCAG	ATCATGTAAG	AAATCAAGG
<i>T. japonicus</i>	CCACCTGAC	TCACGTCGAT	TTTAACTCAA	ATCATGTAAG	AAA...CAATGG
<i>D. yakuba</i>	CCACCTGGC	TCACGCCGGT	TTGAACTCAG	ATCATGTAAG	AATTTAAAGG
<i>A. gambiae</i>	CCACCTGGC	TCACGCCGGT	TTGAACTCAG	ATCATGTAAG	AATTTAAAGG
<i>L. polyphemus</i>	CCACCTGGC	TCACGCCGGT	CTGAACTCAA	ATCAGGTAAA	GATTTAAAGG

	160	170	180	190	200
<i>P. vannamei</i>	TCGAACAGAC	CCTCCTTTA	TAACTGCTGC	ATT.ATAAGG	AACCCTTAAT
<i>P. stylirostris</i>	TCGAACAGAC	CCTCCTTTA	TAACTGCTGC	ATT.ATAAGG	AACCCTTAAT
<i>P. californiensis</i>	TCGAACAGAC	CCTCCTTTA	TAACTGCTGC	ATT.ATAAGG	ATACCTTAAT
<i>P. monodon</i>	TCGAACAGAC	CCTCCTTTG	TAACTGCTGC	ATT.ATAAGG	ATACCTTAAT
<i>P. japonicus</i>	TCGAACAGAC	CCTCCTTACAA	TAGCTGCTAC	ACC.ACAAGG	GCTCCTTAAT
<i>P. longicarpus</i>	TCGAACAGAC	TCTCTCTTA	TAGCTGCTAC	ACC.ATAAGG	AAACTTTAAT
<i>A. franciscana</i>	TCGAACAGAC	TGCCCTCTT	AGGCTGCTGC	ACC.GAGTAG	GGTCCCTGAA
<i>D. pulex</i>	TCGAACAGAC	TTTCCAACA	AAACTTCTGC	ACC.TTGCTA	ATTTCTTAAT
<i>T. japonicus</i>	TCGAACAGAC	CAGACCCTA	AACTTCTGC	TCC.TTAGGG	TTTTCTTAAT
<i>D. yakuba</i>	TCGAACAGAC	TTAAAAATT	GAACGGCTAC	ACCCAAAATT	ATATCTTAAT
<i>A. gambiae</i>	TCGAACAGAC	CTAAACTTT	AAACTTCTAC	ACCTAAAAAT	AACTCTTAAT
<i>L. polyphemus</i>	TCGAACAGAC	CTTCATATA	GAACTTCTCC	GCC.CTACTG	ACTCTTTAAT

	210	220	230	240	250
<i>P. vannamei</i>	TCAACATCGA	GGTCGCAACC	CTTCTGTTCG	ATGTGACTC	TCAAAGAAAG
<i>P. stylirostris</i>	TCAACATCGA	GGTCGCAACC	CTTCTGTTCG	ATATGACTC	TCAAAGAAAG
<i>P. californiensis</i>	TCAACATCGA	GGTCGCAACC	CTTCTGTTCG	ATATGACTC	TCAAAGAAAG
<i>P. monodon</i>	TCAACATCGA	GGTCGCAACC	CTTCTGTTCG	ATGAGACTC	TCAAAGAAAG
<i>P. japonicus</i>	TCAACATCGA	GGTCGCAACC	CCTTCTGTTCG	ATATGACTC	TCAAAGAAAG
<i>P. longicarpus</i>	TCAACATCGA	GGTCGCAACC	TTTTTCTTCG	ATAAGACTC	TCAAAGAAAA
<i>A. franciscana</i>	CCAACATCGA	GGTCGCAACC	TCTTTTGTTCG	ATTTGAACTC	TCAAAGAAAG
<i>D. pulex</i>	CCAACATCGA	GGTCGCAACC	CTTTTGTTCG	ATAAGAACTC	TCAAAGAAAG
<i>T. japonicus</i>	TCAACATCGA	GGTCATTCGG	GC.CTACTAG	ATAGGAACTC	TCAAAGCTT
<i>D. yakuba</i>	CCAACATCGA	GGTCGCAATC	TTTTTTATCG	ATATGAACTC	TCAAAGAAAA
<i>A. gambiae</i>	CCAACATCGA	GGTCGCAATC	TTTTTTATCG	ATATGAACTC	TCAAAGAAAA
<i>L. polyphemus</i>	TCAACATCGA	GGTCGCAAAC	TTTCTGCCCC	ATAAGAACTC	TCAAAGAAAA

	260	270	280	290	300
<i>P. vannamei</i>	.TTACGCTGT	TATCCCTAAA	GTAACCTAAT	CTTATGATCT	CTAGTAGAGG
<i>P. stylirostris</i>	.TTACGCTGT	TATCCCTAAA	GTAACCTAAT	CTTATGATCT	CTAAAAGAGG
<i>P. californiensis</i>	.TTACGCTGT	TATCCCTAAA	GTAACCTAAT	CTTATGATCT	TTAAGAAAGG
<i>P. monodon</i>	.TTACGCTGT	TATCCCTAAA	GTAACCTAAT	CTTATGATCT	TTAATAAAGG
<i>P. japonicus</i>	.TTACGCTGT	TATCCCTAAA	GTAACCTGAT	CTATT.ATCT	TCATAGAAGG
<i>P. longicarpus</i>	.TAACGCTGT	TATCCCTAAA	GTAACCTAAT	CTTTAATCT	ATC..AAAGG
<i>A. franciscana</i>	.ATTACGCTGT	TATCCCTAAG	GTAACCTGGT	CTT..GTTC	ATC..TAAGG
<i>D. pulex</i>	.TTACGCTGT	TATCCCTAAG	GTAACCTAGT	CTTCTAATCC	CTCCTTAGGG
<i>T. japonicus</i>	.TAACGCTGT	TATCCCTAAA	GTAACCTGCT	TTT.....GAGT
<i>D. yakuba</i>	.TTACGCTGT	TATCCCTAAA	GTAACCTAAT	TTTTAATCA	TTATTAATGG
<i>A. gambiae</i>	.TTACGCTGT	TATCCCTAAG	GTAACCTAAA	TTTTAATCC	ATAAAGCAGG
<i>L. polyphemus</i>	.TTACGCTGT	TATCCCTAAG	GTAACCTAAT	CTTATTAACA	CTAAAAGTGG

	310	320	330	340	350
<i>P. vannamei</i>	ATCATTAATT TT...CCAGAA	ATTCCTGTCA	TTAATAAAGT	TAAGAACAGT	
<i>P. stylirostris</i>	ATCATTAATT TT...CCAGAA	ATTCCTGTCA	TTAATAAAGT	TAAGAACAGT	
<i>P. californiensis</i>	ATCATTAATT TT...CCAGAA	ATTCCTGTCA	TTAATAAATTA	TAAGAACAGT	
<i>P. monodon</i>	ATCAATTAAT CT...TCAATT	ATTAATGTCA	ATAAATAATT	TAAGAACAGT	
<i>P. japonicus</i>	ATCACAACA AAA.CATCAT	AAAAATAATT	AATTATTTTT	TCAAAAGCAGT	
<i>P. longicarpus</i>	ATCAATTAAT ATAATCAACT	ATTAATGTCA	TAA...TTT	CATAGACAGT	
<i>A. franciscana</i>	ATCAATGGT...C.ATTT	ATGATGTGT	TTA...TGT	TGTAAGT.GT	
<i>D. pulex</i>	ATCAATTTT...CCATCT	ATACATGTTT	TT...TAA	AGAAAGT.GS	
<i>T. japonicus</i>	ACCCTGAGTT...CTTTA	TTA...AT	CATAAGTAAG		
<i>D. yakuba</i>	ATCAATTAAT...TCATAA	ATTAATGTTT	TT...TA	AAATTAAG	
<i>A. gambiae</i>	ATCTTTAT...TCATAA	ATCAATGTAA	ATA...AA	TAATAAAGT	
<i>L. polyphemus</i>	GTCAAAAAT...TCACAA	ATAAGTATTA	TTA...TA	AAAAAAGA	

	360	370	380	390	400
<i>P. vannamei</i>	TACTTATTAT ATTCCCGTCC	CCCCAACGCA	ACA...AAGGT	TACCTAAACT	
<i>P. stylirostris</i>	TACTTATTAT ATTCCCGTCC	CCCCAACGCA	ACA...AATAT	TACTTAAAT	
<i>P. californiensis</i>	TACTTATTAT ATTCCCGTCC	CCCCAACGCA	ACA...AAGAC	CGTTTAAAT	
<i>P. monodon</i>	TACTTATTAT ATTCCCGTCC	CCCCAACGCA	ACA...AAGAT	TAATTAAT	
<i>P. japonicus</i>	TACTTATTAT ACTCCCGTCC	CCCCAACAAA	ATA...ATTA	GACATTAAT	
<i>P. longicarpus</i>	TCATTATAT ATCTACGCGG	CCCCAGCACA	ACAAATTAAT	ACTTTTAT	
<i>A. franciscana</i>	TTATTCTGTT CTTACCGTCC	CCCCAACCGA	ACATTCCTTT	ACTCTG...T	
<i>D. pulex</i>	TACTTTEAA CTTCCTGTCG	CCCCAACAAA	ATTTGATCAT	AATTT...T	
<i>T. japonicus</i>	TTTTTAATTT TTTAAGATTG	CCCCAAC...C	AATTTCAAT	
<i>D. yakuba</i>	TTTTTAAAT TTTAATATCA	CCCCAAATAA	ATA...TTTT	AATTTA...TT	
<i>A. gambiae</i>	TTATT.TAAT TTTAATATCA	CCCCAGTAAA	ATTTTATTTA	AAATATAAAT	
<i>L. polyphemus</i>	TAACTTTCTT .TCTTACCG	CCCCAGTAAA	ACT...CTCTT	AGCCTT...T	

	410	420	430	440	450
<i>P. vannamei</i>	CAAGTTATAC TAACAAAT.TT	ATAATATAGG	TAAGTTAT.T	GTAAAGCTTT	
<i>P. stylirostris</i>	CAAGTTATAC TAACAAAT.TT	ATAATATAGA	TAAGTTAT.T	GTAAAGCTTT	
<i>P. californiensis</i>	CAAGTTATAC TAACAAAT.TT	ATAATATAAA	CAAGTTAT.T	GTCAAGCTTT	
<i>P. monodon</i>	CAAGTTATAC TAACAAAT.TT	ATAATTTAAT	CAAGTTAT.T	GTAAAGCTTT	
<i>P. japonicus</i>	TTAAAGCTTAT TACTACTGCC	TAAATTTAT	TACTTTAATC	ATCAAGATTT	
<i>P. longicarpus</i>	TTTATAAAT TTTAAT.TA	AAATTTAAA	TATAATTTAT	GTAAAGATTT	
<i>A. franciscana</i>	CTAATTACTT .ACCGCA.AG	ACAAAAGAAAT	TAAA.....T	GTAAAGATCT	
<i>D. pulex</i>	GTATAAANA .GTAACC.TA	AACTTTAAT	GAAA...T	...AAGCTTC	
<i>T. japonicus</i>	TTAATTAATTT CCGAAGGCTC	ACATTT...TT	...AAGATTT	
<i>D. yakuba</i>	AAATTAAT TAAGCTT..T	ATAATTAANA	TAAATTAAT	ATAAGATTT	
<i>A. gambiae</i>	TTTAAATCTC TTTATAATTT	ATAATTTATA	AAAA.....T	TAAGATCT	
<i>L. polyphemus</i>	CCCAACGGA	AATTAATAA	AAAAACCAA	AAAG.....T	TAAGCTTA

	460	470	480	490	500
<i>P. vannamei</i>	ATAGGGTCTT	ATCGTCCCGT	TAAATTATT	AAGCCTTTTC	ACTTAAAAAT
<i>P. stylirostris</i>	ATAGGGTCTT	ATCGTCCCGT	TAACTTATT	AAGCCTTTTC	ACTTAAAAAT
<i>P. californiensis</i>	ATAGGGTCTT	ATCGTCCCGT	TAAATTATT	AAGCCTTCTC	ACTTAAAAAT
<i>P. monodon</i>	ATAGGGTCTT	ATCGTCCCGT	TAAAGTATT	AAGCCTTTTC	ACTTAAAAAT
<i>P. japonicus</i>	ATAGGGTCTT	ATCGTCCCGC	TATCTCATTT	AAGCCTTTTC	ACTTAAATCT
<i>P. longicarpus</i>	ATAGGGTCTT	ATCGTCTTTT	TATTTTATT	AAGCCTTTTA	ACTTAAAAAT
<i>A. franciscana</i>	ATAGGGTCTT	ATCGGCCCGC	AAGTACATT	AAGCCTTTTC	ACTTAAAGAT
<i>D. pulex</i>	AAAGGGTCTG	ATCGTCCCGC	AAAGCCATT	AAGCCTTTTC	ACTTAAAAAT
<i>T. japonicus</i>	TAGGGTCTT	CTCGTCCCGG	GGTTAAATTT	GGGAATTTTC	ACCCAAAAAT
<i>D. yakuba</i>	ATAGGGTCTT	CTCGTCTTTT	AAATTAATTT	TAGCCTTTTG	ACTTAAAAAT
<i>A. gambiae</i>	ATAGGGTCTT	CTCGTCTTTT	AAATTAATTT	TAGCCTTTTA	ACTTAAAAAT
<i>L. polyphemus</i>	ATAGGGTCTT	CTCGTCCCGT	AGTAAAAATT	CAGCCTTTTC	ACTTAAAAAT

	510	520	530	540	550
<i>P. vannamei</i>	TAAATTCAA	AAATA...TA	ATTGAGACAG	TTTGCCTTTT	GTCCAACCAT
<i>P. stylirostris</i>	TAAATTCAA	AAATA...TA	ATTGAGACAG	TTTGCCTTTT	GTCCAACCAT
<i>P. californiensis</i>	TAAATTCAA	TATTA...TA	ATTGAGACAG	TTTGCCTTTT	GTCCAACCAT
<i>P. monodon</i>	TAAATTCAA	TATTA...TA	ACTGAGACAG	ATTACTTTT	GTCCAACCAT
<i>P. japonicus</i>	CAATTCAAA	ATTTA...TA	GCAGAGACAG	TTGATTTCTT	GTTCAGCCGT
<i>P. longicarpus</i>	CAATTCAA	ATTTA...TT	TAAGAACACAG	ATGATACTTT	GTCCAACCAT
<i>A. franciscana</i>	TAAATTCAA	TTA...TC	GAAGAGACAG	ACCATCTCTC	GTCAAACCAT
<i>D. pulex</i>	GAATTCAC	AAATA...TT	TTAGAGACAG	CTTTTTCTC	GTCTCACCAT
<i>T. japonicus</i>	TATTTCAAT	TTATC...TA	GGTTTTATTG	CTGAACCTAC	CGAAACCCGT
<i>D. yakuba</i>	AAATTCAT	TTTAAATTA	AAAGAAACAG	TTAATATTT	GTCCAACCAT
<i>A. gambiae</i>	AAATTCAT	ATAAA...TTT	AAAAAACACAG	TATATATCTC	ATTCAACCAT
<i>L. polyphemus</i>	AAATTCAAA	ATCTA...TT	TCCAAGACAG	ATTTTTTTAC	GTCCAACCAT

	560	570	580	590	600
<i>P. vannamei</i>	TCATACAGC	CTCCAATTAA	AAGACTAATG	ATTATGCTA	CCTTCGCAGG
<i>P. stylirostris</i>	TCATACAGC	CTCCAATTAA	GAGACTAATG	ATTATGCTA	CCTTCGCAGG
<i>P. californiensis</i>	TCATACAGC	CTTCAATTAA	AAGACTAATG	ATTATGCTA	CCTTCGCAGG
<i>P. monodon</i>	TCATACAGC	CTTCAATTAA	AAGACTAATG	ATTATGCTA	CCTTCGCAGG
<i>P. japonicus</i>	TCATACAGC	CTTCAATTAA	AGGACAAATG	ATTATGCTA	CCTTAGCAGG
<i>P. longicarpus</i>	TCATTCAGC	CTCCAATTAA	AAGACAATCT	ATTATGCTA	CCTTCGCACA
<i>A. franciscana</i>	TCATTCAGC	CTCAAAATCA	AAGCCTAATG	ATTATGCTA	CCTTCGCATG
<i>D. pulex</i>	TCATACAGC	CTCTAATTAA	GAGACTAATG	ATTATGCTA	CCTTAGCACA
<i>T. japonicus</i>	TCATTCAGC	CTTCAATTAA	AAGCCTAATG	ATTATGCTA	CCTT.....
<i>D. yakuba</i>	TCATTCAGC	CTTCAATTAA	AAGACTAATG	ATTATGCTA	CCTTCGCACA
<i>A. gambiae</i>	TCATACAGC	CTTCAATTAA	AAGACTAATG	ATTATGCTA	CCTTCGCAGG
<i>L. polyphemus</i>	TCATACAGC	CTTCAATTAA	AAAGCAAATG	ATTATGCTA	CCTTCGCAGG

	610	620	630	640	650
<i>P. vannamei</i>	GTCAGTATAC	CGCGGCCCTT	TAAAAA.TAAA	.TCAGTGGGC	AGGCCAGACT
<i>P. stylirostris</i>	GTCAGTATAC	CGCGGCCCTT	TAAAAA.TAAA	.TCAGTGGGC	AGGCCAGACT
<i>P. californiensis</i>	GTCAGTATAC	CGCGGCCCTT	TAAAAA.TAAA	.TCAGTGGGC	AGGCCAGACT
<i>P. monodon</i>	GTCAGTATAC	CGCGGCCCTT	TAAAAAATAT	.TCAGTGGGC	AGGCCAGACT
<i>P. japonicus</i>	GTCATGETAC	CGCGGCCCTT	AAACTTTAAT	GTCAGTGGGC	AGGCCAGACT
<i>P. longicarpus</i>	GTCAAAATAC	TCCGGCTCTT	TAATTT.AAA	.TCAGTGAGC	AGGTCAAACT
<i>A. franciscana</i>	GTCAGTATAC	CACCGGCCCTT	TAATTT.CA.	.TCAGTGGGC	AGGCCAGACT
<i>D. pulex</i>	GTCAGAATAC	TCCGGCTATT	TACTA..AT.	.GCATTGAGC	AGGCCAGACT
<i>T. japonicus</i>	GTCAA.....GCCGTT	TAAACCTAA.	.TCAGTGGGC	AG.....
<i>D. yakuba</i>	GTCAAAATAC	TCCGGCCATT	TAAAAA...TT	TTCACTGGGC	AGGTTAGACT
<i>A. gambiae</i>	GTCAAAATAC	CGCGGCCCTT	TAAAAA.....	GTCAGTGGGC	AGGCCAGACT
<i>L. polyphemus</i>	GTCAGTATAC	CGCGGCCATT	AAATC...TC	GTCAGTGGGC	AGGCCAGACT

	660	670	680	690	700
<i>P. vannamei</i>	TTACATAACA	ATCATATAGA	CATGTTTTTG	ATAAACAGGC	AAAAGCATT
<i>P. stylirostris</i>	TTACATAACA	ATCATATAGA	CATGTTTTTG	ATAAACAGGC	AAAAGCATT
<i>P. californiensis</i>	TTATATAACA	ATCATATAGA	CATGTTTTTG	ATAAACAGGC	AAAAGCATT
<i>P. monodon</i>	TTATATAACA	ATCATATAGA	CATGTTTTTG	ATAAACAGGC	AAAAGCATT
<i>P. japonicus</i>	TTACATGAAG	ATCATATAGA	CATGTTTTTG	ATAAACAGGC	AAAAGCATT
<i>P. longicarpus</i>	GTATATAACT	CACACAGAGA	CATGTTTTTG	ATAAACAGGC	AAAAGCATT
<i>A. franciscana</i>	TCCCA.....A	AATTAAGAGC	GATGTTTTTG	ATAAACAGGC	AAAAGCATT
<i>D. pulex</i>	CCCTATAAAA	A.CAGGGGGG	GATGTTTTTG	ATAAACAGGC	AAAAGCATT
<i>T. japonicus</i>	TCTCGGAGCA	ATTAATCTCT	TAAATTTTTG	TCAAACA.GT	GTCAATCCAG
<i>D. yakuba</i>	TTATATAAAA	TTCAAAGA	CATGTTTTTG	ATAAACAGGC	AAAAGCATT
<i>A. gambiae</i>	TTAAATAAAA	TACAAAAGA	CATGTTTTTG	ATAAACAGGC	AAAAGCATT
<i>L. polyphemus</i>	TTTCAATAAA	A.CAAAAC	CATGTTTTTG	ATAAACAGGC	AAAAGCATT

	710	720	730	740	750
<i>P. vannamei</i>	..TTTGCCGA	GTTCCCTAAT	TATATCTTET	ATTAAATAAG	AAATTTTTTT
<i>P. stylirostris</i>	..TTTGCCGA	GTTCCCTAAT	TATATCTCAT	ATTAACTAAA	AAATTCCTTT
<i>P. californiensis</i>	..TTTGCCGA	GTTCCCTAAT	TATATCTTTT	ATCTTATAAA	AACTTTTTTT
<i>P. monodon</i>	..TTTGCCGA	GTTCCCTAAT	TATATCTTAA	AA.AAATAAA	AAATATATAG
<i>P. japonicus</i>	..TTTGCCGA	GTTCCCTTGC	TATATCTCTT	TTTATTCAC	AAAGAAATAT
<i>P. longicarpus</i>	..TTTGCCGA	GTTCTTTTTA	AAATATCTAT	CA.TATTATA	TTTTATTAAA
<i>A. franciscana</i>	..TTTGCCGA	ATTCTTTGGG	ATTTT.....CTGAGGA
<i>D. pulex</i>	..TT.TGCCGA	GTTCCCTTAA	AAATAC.....TTAAA	TTTACTTTAA
<i>T. japonicus</i>	..TCAAGTAC	AACTCCCTAAT	GAAGCC....ATTGAC
<i>D. yakuba</i>	..TTTGCCGA	ATTCTTTTAT	TAAATTTTTTATAAAA
<i>A. gambiae</i>	AAATTTGCCGA	ATTCTTTTAT	AAATCT...ATCAATTAA
<i>L. polyphemus</i>	..TTTGCCGA	GTTCCCTTAA	AAAAATTAAC	CTACAGTCTT	TTTACTTACA

	910	920	930	940	950
<i>P. vannamei</i>	CGCTTACTA	ATATGGCTGT	TTTAAAGCCT	AATTCAGTAA	TACTTAAAT
<i>P. atylirostris</i>	CGCTTACTA	ATATGGCTGT	TTTAAAGCCT	AATTCAGTAA	TACTTAAAT
<i>P. californiensis</i>	CGCTTACTA	ATATGGCTGT	TTTAAAGCCT	AATTCAGTAA	TACTTAAAT
<i>P. monodon</i>	CGCTTACTA	ATATGGCTGT	TTTAAAGCCT	AATTCAGTAA	TACTTAAAT
<i>P. japonicus</i>	CACCTTATTA	ACATGGCTAC	TTCTAAGCCC	AGTTAGAATT	GCATATTAA
<i>P. longicarpus</i>	CACCTTATTA	TTATGGCTGC	TTTAAAGCCT	AATTTTCAAA	AATACTTATT
<i>A. franciscana</i>	CCGAGGCCAAC	TTTAAAGCCT	AGTCATGTTT	T...TCTTGA
<i>D. pulex</i>	AACCTTATTAT	TTTAAAGCCAC	TTTAAAGCCT	AAAAATCATCT	AAAAACCAAGT
<i>T. japonicus</i>	TTTGGCTAG	CTTAAATTTTFA	A.....
<i>D. yakuba</i>	CATTTTATTA	TAATGGCTAA	TTCTAAGCAT	ATATTTATTA	AA...TTTATT
<i>A. gambiae</i>	AATTTATTA	TAATAGCTAT	TTTAAAGCCT	ATATTTATTT	AA.....
<i>L. polyphemus</i>	CA.....	AAATGATCAT	TTCTAATCT	ACAACATAATC	T...TTCTACA

	960	970	980	990	1000
<i>P. vannamei</i>	ACCTTATTA	TAGTTACTT	ATTATTAGAA	TAAGAAGCTC	TTCCCTCCTA
<i>P. atylirostris</i>	CATTCATTA	TAGTAACTT	ATTATTAGAA	TAAGAAGCTC	TTCCCTCCTA
<i>P. californiensis</i>	TCCTTATTA	TAACACACCT	ATTATTAGAA	TAAGAAGCTT	TTCCCTCCTA
<i>P. monodon</i>	CATTAATCA	TAACACACCT	ATTATTAGAA	TAAGAAGCTT	TTCCCTCCTA
<i>P. japonicus</i>	AGAAATTTTA	TT...TATACCA	AGATTTATGA	CCAGAAGCTT	TTCCCTCCTG
<i>P. longicarpus</i>	TT...AATTTA	TATTTTAACT	ATAAATTEGAA	TAAGAAGCTC	ACCTTCCCTA
<i>A. franciscana</i>	T...AATTA	TAATAT... ..	AAATTT...TT	TCTAGAGCTC	GTCCCTCCTA
<i>D. pulex</i>	T...AATTA	TTATATCAAT	TAAATTTGCC	TCCAGAGCTC	ATCCCTCCTA
<i>T. japonicus</i>ACTT	T.....	...TTTTCT	GAAAAAGCTA	ATCCCTCCTC
<i>D. yakuba</i>	T...AATTA	TETTT... ..	AAAAATTTAT	TTTATAGCTT	ATCCCTCCTA
<i>A. gambiae</i>	...AATTA	TAAAAAATAT	AAAAATTTAT	TTTAAAGCTC	ATCCCTCCTA
<i>L. polyphemus</i>	AACCTTATA	ATATATCTAG	AGATTTATCC	CTAGATACTC	ACTTCCCTGA

	1010	1020	1030	1040	1050
<i>P. vannamei</i>	CTCTTATTA	TTTAAAGCC	TE.....	...T... ..T	T...AACCTCAA
<i>P. atylirostris</i>	CTCTTATTA	TTTAAAGCC	TE.....	...C... ..T	T...AACCTCAA
<i>P. californiensis</i>	CTCTTATTA	TATTAAGCTT	TE.....	...A... ..T	C...CACCTCAA
<i>P. monodon</i>	TTCTTATTA	TATTAAGCTT	TE.....	...T... ..G	ATTACCTCAA
<i>P. japonicus</i>	CCATTCA... ..	ACTAAGCTA	TTA.....	...TTAT...TT	ACTAGTTTAA
<i>P. longicarpus</i>	T.....	CTTAAATTT	TACTCTTA..	...TTAA...AG	TAAAACCTAA
<i>A. franciscana</i>	AAATCT	TE.....	...CTTGG...GG	AGTACCTCAA
<i>D. pulex</i>	GACTTAAAGC	CCCCAAATTT	TTAAATTTAA	TACTAAA...AT	AAAAACCTAA
<i>T. japonicus</i>	AGTT... ..	TAAGCTC	ACA.....C	AAGACCTCAA
<i>D. yakuba</i>	ATATTAATAT	TATTAATTTAT	TTAATTTAAT	AAATAATTTAA	ATAAATTTAT
<i>A. gambiae</i>	ATTT...ACTT	TATTTAATTA	TTAATTTAAT	AAATTAATTT	ATAAATTTAA
<i>L. polyphemus</i>	AATTAATTTAA	TAAAAAATTA	TAA.....C	TTTTATTTTC

	1060	1070	1080	1090	1100
<i>P. vannamei</i>
<i>P. stylirostris</i>
<i>P. californiensis</i>
<i>P. monodon</i>
<i>P. japonicus</i>
<i>P. longicarpus</i>
<i>A. franciscana</i>
<i>D. pulex</i>
<i>T. japonicus</i>
<i>D. yakuba</i>
<i>A. gambiae</i>
<i>L. polyphemus</i>

	1110	1120	1130	1140	1150
<i>P. vannamei</i>
<i>P. stylirostris</i>
<i>P. californiensis</i>
<i>P. monodon</i>
<i>P. japonicus</i>
<i>P. longicarpus</i>
<i>A. franciscana</i>
<i>D. pulex</i>
<i>T. japonicus</i>
<i>D. yakuba</i>
<i>A. gambiae</i>
<i>L. polyphemus</i>

	1160	1170	1180	1190	1200
<i>P. vannamei</i>
<i>P. stylirostris</i>
<i>P. californiensis</i>
<i>P. monodon</i>
<i>P. japonicus</i>
<i>P. longicarpus</i>
<i>A. franciscana</i>
<i>D. pulex</i>
<i>T. japonicus</i>
<i>D. yakuba</i>
<i>A. gambiae</i>
<i>L. polyphemus</i>

	1210	1220	1230	1240	1250
<i>P. vannameli</i>
	AAGATT.ATT	TTAATCCTCC	CTAATACACA	AGGTACAAGT	ATTTAACTTT
<i>P. stylirostris</i>
	AAGATT.ATT	TTGATTTTCC	CTAATACACA	AGGTACAAGT	GTTTAACTCT
<i>P. californiensis</i>
	AAGGTT.ATT	TTGATTTTCC	CTAATACACA	AGGTACAAGT	TTTTAACTCT
<i>P. monodon</i>
	AAGATT.ATT	TTGATTTTCC	CTAATACACA	AGGTACAAGA	ATTTAACTTT
<i>P. japonicus</i>
	AGTAT..ATT	TGGATCCTCC	CTGATACAAA	AGGTACAAGT	TTTTACTTCT
<i>P. longicarpus</i>
	KATA...AAT	TTGTTATTTT	ATGATACACA	AGGCACATTC	CAAAATTT..
<i>A. franciscana</i>
	TTAA...AAT	TTAATAAACC	CTGATACAAA	AGGTACAA..A	CAATAA....
<i>D. pulex</i>
	AAGA...ANT	TTGCAGAACCC	CTGATACACA	AGGTACGATA	AAATAAAT..
<i>T. japonicus</i>
	AAGSAT..TT	TAGAAATTTT	ATGATGCCAA	AGAAACTATA	AATTGCCTTT
<i>D. yakuba</i>
	TTTTT..PAT	TTAATAAACG	CTGATACACA	AGGTACAATA	AATTAATTTT
<i>A. gambiae</i>
	AATTTATTAT	TTAATAAACC	CTGATACACA	AGGTACAATA	AATTAATTTT
<i>L. polyphemus</i>
	ATTTT...AA	TTATTCACCC	CTGATACAAA	AGGTACAAGA	TTTTACTTTT

	1260	1270	1280	1290	1300
<i>P. vannameli</i>
	ACTTTATTTT	AATTAATTTT	TCAAATTA..T	TTCATCTTTC	...CTTTACA
<i>P. stylirostris</i>
	ACTTTATATT	AATTAATTTT	TCAAATTA..T	TTCACCTTTC	...CTTTACA
<i>P. californiensis</i>
	ACTTTATTTT	AATTAAGTTT	TCAACTTA..T	TTCATCTTTC	...CTTTACA
<i>P. monodon</i>
	ACTTTTATTT	AATACATTTT	TCAAATTA..T	TTCATCTTTC	...CTTTACA
<i>P. japonicus</i>
	TCTTTTAAATC	AATCAATTTT	TCAATTTTAT	TTCACCTTTC	...CCTCAGC
<i>P. longicarpus</i>
	.CTTTTAAATC	AATTAATAAA	TAAATAT...T	TAAACTTTTC	...TTTTACA
<i>A. franciscana</i>
	.CTTCTTTE..	GTAATTA...T	GTGGACTTTC	...CTTTTCA
<i>D. pulex</i>
	.CTTCTTTTTT	TAAGTTTGAC	ATAGTTT...T	TTCACACTTC	...CTTCACA
<i>T. japonicus</i>
	ATCCGCGCTA	AAAACGAGAT	AAAACGCAAT	ACTAATTTTG	AAATTTGGCA
<i>D. yakuba</i>
	TCTTTTMAAA	TAAAATTTT	TCAAATTA..T	TTCATTTTTC	...TTTTACA
<i>A. gambiae</i>
	TCTTAAAAAT	TAAAATTTT	TCAAATTA..T	TTCATATTTT	...TTTTAAA
<i>L. polyphemus</i>
	TCTAATATCC	TAAATAATAT	TTCACCATAT	TTCATCTTTC	...CTTCACA

	1310	1320	1330	1340	1350
<i>P. vannameli</i>
	GTACTT..TAT	TCTATAACTC	TTTTTAATTT	T...TTTTCSA	TTCACCTCTAC
<i>P. stylirostris</i>
	GTACTT..TAT	TCTATAACTC	TTTTTAATTT	T...TTTTCSA	TTCACCTCTAC
<i>P. californiensis</i>
	GTACTT..TAC	ACTATAACTC	TTCCTTACTTT	TG...TTTTCSA	TTCATCTCTAC
<i>P. monodon</i>
	GTACTT..TAG	TCTATAATTT	ATTATAAAAAT	A...TTTTCSA	TTCACCTCTAC
<i>P. japonicus</i>
	GTACTT..TTG	CACATAGGT..	...CCAAAAA	A...GTTATTT	TCTTAAATAC
<i>P. longicarpus</i>
	ATACTA..TAC	ACTATPATCT	T...CTATTAA	A...TTTCTT	TTCATATATAC
<i>A. franciscana</i>
	GTACTT..AGA	CCTTGA....ATAA	A...TTCSA	TT..CTTTTAC
<i>D. pulex</i>
	GTACTT..TAA	TCTATAGGGA	TGCTTGATAA	T...TTCTT	TAACTCCTAC
<i>T. japonicus</i>
	GTTTTTTTTTA	ACCTAAGTTT
<i>D. yakuba</i>
	ATACTAATAT	ACTATPATTA	A...AATTA	TT..TTTTCTT	TAAACCAATAC
<i>A. gambiae</i>
	ATACTAATAC	ACTATAATTA	A...AATTA	TT..ATTTCTT	TATAAATTAC
<i>L. polyphemus</i>
	GTACTAATAA	AAATAATTA	TCAAAAATTA	TTCATATCAA	CTTACTCTAC

	1360	1370	1380	1390	1400
<i>P. vannamei</i>
<i>P. stylirostris</i>	TAA, AACAA	AATACTCCAA	AATCTTTT	ATTACCTTT	AAATATATAC
<i>P. californiensis</i>	TAA, AACAA	AATATTTCAA	AATATTTT	ATTACCTTT	AAATTTATTT
<i>P. monodon</i>	TAA, AAAAAT	ACATTTCAA	AATAATTT	TTTACTTCT	TAATATATAG
<i>P. japonicus</i>	TAA, AACAA	TCATAATTA	ACTATTTT	CTGAACTCA	TTTTTTATTT
<i>P. longicarpus</i>	TAA, AACAA	CTTATTTAAA	AATATTTT	CATTA...
<i>A. franciscana</i>	TAA, TGTAA	ATGCTTTAAA	ATAAATTT	TAAATAAGA	T.....
<i>D. pulex</i>	TAA, CAAAT	TTGGACAAA	ATGCTTCT	TTAAAAAT	TTCCCAAG
<i>T. japonicus</i>
<i>D. yakuba</i>	TAA, AACTT	TAAATTTATA	GTTATTTCT	AATATTTTA	TATAAATAA
<i>A. gambiae</i>	TAA, AACTAT	AAAAAATAA	ATTATTTTA	TTAATAATA	TAAATAAAA
<i>L. polyphemus</i>	TAA, TAAAT	ACTTTTAAAT	TACAAACAA	ATAAGATTT	AAAA,....
	1410	1420	1430		
<i>P. vannamei</i>		
<i>P. stylirostris</i>	ACTATGATAG	CYTAGTATTA	GTAAGACTTA	A	
<i>P. californiensis</i>	ATTGCGGACT	ATTTATATTA	GCAAGGTTTA	A	
<i>P. monodon</i>	ACTATATTTA	ATTAA, ATTA	ATAAGATTTA	A	
<i>P. japonicus</i>	AAAAGCAAGA	..TTACATTA	ATAAGATTTA	A	
<i>P. longicarpus</i>		
<i>A. franciscana</i>		
<i>D. pulex</i>	GTAAAAA...		
<i>T. japonicus</i>		
<i>D. yakuba</i>	TTAAAAATTA	TAAATAAAT	ATAA,.....		
<i>A. gambiae</i>	AAAAAATAA	ATAAATAAT	ATTA,.....		
<i>L. polyphemus</i>		

Figura 29. Alineamiento de secuencias nucleotídicas entre el gen parcial *16SrRNA* mitocondrial de *Penaeus* spp. y otros artrópodos seleccionados. Se presentan sombreadas las bases nucleotídicas con al menos 70% de identidad entre las doce especies analizadas.

Tabla XIV. Identidad y distancia genética con base en el gen *16SrRNA* mitocondrial de *Penaeus* spp. y otros artrópodos seleccionados. Por arriba de la diagonal se presentan los

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		0.916	0.875	0.824	0.620	0.619	0.507	0.553	0.410	0.599	0.596	0.571
2	0.0871		0.872	0.828	0.625	0.630	0.511	0.553	0.406	0.596	0.601	0.578
3	0.1328	0.1373		0.827	0.620	0.623	0.508	0.553	0.405	0.606	0.600	0.570
4	0.1965	0.1913	0.1902		0.634	0.635	0.514	0.576	0.421	0.615	0.611	0.573
5	0.5362	0.5274	0.5312	0.5023		0.579	0.498	0.545	0.408	0.573	0.559	0.540
6	0.4733	0.4511	0.4608	0.4437	0.5640		0.547	0.594	0.410	0.597	0.580	0.564
7	0.6089	0.5956	0.5992	0.5858	0.6768	0.5645		0.571	0.415	0.528	0.533	0.500
8	0.6807	0.6831	0.6798	0.6117	0.6641	0.5476	0.4981		0.404	0.589	0.592	0.557
9	0.7939	0.8132	0.8087	0.7640	0.8339	0.8309	0.8732	0.8225		0.421	0.428	0.399
10	0.5415	0.5535	0.5212	0.4960	0.5835	0.5006	0.5814	0.5478	0.8237		0.773	0.585
11	0.5470	0.5322	0.5334	0.5046	0.6189	0.5333	0.5549	0.5423	0.8100	0.2450		0.582
12	0.6159	0.6021	0.6211	0.6111	0.6752	0.6358	0.6793	0.6451	0.9523	0.5409	0.5579	

valores de Identidad, mientras que por debajo de ella se muestran las Distancias Genéticas.

- | | |
|---------------------------------|------------------------------|
| 1 <i>Penaeus vannamei</i> | 7 <i>Artemia franciscana</i> |
| 2 <i>Penaeus stylirostris</i> | 8 <i>Daphnia pulex</i> |
| 3 <i>Penaeus californiensis</i> | 9 <i>Tigriopus japonicus</i> |
| 4 <i>Penaeus monodon</i> | 10 <i>Drosophila yakuba</i> |
| 5 <i>Panulirus japonicus</i> | 11 <i>Anopheles gambiae</i> |
| 6 <i>Pagurus longicarpus</i> | 12 <i>Limulus polyphemus</i> |

pero comparables a las distancias de 0.113-0.125 reportadas por Maggioni *et al.* (2001) para un fragmento del gen *16SrRNA*. Por otro lado, es importante considerar el tener especial cuidado al realizar este tipo de comparaciones, sobre todo si los modelos de sustitución de nucleótidos supuestos para calcular las distancias genéticas no fueron los mismos.

Basándose en la información de la Tabla XIV, pudo calcularse el porcentaje de divergencia nucleotídica para el gen *16SrRNA* entre las especies del género *Litopenaeus* y *Farfantepenaeus*, cuyo valor promedio de 12.65% es increíblemente alto, equiparable a la diferenciación de DNA mitocondrial entre géneros de la familia Hominidae, es decir, entre humanos y chimpancés *Pan troglodytes* (10%) y entre humanos y gorilas *Gorilla gorilla* (12%) [comparaciones de secuencias de DNA mitocondrial en GenBank (<http://www.mamomumy.com/>)] e incluso superior a la variabilidad genética existente entre familias de mamíferos (Palumbi y Benzie, 1991). Estos altos valores de diferenciación en mtDNA soportan fuertemente la propuesta de Pérez-Farfante y Kensley (1997) de elevar a nivel de género los subgéneros anteriormente descritos.

En la Figura 30 se muestra el alineamiento de secuencias nucleotídicas entre el gen parcial *NADH1* mtDNA de las tres especies de camarón de esta investigación y los fragmentos homólogos de otros artrópodos seleccionados. Esta matriz sirvió de base para el cálculo de las similitudes de secuencia y distancias genéticas mostradas en la Tabla XV. Los valores de identidad de secuencia entre peneidos y de estos con respecto al resto de artrópodos, así como los valores estimados de distancias genéticas, mostraron el mismo patrón que los genes ribosomales mitocondriales, pero siempre con identidades menores y, por lo tanto, distancias genéticas mayores. Esto es lógico si se considera que la conservación en genes codificantes de proteínas proviene de la secuencia aminoacídica estrechamente relacionada con la funcionalidad de la proteína, más que de la secuencia nucleotídica. Si se observa el alineamiento de la secuencia aminoacídica de este gen (Figura 31) y su correspondiente Tabla (XVI) de identidad y distancias genéticas, se

	10	20	30	40	50
<i>P. vannameli</i>
	--ATAACAT	TAATTATAGT	--TATTAA-T	TACT--TACT	GTTGATFATT
<i>P. stylirostris</i>
	--ATAACAT	TAATTATAGT	--TATTAA-T	TACT--TACT	GTTGATFATT
<i>P. californiensis</i>
	--ATAACAT	TAATTATAGT	--TATTAA-T	TACT--TACT	GTTGATFATT
<i>P. monodon</i>
	--ATAACAT	TAATTATAGT	--TATTAA-T	TACT--TACT	GTTGATFATT
<i>P. japonicus</i>
	--ATGATCT	TCGTGCTTTC	GATTTTAAAA	TATC--TAA	TCTTATCATT
<i>P. longicarpus</i>
	ATGTTTATTT	TTATTATAAT	ATTACTAAAT	TACT--TGAT	ACTTATFATT
<i>A. franciscana</i>
	-----	---ATGAT	CTATTTTATT	TUTT--TACA	AGTAGTTATG
<i>D. pulex</i>
	-----	---ATGATCA	AGTATTCCTC	TTCT--TACT	TGTGCTGCTG
<i>T. japonicus</i>
	--ATTAGGAG	AAATTTTATT	TCTGTCAGAG	GGTGGTACT	AATSTTGGT
<i>D. yakuba</i>
	--ATAGAAAT	TTATTTTATC	ATTAATTGGA	AGTT--TATT	ATTAATFATT
<i>A. gambiae</i>
	ATATTTGATG	CTATTTATCC	TTTAATTGGA	AGTT--TATT	ATTAATFATT
<i>L. polyphemus</i>
	---TGTTAA	TAAGTTTAT	--TGTTG-T	TATG--TTGT	TATTTGATT
	60	70	80	90	100
<i>P. vannameli</i>
	TGTGTTTATG	TAGGAGTTGC	GTTTTSTTACA	TTACTAGACC	GTAATATTTT
<i>P. stylirostris</i>
	TGTGTTTATG	TAGGAGTTGC	GTTTTSTTACA	TTACTAGACC	GTAATATTTT
<i>P. californiensis</i>
	TGTGTTTATG	TAGGAGTTGC	GTTTTSTTACA	TTACTAGACC	GTAATATTTT
<i>P. monodon</i>
	TGTGTTTATG	TAGGAGTTGC	GTTTTSTTACA	TTACTAGACC	GTAATATTTT
<i>P. japonicus</i>
	TGTGTTTATG	TAGGAGTTGC	GTTTTSTTACA	TTACTAGACC	GTAATATTTT
<i>P. longicarpus</i>
	TGTGTTTATG	TAGGAGTTGC	GTTTTSTTACA	TTACTAGACC	GTAATATTTT
<i>A. franciscana</i>
	--GTTTTATG	TTCAGTTGCT	TTTTTTAACA	CTATTAGAAC	GAAAGATTTT
<i>D. pulex</i>
	TGTGTTTATG	TAGGAGTTGC	GTTTTSTTACA	TTACTAGACC	GTAATATTTT
<i>T. japonicus</i>
	GGATTTTTCG	GGGGGTTGAG	CAGAGTTGAT	TTTTTTCAGT	TTGAGTTTTT
<i>D. yakuba</i>
	TGTGTTTATG	TAGGAGTTGC	GTTTTSTTACA	TTACTAGACC	GTAATATTTT
<i>A. gambiae</i>
	TGTGTTTATG	TAGGAGTTGC	GTTTTSTTACA	TTACTAGACC	GTAATATTTT
<i>L. polyphemus</i>
	TGTGTTTATG	TAGGAGTTGC	GTTTTSTTACA	TTACTAGACC	GTAATATTTT
	110	120	130	140	150
<i>P. vannameli</i>
	GGGTATATTT	CAAAATCCGTA	AGGGTCC-CA	ACAAGGTGGG	ATTTATGGGG
<i>P. stylirostris</i>
	GGGTATATTT	CAAAATCCGTA	AAGGACC-TA	ATAAAGTAGG	ATTTATGGGG
<i>P. californiensis</i>
	AGGTATATTT	CAAAATCCGTA	AGGGACC-TA	ATAAAGTAGG	ATTTATGGGG
<i>P. monodon</i>
	AGGTATATTT	CAGATCCGTA	AAGGACC-TA	ATAAAGTTGG	CTTTATAGGY
<i>P. japonicus</i>
	GGGTATATTT	CAAAATCCGTA	AAGGACC-CA	ATAAAGTTGG	CTTTATAGGY
<i>P. longicarpus</i>
	AGGTATATTT	CAAAATCCGTA	AGGGACC-TA	ATAAAGTTGG	CTTTATAGGY
<i>A. franciscana</i>
	GGGTATATTT	CAGATCCGTA	AGGGACC-AA	ATAAAGTTGG	CTTTATAGGY
<i>D. pulex</i>
	AGGTATATTT	CAGATCCGTA	AGGGACC-TA	ATAAAGTTGG	CTTTATAGGY
<i>T. japonicus</i>
	--CTTGGACT	TGAATTTATT	GGGTTTCTTT	GTGTTTGGAA	GATTTGGTAG
<i>D. yakuba</i>
	AGGTATATTT	CAAAATCCGTA	AAGGACC-TA	ATAAAGTTGG	CTTTATAGGY
<i>A. gambiae</i>
	AGGTATATTT	CAAAATCCGTA	AAGGACC-AA	ATAAAGTTGG	CTTTATAGGY
<i>L. polyphemus</i>
	AGGTATATTT	CAGATCCGTA	AAGGACC-CA	ATAAAGTTGG	CTTTATAGGY

	160	170	180	190	200
<i>P. vannameli</i>	TTGTTACAAC	CATTTCCCGA	TGCTGTAAAG	TTGTTCACTA	AGAACAAGAC
<i>P. stylirostris</i>	TTGTTACAAC	CATTTCCCTGA	TGCTGTAAAG	TTGTTCACTA	AGAACAAGAC
<i>P. californiensis</i>	TTATTACAAC	CATTTCCCTGA	TGCGGTAAAG	TTGTTTACTA	AGAAGCTAAC
<i>P. monodon</i>	TTGTTACAAC	CITTTCCCTGA	TGCTGTAAAG	TTATTTACTA	AGAACAAGAC
<i>P. japonicus</i>	ATTCCTCAAC	CITTTCCCTGA	TGCTGTAAAG	TTGTTCACTA	AGAACAAGAC
<i>P. longicarpus</i>	TTATTACAGC	CITTTCCCTGA	CGCAGTGAAG	TTATTTTGA	AGAAGCAAAC
<i>A. franciscana</i>	ATCCTACAAC	CITTTTCTGA	TGGCGTAAAA	TTATTTTGTG	AGGAAGCTCTC
<i>D. pulex</i>	GTTCCTCAGC	CITTTTCTGA	CGCAATPAAA	TTSTTTTCAA	AGGASCACCTT
<i>T. japonicus</i>	AGAGAGAAGS	CCTGGGGCGA	GAGTGATAGA	ATACTTTTGG	GTTCAAAGAT
<i>D. yakuba</i>	ATTCCTCAAC	CITTTTCTGA	TGCAATPAAA	TTATTTTAAA	AGAACAAGAC
<i>A. gambiae</i>	TTATTACAAC	CATTTTCTGA	TGCTGTAAAA	TTGTTTACTA	AGAACAAGAC
<i>L. polyphemus</i>	GTTTTACAAC	CITTTTCTGA	TGCGATTAGS	TTATTTTGTG	GGGASCAGAG
	210	220	230	240	250
<i>P. vannameli</i>	TCTACCGGTY	ATATCAAATY	TTCTCCCTTA	TTACTTATCT	CCTGTTTTTA
<i>P. stylirostris</i>	ATTACCASTY	ATSTCAGATT	TTCTCCCTTA	TTACTTGTCA	CCTGTTTTTA
<i>P. californiensis</i>	ATTGCCAGTY	ATSTCAATY	TCCTTCCCTTA	TTATTTATCT	CCAGTTTTTA
<i>P. monodon</i>	TTTACCGTYY	ATATCAAATY	TTTACCCTTA	TTATTTTCTT	CCTGTTTTTA
<i>P. japonicus</i>	TCCGCCAACC	ATSTCAATY	TTTTTGTATA	TTATSTTCT	CCAATTTTTA
<i>P. longicarpus</i>	TGTTCCPAGS	ATATCAATY	TTCTCCCTTA	TTATTTATCT	CCPTTTTTTA
<i>A. franciscana</i>	ACTTCCCTTY	GTCTCCAATY	TCATACCCTA	CCTCGTTGCT	CCTGTTTTTA
<i>D. pulex</i>	TTCCCCCTTC	ACCTCTAATY	ATTCAGCCTT	TTTTAATGCC	CCTGTTTTTA
<i>T. japonicus</i>	TTT--ATTC	GTCTCTAGTY	GTAATATTYG	ATTTSCATTA	TCCTTTTATG
<i>D. yakuba</i>	TTATCCATTA	TTATCAAATY	ATTTAAGATA	TTATATTTCT	CCTATTTTTY
<i>A. gambiae</i>	ATATCCATTA	TTATCAATY	ATATTTCTTA	TTATTTTTCT	CCTGTTTTTT
<i>L. polyphemus</i>	TTATCCTTTT	TTATCAATY	TTTTATTTTA	TTTTTGAAGT	CCGTTTTTTA
	260	270	280	290	300
<i>P. vannameli</i>	GTCTTTTTST	GTCTTTAATY	GTATGGCTAG	TTATGCCATA	TGAAGCTGGG
<i>P. stylirostris</i>	GTTTATTTST	GTCTTTAATY	GTATGGCTAG	TTATACCCTA	TGAATTAGGG
<i>P. californiensis</i>	GTTTATTTST	GTCTTTAATY	GTATGATYTAG	TTATGCCCTA	CGAGTTAGGG
<i>P. monodon</i>	GTCTATTTST	TTCTTTAATY	GTCTGATYTAG	TAATACCCTA	TGAAGCTAGGG
<i>P. japonicus</i>	GACTTCCAAAT	TTCTTTAATY	CGGTGGCTGG	TCATGCCCTA	TGAGTTAGGG
<i>P. longicarpus</i>	GTTTATTTTAT	TTCTTTAATY	GTTTGAATYTAG	TAATGCCCTA	TGAAGAGAGG
<i>A. franciscana</i>	GTTTATTTCTT	TTCTTTTTTC	TTATGSACTC	TAGTCCCATY	CATCTCTTAC
<i>D. pulex</i>	GTTTGGGGCT	ATCTCTCTCT	ATATGCCCTA	GAATTCCTTC	TTTTTTTTAT
<i>T. japonicus</i>	CGCCCTTTAA	GT-TCTACTT	TTCTAGCTTT	GGTCTCATG	TTTTAAGCTGG
<i>D. yakuba</i>	GTTTATTTTT	ATCTTTAATY	GTTTGAATYTAG	GTATACCCTT	TTTTTGTAAA
<i>A. gambiae</i>	GTTTATTTTT	ATCTTTAATY	ATTTGAATYTAG	GTATTCCTTA	TTTTAATYAG
<i>L. polyphemus</i>	GACTTTTTTT	CGCTTTCTCT	TTCTGATYTAG	TTTTTCCTAT	TTTTTTTTAT

	310	320	330	340	350
<i>P. vannamei</i>	TTAATAAAATT	TTAGTATGAG	AACCTTTGTT	TTTTCTATGT	TGTACAAGTC
<i>P. stylirostris</i>	TTAATAAACT	TTAGTATAAG	TACTTTTGT	TTTTCTATGT	TGTACTAGCT
<i>P. californiensis</i>	CTAATAAACT	TTAGTATGAG	AACCTTTATT	CTTTTTCTGT	TTTACAAGTC
<i>P. monodon</i>	TTAATAAACT	TTACTATGAG	TACTTTTATT	TTTTTTATGC	TGTACTAGAC
<i>P. japonicus</i>	ATANTAATTT	TTAATATGGG	GACCTTCTT	TTTTTTCTGT	TGTCTGAGCC
<i>P. longicarpus</i>	ATAGTAAGST	TTAATATAGG	TATTTTATT	TTTTCTCTGT	TGTCTAAGTC
<i>A. franciscana</i>	GGTGCAAAAT	TCAATTTATC	ATTCCTATT	AGTTATCTGT	GCAATGAGAG
<i>D. pulex</i>	TTACTCTCTT	TTAATAAGAG	CGTACTCTT	TTTCTTATGC	GGTCTAGGGG
<i>T. japonicus</i>	GTSTTCTCTC	GTTCGACGGG	TGGCTGATTG	CACCTCTTGG	GGTATTCTCT
<i>D. yakuba</i>	TTATACTCTT	TTAATTTAGG	TGGATTATT	TTTTTTATGT	TGTACAAGAT
<i>A. gambiae</i>	TTATATTCTT	TTAATTTAGG	TGTFTTSTT	TTTTTTATGT	TGTACTAGAT
<i>L. polyphemus</i>	ATGCTAGATT	TTGAGTTAGG	GTPATTATT	TTTTTTATGT	GTTTCTAGCT
	360	370	380	390	400
<i>P. vannamei</i>	TAGGAGTCTA	TAGGACTATA	AGAGCAGGGT	GAGCTTCAAA	TTCTAAATAT
<i>P. stylirostris</i>	TGGGGTATA	CACAACCTATA	AGAGCTGGGT	GAGCTTCAAA	TTCTAACTAT
<i>P. californiensis</i>	TAGGGGTATA	CACAACCTATA	AGAGCAGGGT	GGGCTTCAAA	TTCTAAATAT
<i>P. monodon</i>	TAGGGTATA	CACCACCTATA	AGAGCTGGAT	GATCTTCTAA	TTCCAAATAT
<i>P. japonicus</i>	TAGGGGTCTA	TCCGGTGCATC	AGAGCCGGGT	GSTCTTCAAA	TAGAACTATC
<i>P. longicarpus</i>	TAGGGGTITA	TCTACTTTTA	AGAGCCGGGT	GATCTTCAAA	TTCTAACTAT
<i>A. franciscana</i>	TSAGAGTATA	CAGAATTATC	GTTGCAGGGT	GSTCCTCTAA	CTCTAACTAT
<i>D. pulex</i>	TTGGTGTITA	TGGGCTTCTC	CGGGCAGGGT	GGAGATCTAA	TTCTAACTAT
<i>T. japonicus</i>	TSAGAGACCC	TGTGGTT---	-GGCCAGGGT	TCCCCAAAAG	TTATTACCTG
<i>D. yakuba</i>	TAGGAGTTTA	TACAGTTATA	GTAGCTGGGT	GATCTTCTAA	TTCTAAATAT
<i>A. gambiae</i>	TAGGAGTTTA	TACTGTAAATC	ATTGGCAGGT	GATCTTCTAA	TTCTAAATAT
<i>L. polyphemus</i>	TTGGGGTTTA	TGCTATAATA	GGAGCTGGGT	GATCATCAAA	TTCTAAATAT
	410	420	430	440	450
<i>P. vannamei</i>	TCCTTATTAG	GAAGCCTTCC	AGCCGTAGCC	CAGACTATTT	CTTATGAGGT
<i>P. stylirostris</i>	TCTTTATTGG	GAAGTCTACG	AGCCGTGGCT	CAGACTATTT	CTTATGAGGT
<i>P. californiensis</i>	TCTTTACTCG	GAAGTCTCCG	CGCAGTAGCT	CAAACTATTT	CTTATGAGGT
<i>P. monodon</i>	TCCTTTTTAG	GTAGATTACG	AGCAGTAGCT	CAAACTATTT	CTTATGAGGT
<i>P. japonicus</i>	TCTCTTTTTG	GSAGATTACG	TGCTGTGGCT	CAGACTATTT	CTTATGAGGT
<i>P. longicarpus</i>	TCAATGTTAG	GTAGATTCCG	TGCTGTGGCA	CAAACTATTT	CTTATGAGGT
<i>A. franciscana</i>	TCTTTCTTAG	GAAGAATTCC	CGCAGGGCCA	CAGACTATTT	CTTATGAGGT
<i>D. pulex</i>	TCTCTTATTC	GATGTCTACG	AGSAGTAGCC	CAGACTATTT	CTTATGAGGT
<i>T. japonicus</i>	TCTATGGCAT	GAGGGTTTTA	TGCTATGG--	--GGTGGGGC	AGTGGGGTGG
<i>D. yakuba</i>	GCTTTATTAG	GGGGTTTACG	AGCTGTGGCT	CAAACTATTT	CTTATGAGGT
<i>A. gambiae</i>	GCTTTATTGG	GGGGTTTACG	CGCTGTGGCT	CAAACTATTT	CTTATGAGGT
<i>L. polyphemus</i>	GCTATATTAG	GAGCTTATCC	CGCTGTGGCT	CAAACTATTT	CTTATGAGGT

	460	470	480	490	500
<i>P. vancouveri</i>
<i>P. stylirostris</i>
<i>P. californiensis</i>
<i>P. monodon</i>
<i>P. japonicus</i>
<i>P. longicarpus</i>
<i>A. franciscana</i>
<i>D. pulex</i>
<i>T. japonicus</i>
<i>D. yakuba</i>
<i>A. gambiae</i>
<i>L. polyphemus</i>
	460	470	480	490	500
<i>P. vancouveri</i>	ARGATTAGCT	TTGATTCTAC	TATCATTCCAT	TTTTTTAGTA	GGAG-GCTTT
<i>P. stylirostris</i>	ARGATTAGCT	TTAATTITAT	CATCATTAT	TTTTTTAGTA	GGTG-GATTT
<i>P. californiensis</i>	ARGATTAGCT	TTAATTITAC	TGTCGCTCAT	TTTTTTAGTG	GGAG-GATTT
<i>P. monodon</i>	AAGAATTGCT	TTAATTITAT	TATCCTTTAT	TTTTTTAGTA	GGAG-GCTTT
<i>P. japonicus</i>	CAGACTGGCT	TTAATTITAT	TAAGATTTCT	TTTTTTGGTF	GGAG-GATTT
<i>P. longicarpus</i>	AAGATTGGCA	ATTATTITAT	TATCGTTGAT	TTTTTTGGTA	GGTG-GCTTT
<i>A. franciscana</i>	ATCCTTGATT	ATTATTATCC	TTTCCTCTTT	AAAGTTATTT	AAAA-AGCTC
<i>D. pulex</i>	AAGATTAGTT	TTAATTITGT	TTACCCCTTT	ACTAGTAACT	GTTG-GGTAT
<i>T. japonicus</i>	CAGGGTGAAT	TGAATGCTGG	TAGTACTTAG	TGTATTAGTC	AGTGGAGCC
<i>D. yakuba</i>	TAGATTAGCT	TTAATTATAT	TATCATTAT	TTTTTAATT	GGAA-GTTAT
<i>A. gambiae</i>	TAGTTTAGCA	TTAATTITAT	TAAGTTTTAT	TTTTTTAGTA	GGTA-ATTAT
<i>L. polyphemus</i>	AAGTTTGGCT	CTTATTATTT	TGTCCTCTGT	TSTTTTAGTT	GGGG-GATAT
	510	520	530	540	550
<i>P. vancouveri</i>
<i>P. stylirostris</i>
<i>P. californiensis</i>
<i>P. monodon</i>
<i>P. japonicus</i>
<i>P. longicarpus</i>
<i>A. franciscana</i>
<i>D. pulex</i>
<i>T. japonicus</i>
<i>D. yakuba</i>
<i>A. gambiae</i>
<i>L. polyphemus</i>
	510	520	530	540	550
<i>P. vancouveri</i>	GACTTAA--G	ATTATTTAGT	TTA-TATCAG	CGAGATGTST	GATTATTATG
<i>P. stylirostris</i>	GATCTAA--G	ATTATTTAGC	TTA-TATCAG	CGGATGTAT	GATTATTATG
<i>P. californiensis</i>	GATCTAA--G	ATTATTTAGT	CTA-TTCCAA	CGAGATGTST	GSTTACTATG
<i>P. monodon</i>	GATTTAT--G	CTTATTTAGA	CTG-TACCAA	CGTATGTST	GACTACTTG
<i>P. japonicus</i>	AATTTGG--A	GCTATTTAGC	TTG-TACCAA	GAAGAAGTAT	GSTTCTTSTG
<i>P. longicarpus</i>	AATTTAG--G	ATTATTTAAC	TTA-TATCAG	GAGAATTTTT	GATTATTATG
<i>A. franciscana</i>	GATCTAGAAG	GGTACCTAGT	GAATCCTCT	TACGTAGGST	GACCTCTATA
<i>D. pulex</i>	GATTTGG--G	CAGTTCTCT	TCT-TTCCAA	GAANAATTTT	GSTTTATTTT
<i>T. japonicus</i>	TATCTTTATC	TGAAGTAGGG	GTGGTTAAAC	TTTTAGGGCT	ATCTTCTTTG
<i>D. yakuba</i>	AATATAA--T	TTATTTTTTT	TAT-TACCAA	ATTATATAT	GATTTTTAAT
<i>A. gambiae</i>	AATTTT--T	AAGTTTTTAT	TTT-TATCAA	GATATGTST	GATTTATTTT
<i>L. polyphemus</i>	GACTTGT--T	GAGATTTGGG	GGT-GCTCAG	AATGATGTST	GAATGTTTTG
	560	570	580	590	
<i>P. vancouveri</i>
<i>P. stylirostris</i>
<i>P. californiensis</i>
<i>P. monodon</i>
<i>P. japonicus</i>
<i>P. longicarpus</i>
<i>A. franciscana</i>
<i>D. pulex</i>
<i>T. japonicus</i>
<i>D. yakuba</i>
<i>A. gambiae</i>
<i>L. polyphemus</i>
	560	570	580	590	
<i>P. vancouveri</i>	GTTTACTTTT	CCGCTGGCTT	TAATTTGATT	T--GCCTCTT	GTTTA
<i>P. stylirostris</i>	ATTTACTTTT	CCATTTCTTT	TAATTTGATT	C--CCTTCTT	GTTTA
<i>P. californiensis</i>	ATTTACTTTT	CCTTTGGCTT	TAATTTGATT	T--GCCTCTT	GTTTA
<i>P. monodon</i>	ATTTACTTTT	CCCTATCTTT	TAATTTGATT	T--GCCTCAT	GTTTA
<i>P. japonicus</i>	GTTGACTTTT	CCGCTGGCTG	GTCTGTGSTT	G--CCCTCTT	GTTTA
<i>P. longicarpus</i>	ATTAACITTT	CCSTTSTCTA	TAATTTGACT	T--GCCTCTT	GTTTA
<i>A. franciscana</i>	CCTATGTCTT	CCCTTAGGAT	TGTTGTGATT	T--ACCCAAA	TCTTG
<i>D. pulex</i>	TATCTTTCTT	CCGCCAGGAT	TAATTTGATT	T--ATTCTCT	GTCTT
<i>T. japonicus</i>	TTTAAITCAGG	CCCTGGTCTT	TAGCGTGAAT	AAAGATATCA	ATTTA
<i>D. yakuba</i>	TATTTTATTT	CCTATAGTTT	TAGTTTGATT	A--ACAATTT	GATTA
<i>A. gambiae</i>	TTTTTGTTTT	CCATTAGCTT	TACTCTGCTT	A--GCCTCTT	GTTTA
<i>L. polyphemus</i>	GGCTTTTTTT	CCTTTAGCCA	TTGTATGATT	T--TCATCTT	GTTTA

Figura 30. Alineamiento de secuencias nucleotídicas entre el gen parcial *NADH1* mitocondrial de *Penaeus* spp. y otros artrópodos seleccionados. Se presentan sombreadas las bases nucleotídicas con al menos 70% de identidad entre las doce especies analizadas.

Tabla XV. Identidad y distancia genética con base en el gen *NADH1* mitocondrial de *Penaeus* spp. y otros artrópodos seleccionados. Por arriba de la diagonal se presentan los valores de Identidad, mientras que por debajo de ella se muestran las Distancias Genéticas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		0.861	0.844	0.829	0.704	0.762	0.558	0.582	0.381	0.673	0.680	0.640
2	0.1526		0.849	0.832	0.694	0.755	0.555	0.577	0.392	0.701	0.716	0.642
3	0.1732	0.1680		0.825	0.694	0.750	0.582	0.577	0.384	0.678	0.683	0.647
4	0.1982	0.1946	0.2049		0.701	0.762	0.558	0.584	0.379	0.713	0.700	0.659
5	0.3878	0.4082	0.4075	0.4006		0.705	0.507	0.561	0.355	0.628	0.629	0.618
6	0.2909	0.2989	0.3099	0.2896	0.3914		0.544	0.562	0.369	0.670	0.705	0.656
7	0.7074	0.7212	0.6400	0.7101	0.8838	0.7648		0.538	0.322	0.543	0.542	0.550
8	0.6650	0.6851	0.6740	0.6655	0.7438	0.7540	0.8269		0.350	0.618	0.610	0.597
9	1.5223	1.4761	1.5391	1.5714	1.8690	1.7115	2.1769	2.0547		0.382	0.388	0.381
10	0.4666	0.4174	0.4587	0.3962	0.5829	0.4877	0.7928	0.5745	1.6187		0.808	0.671
11	0.4460	0.3779	0.4413	0.4099	0.5792	0.4179	0.7838	0.6111	1.5091	0.2299		0.663
12	0.5529	0.5505	0.5345	0.5216	0.6054	0.5106	0.7362	0.6333	1.7721	0.4915	0.5098	

1 *Penaeus vannamei*
 2 *Penaeus stylirostris*
 3 *Penaeus californiensis*
 4 *Penaeus monodon*
 5 *Panulirus japonicus*
 6 *Pagurus longicarpus*

7 *Artemia franciscana*
 8 *Daphnia pulex*
 9 *Tigriopus japonicus*
 10 *Drosophila yakuba*
 11 *Anopheles gambiae*
 12 *Limulus polyphemus*

	10	20	30	40	50
<i>P. vannamei</i>
<i>P. stylirostris</i>	--MTLIMVTN YLLLIICVLV	GVA-----F	VTLLERKILG	YIQIRKGPNK	
<i>P. californiensis</i>	--MTLIMVTN YLLLIICVLV	GVA-----F	VTLLERKILG	YIQIRKGPNK	
<i>P. monodon</i>	--MTLIMVTN YLLLIICVLV	GVA-----F	VTLLERKILG	YIQIRKGPNK	
<i>P. japonicus</i>	-MIFVVSILK YLLLIICVLV	SVA-----F	VTLMERKVLG	YIQIRKGPNI	
<i>P. longicarpus</i>	MEIFIMMLLN YLLLIICVLV	GVA-----F	VTLLERKILG	YIQIRKGPNK	
<i>A. franciscana</i>	----MITYF IFLQVVMVLV	SVA-----F	LTLLERKILG	YIQLRKGPNK	
<i>D. pulex</i>	---MIQVIL FLVVVVCVLV	GVA-----F	FTLTERKILG	YIQLRKGPNK	
<i>T. japonicus</i>	MSSNFISVSG VVLMFVGIIG	GVSGVDFEQF	WVFLRLNLIG	FVVTASLRSE	
<i>D. yakuba</i>	-MEYILSLIG SLLLIICVLV	SVA-----F	LTLLERKVLG	YIQIRKGPNK	
<i>A. gambiae</i>	MEEGEMPLYG SLLLIICVMV	GVA-----F	LTLLERKVLG	YIQIRKGPNK	
<i>L. polyphemus</i>	--SLMSFIVC YVLLIICVLV	GVA-----F	LTLLERSILG	YIQIRKGPNK	
	60	70	80	90	100
<i>P. vannamei</i>
<i>P. stylirostris</i>	VGFMGLQPPF ADAVKLFTKE	QTLFVMSNFI	PYLLSPVFSI	FVSLIIVWLV	
<i>P. californiensis</i>	VGFMGLQPPF ADAVKLFTKE	QTLFVMSNFI	PYLLSPVFSI	FVSLIIVWLV	
<i>P. monodon</i>	VGFMGLQPPF ADAVKLFTKE	QTLFVMSNFI	PYLLSPVFSI	FVSLIIVWLV	
<i>P. japonicus</i>	VGFMGLQPPF ADAVKLFTKE	QTPPTMSNFI	VYVSPVFSI	AISLIGCVVI	
<i>P. longicarpus</i>	VGFMGLQPPF ADAVKLFTKE	QTVPSMSNFI	PYLLSPVFSI	FISLIIVWLV	
<i>A. franciscana</i>	VGFLGLQPPF SDGVKLFCKE	VGLPLVSNFI	PYLVAPVFSI	FLSFFLWTLV	
<i>D. pulex</i>	VGLGGVQPPF SDAVKLFSKE	IVSPSTSNYS	AFLIAPCFSI	GLSLEMLLGI	
<i>T. japonicus</i>	SSAGGSVMEY FLVQSPYSOL	VVMILYLYPE	MFLSSTFVY	LVMFLKLVVA	
<i>D. yakuba</i>	VGLMGIPQPF CDAVKLFTKE	QTYPLSNYL	SYLSPVFSI	FLSFLVWCM	
<i>A. gambiae</i>	VGFMGLQPPF ADAVKLFTKE	QTYPLSNYL	SYLSPVFSI	FLSLLIWMCI	
<i>L. polyphemus</i>	VGFMGLQPPF SDAVSLFCSE	QSYPLSNFI	PYVSPVFSI	CLALCLWLIF	
	110	120	130	140	150
<i>P. vannamei</i>
<i>P. stylirostris</i>	PVELGLMNFQ -----	---MSTLFFL	CCTSLGVYTF	MSAGWBSNSK	
<i>P. californiensis</i>	PVELGLMNFQ -----	---MSTLFFL	CCTSLGVYTF	MSAGWBSNSK	
<i>P. monodon</i>	PVELGLMNFY -----	---MSTLFFL	CCTSLGVYTF	MSAGWBSNSK	
<i>P. japonicus</i>	PVELGLMNFN -----	---MSTLFFL	CCLSLGVYTV	MSAGWBSNSK	
<i>P. longicarpus</i>	PYEGGMVSPH -----	---MGLLFFL	CCLSLGVYTF	MSAGWBSNCK	
<i>A. franciscana</i>	PFLSYGAKFH -----	---LSFLLYY	CARVYGVYGI	MYAGWBSNSK	
<i>D. pulex</i>	PSPFHLLSFH -----	---KSVLFFL	CGLGVGVYGL	LAAGWBSNSK	
<i>T. japonicus</i>	PVHGHLKALF GVLWVETLWF	ASVQKLLPV	YGISVLYYGV	QQWGCEVIVM	
<i>D. yakuba</i>	PFPVLYLSPH -----	---LGLLFFL	CCTSLGVYTV	MYAGWBSNSK	
<i>A. gambiae</i>	PVALKLYSPH -----	---LGLLFFL	CCTSLGVYTV	MYAGWBSNSK	
<i>L. polyphemus</i>	PVPMVAVVFK -----	---LGLLFFL	CVSVPGVYAM	MYAGWBSNSK	

	160	170	180	190	200
<i>P. vannamei</i>	YSLLGSLRAV AQTISYEVS	ALIILSFIFL	VGGFDLSLFS	LYQRDV-WLL	
<i>P. stylirostris</i>	YSLLGSLRAV AQTISYEVS	ALIILSFIFL	VGGFDLSLFS	LYQRDV-WLL	
<i>P. californiensis</i>	YSLLGSLRAV AQTISYVVS	ALIILSLIFL	VGGFDLSLFS	LPQRDV-WLL	
<i>P. monodon</i>	YSLLGSLRAV AQTISYEVS	ALIILSFIFL	VGGFDLCLFS	LYQRDV-WLL	
<i>P. japonicus</i>	YSLLGSLRAV AQTISYEVS	ALIILSFIFL	VGGFNLELFS	LYQRDV-WFL	
<i>P. longicarpus</i>	YSMLGSLRAA AQTISYEVS	AIILSLIFL	VGGFNLSLFS	LYQRNF-WLL	
<i>A. franciscana</i>	YSLGSLRAA AQTISYEVS	YIILSLML	PKKLDLEGYL	VRSSYVGVPL	
<i>D. pulex</i>	YSLIGSLRGV AQTISYEVS	VLIILFELV	TVGYELGSPS	SPQENL-WFI	
<i>T. japonicus</i>	LVLVSLVSV SLSLSEVGV	KLLGLSLLFN	CGVLSVSKD	INLMPYLVV	
<i>D. yakuba</i>	YALLGSLRAV AQTISYEVS	ALIMLSFIFL	IGSYNMIYFF	YYQIYM-WFL	
<i>A. gambiae</i>	YALLGSLRAV AQTISYEVS	ALIILSFIFL	VGNYNELSPY	FYQDEV-WFI	
<i>L. polyphemus</i>	YAMLGAYRAV AQTISYEVS	ALIILSIVVL	VGSYELLESFC	GAGNEW-WRV	

	210
<i>P. vannamei</i>	WTFPLALIW FASCL
<i>P. stylirostris</i>	WTFPLALIW FASCL
<i>P. californiensis</i>	WTFPLALIW FASCL
<i>P. monodon</i>	WTFPLSLIW FASCL
<i>P. japonicus</i>	WTFPLAGVW LASCL
<i>P. longicarpus</i>	WTFPLEMHW LASCL
<i>A. franciscana</i>	YLCLPLGLW FTTL
<i>D. pulex</i>	FIFPAAGLIW FISCL
<i>T. japonicus</i>	YAMSLGVFVW WLSCL
<i>D. yakuba</i>	IILFPMGLW LTISL
<i>A. gambiae</i>	FPCFPLGLW LASCL
<i>L. polyphemus</i>	WGFPLALIW FSSCL

Figura 31. Alineamiento de secuencias aminoacídicas entre el gen parcial *NADH1* mitocondrial de *Penaeus* spp. y otros artrópodos seleccionados. Se presentan sombreadas las bases nucleotídicas con al menos 70% de identidad entre las doce especies analizadas.

Tabla XVI. Identidad y distancia genética con base en la secuencia aminoacídica deducida de la subunidad proteica *NADH1* de *Penaeus* spp. y otros artrópodos seleccionados. Por arriba de la diagonal se presentan los valores de Identidad, mientras que por debajo de ella se muestran las Distancias Genéticas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		0.974	0.968	0.974	0.778	0.779	0.541	0.538	0.167	0.649	0.687	0.606
2	0.0284		0.943	0.958	0.742	0.764	0.525	0.538	0.162	0.634	0.671	0.580
3	0.0398	0.0696		0.943	0.742	0.764	0.536	0.533	0.172	0.618	0.656	0.601
4	0.0283	0.0459	0.0693		0.768	0.784	0.546	0.544	0.167	0.659	0.697	0.606
5	0.2992	0.3387	0.3457	0.3106		0.758	0.523	0.515	0.158	0.659	0.656	0.582
6	0.2721	0.2955	0.3029	0.2683	0.3121		0.510	0.512	0.144	0.635	0.671	0.579
7	0.7673	0.8117	0.7825	0.7450	0.8240	0.8162		0.479	0.134	0.512	0.520	0.505
8	0.7610	0.7570	0.7770	0.7593	0.7938	0.7942	0.9352		0.158	0.515	0.553	0.523
9	3.7174	3.8284	3.6008	3.8006	4.0856	4.1110	4.0340	3.8058		0.162	0.167	0.148
10	0.5231	0.5538	0.5894	0.5036	0.5250	0.5501	0.8297	0.8106	3.8596		0.769	0.567
11	0.4660	0.4865	0.5299	0.4557	0.5408	0.4764	0.8223	0.7088	3.8653	0.2958		0.589
12	0.6464	0.7023	0.6730	0.6591	0.7087	0.6931	0.9338	0.8294	4.3557	0.7250	0.6981	

1 *Penaeus vannamei*

2 *Penaeus stylirostris*

3 *Penaeus californiensis*

4 *Penaeus monodon*

5 *Panulirus japonicus*

6 *Pagurus longicarpus*

7 *Artemia franciscana*

8 *Daphnia pulex*

9 *Tigriopus japonicus*

10 *Drosophila yakuba*

11 *Anopheles gambiae*

12 *Limulus polyphemus*

podrá observar claramente que la conservación de la secuencia aminoacídica es mucho mayor que la de la secuencia nucleotídica, tal y como se esperaría en acuerdo a la degeneración del código genético. Por otra parte, es interesante notar en la misma Figura (31) que todos los genes de NADH1 de los artrópodos analizados correspondieron correctamente a un aminoácido metionina en su inicio. Sin embargo, si se observan también las Figuras 21, 22, 23 y 30, podrá notarse que el codón de inicio no es el típico AUG del código genético estándar (Lewin, 1997), sino más bien ATA y ATG, que son los codones de inicio según el código genético mitocondrial de invertebrados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y TTG como un codón raro de iniciación en el quelicerado *Limulus polyphemus* (Lavrov, Boore y Brown, 2000).

La región control resultó ser hipervariable en su secuencia, por lo que el alineamiento se limitó a sólo tres especies de peneidos, dos de esta investigación (*Penaeus californiensis* y *P. stylirostris*, aunque con regiones conservadas entre ellas de hasta 83% de identidad de secuencia), junto al D-loop mitocondrial del camarón asiático *P. monodon* (Wilson *et al.*, 2000). El alineamiento por CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997) de estas secuencias nucleotídicas, así como su correspondiente secuencia consenso (Figura 32) mostró dos regiones hipervariables, posiblemente equivalentes a las regiones hipervariables I y II (Dominios A y B) reportadas para otros organismos (Taylor *et al.*, 1993; Lessinger y Azeredo-Espin, 2000; Ravago, Monge y Juinio-Meñez, 2002), flanqueando a una región mediana central de relativa conservación, además de pequeñas regiones conservadas distribuidas en el D-loop (CSE, "conserved sequence elements"), resultados que se muestran más evidentes cuando se utiliza la opción de comparación de 2-secuencias de Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Con base en la información de secuencia de la región control de peneidos generada en esta investigación, pudiera posteriormente usarse esta región no-codificante del genoma mitocondrial como marcador molecular para la identificación de individuos ("fingerprinting") de camarón, lo cual sería de gran utilidad para el análisis de pedigrí y

	10	20	30	40	50
<i>P. stylirostris</i>	TTGAAATAAC	ATTTAATATT	AACTTATAAA	ACAA-ATATA	TTTTATTTTA
<i>P. californiensis</i>	-TAATGTAA-	ACTTTTTATA	TAATTATACA	CCCT-AAATA	TAATAAAATA
<i>P. monodon</i>	-TTAATAAG	AGCATTTATT	ACATTAACA	CFAATAAGTA	TAAATAGTA
Clustal Consensus	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
	60	70	80	90	100
<i>P. stylirostris</i>	TGCA-AAGAT	TTTTGGATAT	ATCTAAGATT	TACAAAAATA	AAAATCAATT
<i>P. californiensis</i>	TGTA-ACART	TTTTGGTAC-T	GCTAAAAAAG	CGATATACCT	TTTATAAACT
<i>P. monodon</i>	TGTAFAAAT	TTTGAGATAT	AAGAATGATT	AGAGAGGTAA	CTTGAATTTA
Clustal Consensus	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
	110	120	130	140	150
<i>P. stylirostris</i>	TAGATTTACC	TACTTTTAGA	ATTAATTCCC	C-CTTTCTTT	TTTCCCCTTT
<i>P. californiensis</i>	AATAAGAAAA	AAAAGTTAGA	ATTAATTCCT	C-CCCCCTTT	TTCCCCCTTT
<i>P. monodon</i>	CTAACATTTT	TATAATTAGA	ATCTCTTCTT	GGCCCTCAAC	TTACCCCTTT
Clustal Consensus	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
	160	170	180	190	200
<i>P. stylirostris</i>	TTGTATAAAA	CTTATAATGG	ATTACAC-TA	TRACTTATAT	ACTCTAAAGC
<i>P. californiensis</i>	TTGTATAAAA	TCCYAAAGATA	ATAGTAG-CA	TAATTCTTTA	AGTTTAAATTT
<i>P. monodon</i>	TTATATAAAT	CCPAAGTTAA	TTAACATGCA	AGGGATATAT	AACTTTAC-T
Clustal Consensus	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
	210	220	230	240	250
<i>P. stylirostris</i>	CAAGCTTTAA	TTTTAGAAAT	AAATAAAACA	TTTATGGCTT	ATTTATA--T
<i>P. californiensis</i>	AGTTTTTTTT	TTTTTAGAAT	TTTGCCAAGC	TTTACTTTTA	AACTCTA--T
<i>P. monodon</i>	AAAGTTACAA	AATTGGAACA	TAATTAACAT	AACASCATCT	ATTTATAAAT
Clustal Consensus	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
	260	270	280	290	300
<i>P. stylirostris</i>	ATTTCATCT	A-TATAACTT	AGGATTTTTT	GAAAAATCCC	TCAATTTTTT
<i>P. californiensis</i>	ATTACTACCT	TCTATTTATG	AGGATTTTTT	AAAAAATCAC	TCAACTCTTT
<i>P. monodon</i>	ACTAATAGCA	CTTATTTTT-	-GATAAAAC	CAAAAAGCCC	TCSACGATTT
Clustal Consensus	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
	310	320	330	340	350
<i>P. stylirostris</i>	ATTAGAACC	ACATAAATAT	ATTAATCTA	ATTATTTTA	AAAAATTTAT
<i>P. californiensis</i>	TTTAGAACC	CCAGTTATAT	AT-ACATTT	ATTAAA-CTT	AAATATTTAT
<i>P. monodon</i>	TTTAGAACC	TGAGTTTAT	AT-ACATTTA	ATTAAAGTTT	AAATATTTAT
Clustal Consensus	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *


```

                360           370           380           390           400
P. stylirostris  TTACTTTTAT AACTAAATGA CATTATATAG TAGATATATA TTGCTATACA
P. californiensis TAACATCTAT AAATAAATGA C-TTATATAG AAGATATAGA TTGCTCT-TC
P. monodon       TAATTTATAT AATCAAAATA AATTATATGG TAGATATAAT TTGCTTA--A
Clustal Consensus * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

                410           420           430           440           450
P. stylirostris  TTATATATA- ACCTTGAANT AATTAAGTTT TAATAAGACT TTATATATCT
P. californiensis TTAAATATAT AATTAGAAGC AATTAAGTTT TAAGAAGACT TTATATATCT
P. monodon       CTATATANA- --ATAAATTT TATTAA-TTT TAANAAGATA TTATATATAT
Clustal Consensus * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

                460           470           480           490           500
P. stylirostris  GTCATTTAAT TATATATTTA TTTAAATGPG GTTAAACAAT TATTCATCT
P. californiensis GTCATTTAAT AATATATTTA TTTAAATGGG GTTAAACAAT TATTCATCT
P. monodon       ATATTTTCAT TATATATTTA TTTAAATGTA GTTAAACCTT TATTCATCT
Clustal Consensus * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

                510           520           530           540           550
P. stylirostris  ATATTAATTA TAAATGTTTA TTTAAATTA ATATGCGTTA AAATCTATTA
P. californiensis GAATSAANTT TAAATGTTTA TTTAAATGTTA ATATTCACCA AAATCTATTA
P. monodon       AAATTAATA TAAATGCTTA TATTEAATAC ATATGTATGG AGTTATATTA
Clustal Consensus * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

                560           570           580           590           600
P. stylirostris  TATTTAAAGA ATTTTATGAA GTGTAGTTAA AGAATGTTCT TTGATCATA
P. californiensis TATTTAAAGT AAATAGTAA GCGTAGTTAA AGAATGTTCT TTGATCTATA
P. monodon       TATGTAAGT AAAGTATTA ACGTAGTTAA AGAATGTTCT TTGATCTCA
Clustal Consensus * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

                610           620           630           640           650
P. stylirostris  TATAAATAGT GTAANTATTT ATAGTATTTT ATGTTGTATT TTATTTTAA
P. californiensis CATAAATAGT GTAANTATTT ATGTTGATTT A-ATTGTATT TTCATATATT
P. monodon       TATAAATAGT GTAANTATTT ATGTTCTTTT ACATTGTATT TAAAGATAAT
Clustal Consensus * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

                660           670           680           690           700
P. stylirostris  CATAAATA CTAGAGTATA CATCTAGAAC CATTTCATAT TCAATAACGG
P. californiensis CATAAATA CTAGAAATA AATCTAGATC CATTTCATAT TCAATAAGAT
P. monodon       TATAATAGA CTAGAAATA AATCTAGATC CATTTCATAT TATCTAATTT
Clustal Consensus * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

              710           720           730           740           750
P. stylirostris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
P. californiensis TATATCTTAT CAAATAAAAT AGTGTCTTCT TCTTCGAAAC TTAAATTCTA
P. monodon      TATTTTTTAT TAAATAAAAT AGTGTCTTCT TATATGAAC  TCAAATTCTA
Clustal Consensus *** * * * * ***** * * * * * * * * * *

              760           770           780           790           800
P. stylirostris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
P. californiensis GCAGATTAAA GTTTCATACA AAAAGAAGAC ACTATTTTTT ATACATATCT
P. monodon      GCAGATTASA GTTTCATATC TCAAGAAGAC ACTATTTTTT ATACAATATG
Clustal Consensus * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

              810           820           830           840           850
P. stylirostris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
P. californiensis TTTAAATATA AATTAATCTA TTTAATTAT  TAAAACGGTT TAAT--TTAA
P. monodon      ATTAATATAA TATATATATA TTTAATTAAA GAAATTTTTT TAAAAGTAAA
Clustal Consensus * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

              860           870           880           890           900
P. stylirostris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
P. californiensis ATCTTCGGTT ATACACTTTT AATTTAATAT ATTAGCCTGC TATTCTTTCT
P. monodon      ATATTCGGTT ACATAGATTT AATTTAATAT AAATAAETCG AATTACTTGT
Clustal Consensus * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

              910           920           930           940           950
P. stylirostris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
P. californiensis TTTTTTCATT TAATCTAANA GTCTTTAAAC TCCAATATCG CAATTTAATG
P. monodon      TTTTTTAATA ACCTGTAAGA TTTTTTAGTG AACCAAATCA CAATTTASTG
Clustal Consensus * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

              960           970           980           990           1000
P. stylirostris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
P. californiensis CAGAGTAATA AGCTTATAGT CTTTATTTAA GACATTTTTT ATTTCTTAAC
P. monodon      CAATAAAGA AATTATTTT  TGTATTTPG ATTAATTTTT -TACTTTTAT
Clustal Consensus ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

P. stylirostris  ....
P. californiensis ATAA
P. monodon      ATAA
Clustal Consensus ****

```

Figura 32. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de la región control de *Penaeus* spp. Se incluye también la secuencia consenso de las tres especies analizadas.

mejoramiento genético de este crustáceo de importancia comercial [Apéndice 3 (Gutiérrez-Millán, Yepiz-Plascencia y Villalpando-Canchola, 2002)].

Relaciones Filogenéticas de *Penaeus* spp.

Si se analiza el dendrograma obtenido por Máxima Probabilidad, con base en distancias genéticas del gen *12S_rRNA* mitocondrial, en acuerdo con el modelo de Kimura de 2 parámetros, de los camarones del Pacífico *P. californiensis*, *P. stylirostris* y *P. vannamei* y otros artrópodos seleccionados (Figura 33), podrá notarse que los camarones de télico abierto (*P. vannamei* y *P. stylirostris*) quedaron agrupados formando un solo clado y éstos, a su vez, formando otro clado con *P. californiensis* y *P. monodon*. Estas agrupaciones están muy bien soportadas en el análisis, ya que sus valores de bootstrapping rebasan siempre el valor de 900/1000, valores semejantes a los 89/100 y 94/100 que agrupan *P. vannamei* y *P. stylirostris* en la filogenia propuesta por Baldwin *et al.* (1998), con base en una porción del gen mitocondrial *COI*.

En el mismo árbol filogenético propuesto (Figura 33) puede observarse también que los crustáceos decápodos no-peneidos (*Pagurus longicarpus* y *Panulirus japonicus*) quedaron también agrupados con un valor bien soportado de bootstrapping (724/1000) y que junto con los peneidos y el cladóceros *Artemia franciscana*, conforman el clado general de los crustáceos (523/1000). Sorprendentemente, el otro crustáceo cladóceros *Daphnia pulex* no quedó incluido dentro del grupo de los crustáceos, sino más bien agrupado con otro crustáceo copépodo *Tigriopus japonicus* (627/1000) cuya secuencia mostró desde un inicio grandes diferencias -las mayores distancias genéticas con respecto al resto de los artrópodos- e incluso polaridad de transcripción totalmente distinta a los otros organismos analizados. Este clado *Daphnia-Tigriopus* se unió a la base del árbol, el cual había sido enraizado utilizando como grupo extremo ("outgroup") a *Limulus polyphemus*. Lo más interesante de esta propuesta filogenética, es la agrupación entre los

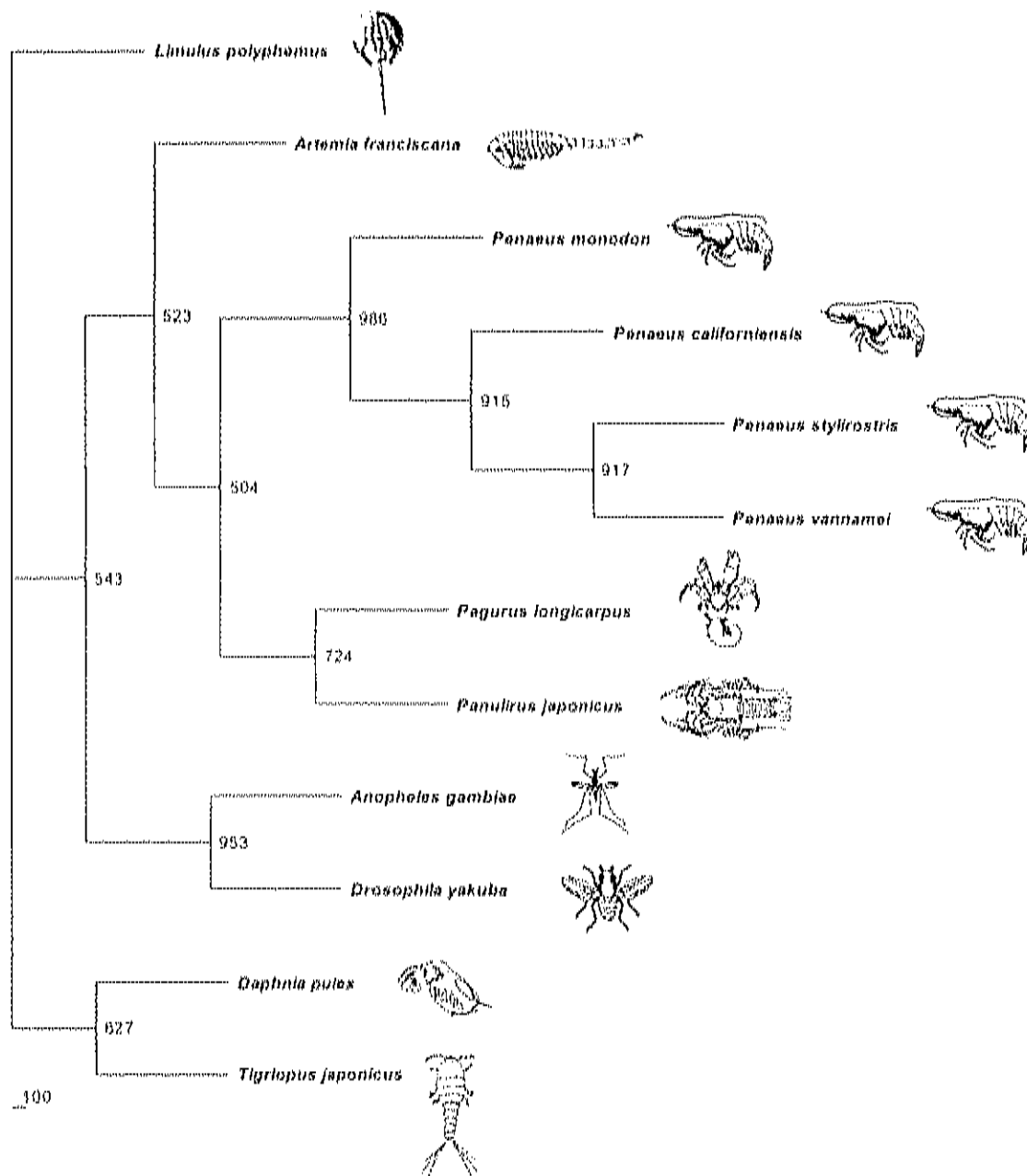


Figura 33. Relaciones Filogenéticas de *Penaeus* spp. y otros artrópodos seleccionados con base en el gen mitocondrial *12SrRNA*. Dendrograma obtenido por Máxima Probabilidad con base en distancias genéticas de este gen, en acuerdo con el modelo de Kimura de 2-parámetros, de los camarones del Pacífico *P. californiensis*, *P. stylirostris* y *P. vannamei* y otros artrópodos seleccionados. Los números en las bases de los nodos son valores de bootstrap, con base en 1000 réplicas.

insectos hexápodos (*Drosophila yakuba* y *Anopheles gambiae*) con los crustáceos (543/1000), lo cual sería un resultado coincidente con la conclusión de García-Machado *et al.* (1999) acerca de parafilia en el grupo de los crustáceos.

Cuando se analizan las relaciones filogenéticas entre estos peneidos y el resto de los artrópodos, con base en el gen *16SrRNA* mitocondrial (Figura 34) se aprecia que el árbol resultante es más acorde a clasificaciones taxonómicas convencionales, sin sorpresas ni re-arreglos, en el cual aparecen los peneidos agrupados (995-1000/1000), formando un solo clado (838/1000) con el resto de los crustáceos investigados (incluyendo a *Tigriopus japonicus*) y agrupando también a los cladóceros *Daphnia pulex* y *Artemia salina*. El clado bien soportado de los peneidos muestra valores de bootstrapping semejantes a los 96-97/100 reportados por Maggioni *et al.* (2001), con base en el mismo gen *16SrRNA* mitocondrial, para los clados dentro de subgéneros de peneidos y entre subgéneros *Farfantepenaeus* y *Litopenaeus* (93-70/100; 98-95/100). Por otro lado, el análisis filogenético realizado con base en este gen (Figura 34) agrupó correctamente a los insectos *Drosophila yakuba* y *Anopheles gambiae* (1000/1000), pero los excluyó del grupo de los crustáceos, colocándolos en la base del árbol, enraizado al artrópodo quelicerado *Limulus polyphemus*.

Una propuesta filogenética interesante (Figura 35), sin duda alguna, es la resultante del análisis del gen *NADHI* mitocondrial, el cual por su característica de funcionalidad a nivel proteína trae consigo un pool de valiosa información evolutiva. En esta topología –aunque con valores de bootstrapping inferiores a los estimados para los genes ribosomales mitocondriales– aparecen agrupados los peneidos y decápodos, formando un solo clado de crustáceos, al igual que en las filogenias propuestas con base en los genes *12SrRNA* y *16SrRNA*, pero excluyendo a los cladóceros del patrón general de crustáceos. Lo que resulta fascinante es encontrar de nuevo el clado Hexápoda-Crustácea, lo cual vendría a sustentar la hipótesis de la no-monofilia de los crustáceos (García-Machado *et*

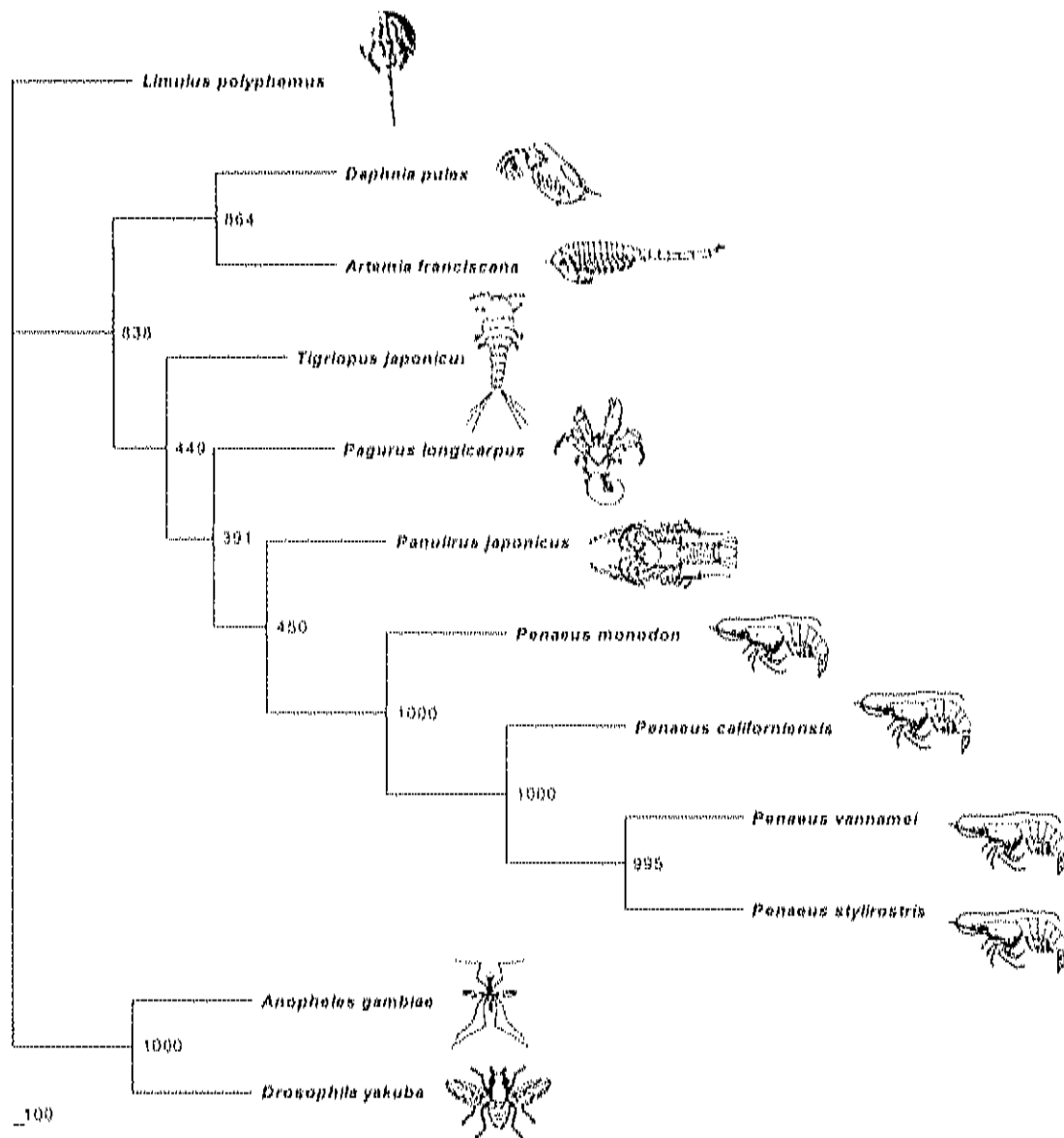


Figura 34. Relaciones Filogenéticas de *Penaeus* spp. y otros artrópodos seleccionados con base en el gen mitocondrial *16SrRNA*. Dendrograma obtenido por Máxima Probabilidad con base en distancias genéticas de este gen, en acuerdo con el modelo de Kimura de 2-parámetros, de los camarones del Pacífico *P. californiensis*, *P. stylirostris* y *P. vannamei* y otros artrópodos seleccionados. Los números en las bases de los nodos son valores de bootstrap, con base en 1000 réplicas

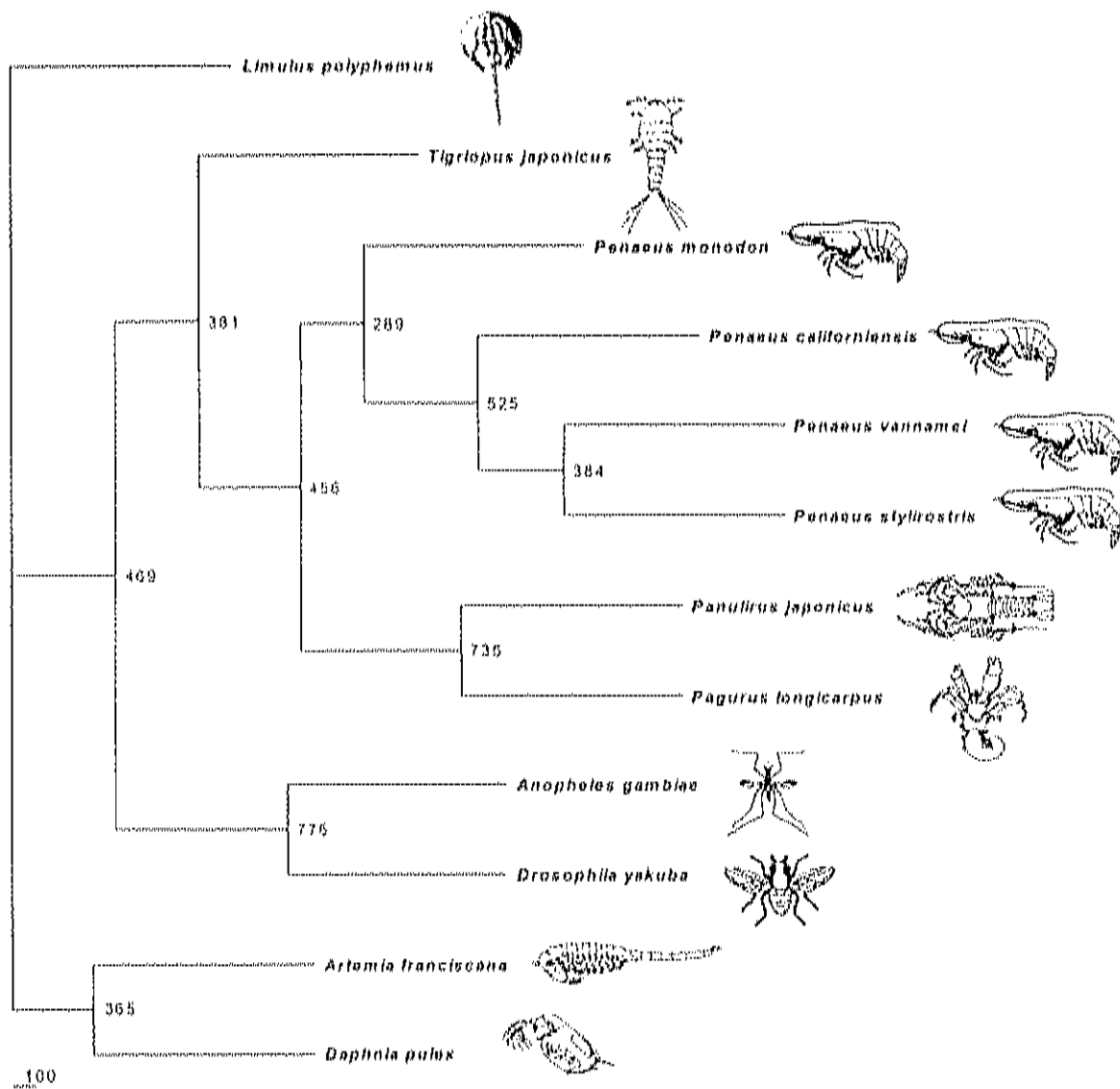


Figura 35. Relaciones Filogenéticas de *Penaeus* spp. y otros artrópodos seleccionados con base en el gen mitocondrial *NADH1*. Dendrograma obtenido por Máxima Probabilidad con base en distancias genéticas de este gen, en acuerdo con el modelo de Kimura de 2-parámetros, de los camarones del Pacífico *P. californiensis*, *P. stylirostris* y *P. vannamei* y otros artrópodos seleccionados. Los números en las bases de los nodos son valores de bootstrap, con base en 1000 réplicas

al., 1999). La propuesta de este clado no convencional llamado "Panerustacea" no es nueva (Zrzavý y Stys, 1997), pero cada vez son más las evidencias morfológicas - incluyendo el sistema nervioso- y moleculares (enfoque multigénico y arreglo génico mitocondrial) que sustentan esta hipótesis (Regier y Shultz, 1997; Shultz y Regier, 2000; Giribet, Edgecombe y Wheeler, 2001).

No cabe duda de que el enfoque multigénico siempre debería ser preferido sobre el análisis de un solo gen -si esto fuese posible- para evaluar variabilidad genética y estimar relaciones filogenéticas, ya sea mediante el análisis de genomas completos mitocondriales (Ballard, 2000a,b), su orden génico (Boore *et al.*, 1995; Boore y Brown, 1998), o bien mediante el uso de genes concatenados mitocondriales (Miya y Nishida, 2000). No obstante, para realizar correctamente un análisis filogenético apropiado, deberá preferirse siempre el uso de sitios individuales extraídos separadamente del genoma y no la inclusión en el análisis de sitios contiguos, lo cual violaría una suposición básica de la metodología bootstrapping (Cummings, Otto y Wakeley, 1995).

CONCLUSIONES

- El aislamiento de DNA mitocondrial produjo moléculas en suficiente cantidad y calidad para ser utilizado como templado en reacciones de amplificación por PCR, incluso a partir de tejidos preservados en etanol por largo tiempo.
- Los genes mitocondriales presentan regiones conservadas a través de diferentes taxa, lo cual permite el diseño de primers específicos que producen amplificaciones por PCR robustas y reproducibles.
- La amplificación por PCR del fragmento 16SrRNA-12SrRNA mtDNA mostró patrones de bandeo consistentes con la hipótesis de heteroplasmia/pseudogenes.
- Se obtuvo la amplificación por PCR del genoma mitocondrial completo de las tres especies de *Penaeus* del Pacífico mexicano, analizadas en este estudio. No existe evidencia publicada sobre este tipo de amplificaciones en peneidos.
- El análisis de RFLP del genoma mitocondrial completo es susceptible de ser utilizado como huella genética (“fingerprinting”) de camarón, para muestras frescas.
- El análisis de PCR-RFLP de los genes mitocondriales de esta investigación mostró excelentes resultados para ser aplicado en autenticación e identificación de especies en muestras de alimentos a base de camarón.

- Se obtuvieron y secuenciaron exitosamente 47 clones de mtDNA, correspondientes a 2 genes ribosomales, 5 tRNAs, 1 gen codificante para una subunidad proteica (NADH1) y la región control (D-loop), en las especies de camarón de la presente investigación.
- Las estructuras secundarias predichas de los tRNAs investigados mostraron la conservación de la típica estructura de trébol ("cloverleaf"), mediante mutaciones compensatorias en sus secuencias y apareamientos inusuales.
- La región control del mtDNA de los penecidos analizados presentó dos regiones hipervariables, equivalentes a las regiones HVRI y HVRII (dominios A y B) de otros organismos. Esta región presentó variabilidad genética suficiente para ser potencialmente empleada como huella genética molecular ("fingerprinting") para la identificación de individuos.
- El orden génico de la porción mitocondrial NADH1-tRNA^{Met} de las especies de *Penaeus* de este estudio, resultó semejante al de *P. monodon*, de los insectos *Drosophila yakuba* y *Anopheles gambiae*, así como del quelicerado *Limulus polyphemus*.
- La polaridad transcripcional de los genes analizados mostró ser una característica de gran valor informativo en estudios filogenéticos.
- Los mtDNAs de los camarones *P. vannamei* y *P. stylirostris*, ambos de tético abierto y pertenecientes al subgénero *Litopenaeus*, presentaron siempre un mayor porcentaje de identidad nucleotídica, con respecto al camarón de tético cerrado *P. (Farfantepenaeus) californiensis*.

- La variabilidad molecular del mtDNA entre los subgéneros *Litopenaeus* y *Farfantepenaeus* resultó ser equiparable a la existente entre géneros de la familia Homínidae, lo cual soporta la propuesta de Pérez-Farfante y Kensley (1997) de elevar a nivel de género los subgéneros de *Penaeus* antes descritos.
- Las topologías filogenéticas obtenidas para los genes mitocondriales investigados mostraron siempre el clado de *Litopenaeus*, junto al de *Farfantepenaeus*, y el de estos penéidos estrechamente relacionado al resto de los crustáceos decápodos.
- La filogenia de los genes mitocondriales 12SrRNA y NADH1 soportan la hipótesis del grupo Pancrustacea, formado por el clado Crustacea/Hexápoda.

- La variabilidad molecular del mtDNA entre los subgéneros *Litopenaeus* y *Farfantepenaeus* resultó ser equiparable a la existente entre géneros de la familia Homínidae, lo cual soporta la propuesta de Pérez-Farfante y Kensley (1997) de elevar a nivel de género los subgéneros de *Penaeus* antes descritos.
- Las topologías filogenéticas obtenidas para los genes mitocondriales investigados mostraron siempre el clado de *Litopenaeus*, junto al de *Farfantepenaeus*, y el de estos penéidos estrechamente relacionado al resto de los crustáceos decápodos.
- La filogenia de los genes mitocondriales 12SrRNA y NADH1 soportan la hipótesis del grupo Pancrustacea, formado por el clado Crustacea/Hexápoda.

APÉNDICE I

Gutiérrez-Millán LE, Peregrino-Uriarte AB, Sotelo-Mundo R, Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G (2002) Sequence and conservation of a rRNA and tRNA^{Val} mitochondrial genes fragment from *Penaeus californiensis* and comparison with *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*. *Marine Biotechnology* 4:392-398

Sequence and Conservation of a rRNA and tRNA^{Val} Mitochondrial Gene Fragment from *Penaeus californiensis* and Comparison with *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*

Luis Enrique Gutiérrez-Millán,^{1,2} Alma Beatriz Peregrino-Uriarte,¹ Rogerío Sotelo-Mundo,¹ Francisco Vargas-Albores,¹ and Gloria Yepiz-Plascencia^{1,*}

¹Marine Biotechnology Laboratory, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, P.O. Box 1735, Hermosillo, Son., 83000, Mexico

²DICTES, Universidad de Sonora, Ruelas y Niños Héroes s/n, Hermosillo, Son., 83000, Mexico

Abstract: *Penaeus californiensis* is an important species for shrimp fisheries in the Pacific Ocean and has recently been described as a potential cultured species, mainly through the winter season in subtropical regions. A fragment of the mitochondrial 12S rRNA-tRNA^{Val}-16S rRNA genes from *P. californiensis* was sequenced and compared with the corresponding regions from *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*. Purified mitochondrial DNA was used for polymerase chain reaction amplification with primers for 12S and 16S rRNA genes. A 1379 ± 1-bp fragment was obtained, including 90% 16S rRNA, tRNA^{Val}, and a portion of 12S rRNA, cloned, and sequenced. Genetic distances were calculated according to the Kimura 2-parameter distance model, and maximum-likelihood analysis was applied with 1000 bootstrap replications. Sequence identity of *P. californiensis* with both *P. vannamei* and *P. stylirostris* was 0.88, while for *P. vannamei* and *P. stylirostris* the identity was 0.92. Maximum-likelihood analysis grouped *P. vannamei* and *P. stylirostris* separately from *P. californiensis*.

Key words: mitochondrial DNA, penaeid shrimp, 16S rRNA, 12S rRNA.

INTRODUCTION

In general, progress in penaeid genetic and biotechnological research has been hampered because of a lack of knowledge on fundamental aspects of penaeid biology. Data for 27 species of penaeid shrimp are now available, including those important for fisheries and aquaculture, as reviewed

by Benzie (2000). Most studies on penaeid genetics have used allozymes, although the number of studies using mitochondrial DNA, random amplified polymorphic DNA (RAPDs), or microsatellites is growing rapidly (reviewed in Benzie, 2000). Information on the shrimp *Penaeus californiensis* is very limited. Mitochondrial DNA has been widely used for evolution and population studies owing to the high evolution rate and to the predominantly maternal inheritance (Avisa, 1994). Partial sequences of penaeid mitochondrial genes for 16S rRNA (García-Machado et al., 1993; Maggioni et al., 2001), 12S rRNA (Palumbi and Benzie, 1991) and cytochrome oxidase I (COI) (Palumbi

Received July 26, 2001; accepted December 4, 2001.

*Corresponding author: telephonic: 1 52(662) 289-24 90; fax: 1 52(662) 289 24 95; e-mail: yepiz@conadef.com.mx

and Benzie, 1991; Baldwin et al., 1998; Gusmão et al., 2000) are known. Also available are approximately half of the mtDNA from *Penaeus notialis* (García-Machado et al., 1996) and the complete genome from the giant tiger prawn *Penaeus monodon* (Wilson et al., 2000). However, there are no reports on *P. californiensis* genes, neither nuclear or mitochondrial.

The yellowleg shrimp *P. californiensis*, distributed in the Pacific Ocean from the San Francisco Bay (United States) to Ecuador (Rodríguez de la Cruz, 1976), is one of the main commercial shrimp species captured in this region. In addition, *P. californiensis* grows better in temperate climates than tropical species such as *P. vannamei* and *P. stylirostris* and has been considered as a potential option for shrimp farming (Martínez-Córdova et al., 1998, 1999). Differences of *P. californiensis* were only recently reported from 3 populations from the Gulf of California describing 12.5% polymorphism and a 0.023–0.037 expected heterozygosity based on allozyme studies (de la-Rosa-Vélez et al., 2000), but there are no reports on DNA sequences useful for distinguishing among populations of the same species or distinguishing it from morphologically similar shrimps.

In this report, we present the cloning and sequencing of a 1.38-kb fragment containing partial *16S*, *12S rRNA*, and complete *tRNA^{val}* genes from the shrimp *P. californiensis*, and its comparison with *P. vannamei* and *P. stylirostris*.

MATERIALS AND METHODS

Mitochondrial DNA Preparation

Shrimps were obtained from the Northwest of Mexico (Acaualarvas, DICTUS Universidad de Sonora, CIBNOR), transported to the laboratory, and kept in aerated artificial sea water, 36 ppt, with feeding ad libitum. The pleopods were dissected and used immediately or preserved in 90% ethanol until use.

Mitochondrial DNA was isolated according to Carr and Griffith (1987), with an added salt-extraction step (Aljanabi and Martínez, 1997). One gram of pleopods was homogenized in 15 ml of 0.25 M sucrose, 10 mM Tris, 5 mM Na₂ EDTA (pH 7.0) using a Polytron PT-2100 (Kinematic AG, Switzerland) at 11,000 rpm for 5 seconds. The homogenate was centrifuged for 5 minutes at 1000 g, 5°C, and then the supernatant at 23,500 g for 20 minutes 3°C. The pellet, containing mitochondria, was resuspended

in 2.4 ml of 10 mM Tris, 1 mM Na₂EDTA (pH 7.4), lysed by adding 20 µl of 7 Navidet P₄O RNase treated (60 µg, 30 minutes at 42°C), and proteinase K digested (1/20 vol of 2 mg/ml proteinase K, 30 minutes, 65°C). Then, 1/6 vol of 6 M NaCl was added and centrifuged at 17,500 g, 10 minutes, 4°C. The DNA supernatant was extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol and chloroform-isoamyl alcohol. The DNA was isopropanol precipitated and resuspended in TE.

Polymerase Chain Reaction

Isolated mtDNA (10 ng) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) in a 50-µl reaction, containing 200 µM of each dNTP, 3.75 mM MgCl₂, 1 µM of each primer, 1x PCR buffer (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4) and 2.5 U of *Taq* polymerase (Life Technologies, Rockville, Md.). Based on previous reports (Clary and Wolstenholme, 1985; Kocher et al., 1989; Palumbi and Benzie, 1991; Simon et al., 1991, 1994), 2 primers corresponding to internal sequences of the small (12S) and large (16S) mitochondrial ribosomal RNA genes were designed: 16SF 5'-CGGGTCTGAATTCAGATCA-3' (19-mer) and 12SR1 5'-AGACATACGGCGGTGGCTCT-3' (20-mer). PCR was carried out in a PTC-200 DNA Engine (MJ Research, Waltham, MA) as follows: 94°C, 3 minutes, 55°C, 1 minute, and 72°C, 3 minutes; 94°C, 1 minute; 42°C, 1 minute, and 72°C, 3 minutes, followed by 33 cycles of 94°C, 1 minute; 52°C, 1 minute, and 72°C, 3 minutes, and an extension of 72°C for 10 minutes. Amplified DNA was analyzed on 1.2% agarose gels stained with ethidium bromide (Sambrook et al., 1989).

Cloning and Sequencing

The PCR products were cloned in pCR2.1 TOPO TA vector and plasmid DNA was purified (Sambrook et al., 1989), and sequenced by the dideoxy chain-termination method (Sanger et al., 1977) using T7 Thermosequenase in an ALF DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.) in our facilities or by the Sequencing Facility of the University of Arizona. Internal primers were designed to extend the sequencing.

Sequence Analysis

Nucleotide searches were done using the BLAST algorithm at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Web site. The sequences were aligned using the program

CLUSTAL X (Thompson et al., 1997), and the secondary structure of *tRNA^{Val}* was predicted using RnA Viz (De Rijk and De Wachter, 1997). The genetic distances were calculated in agreement with the Kimura 2-parameter model, using DNADIST program in the PHYLIP 3.5c package (Felsenstein, 1993), whereas maximum-likelihood analysis was done with the DNAML program of the same computational package. The data set was bootstrapped for 1000 replications to consider the robustness of the internal nodes.

RESULTS AND DISCUSSION

PCR Amplification, Cloning, and Sequencing

A fragment of approximately 1.4 kb was amplified by PCR from *P. californiensis*, *P. stylirostris*, and *P. vannamei* using the primers described. The complete nucleotide sequence of the fragments was determined from both strands of the 3 shrimp species (Figure 1). Eliminating the primer sequence, the fragments had very similar lengths, 1379 ± 1 bp, a little larger than the 1304-bp corresponding fragment from *Drosophila yakuba* (Clary and Wolstenholme, 1985), the 1182 bp from *Artemia franciscana* (Valverde et al., 1994), and the 1322 bp from *Daphnia pulex* (Crease, 1999), and basically identical to (2 to 4 bp longer than) *P. monodon* (Wilson et al., 2000). Thus, this fragment length may be penaeid specific (Table 1), with a characteristic extended length, compared to other crustaceans and *Drosophila*.

Base Composition and Sequence Analysis

The G+C contents are very similar in the penaeids, *P. californiensis* (28.52%), *P. vannamei* (28.79%), *P. stylirostris* (28.7%), and *P. monodon* (23.5%), lower than in *Daphnia* and *Artemia* (Table 1). Inferred from other reported mtDNA sequences, these fragments contained 62 bp of the 3'-end of the 12S *rRNA* (nucleotides 1–62), the complete *tRNA^{Val}* (72 bp, nucleotides 63–134), a 3-bp intergenic spacer (AAA), and the 16S (nucleotide 138–1379 \pm 1) (Figure 1). GenBank accession numbers AY046912 (*P. californiensis*), AY046913 (*P. stylirostris*), and AY046914 (*P. vannamei*). The *P. monodon* mtDNA sequence has approximately 91.1% of the 16S *rRNA*, 100% of the *tRNA^{Val}*, and 7.3% the 12S *rRNA*. The gene order is the same in the 3 shrimp species, 16S *rRNA*, *tRNA^{Val}*, and 12S *rRNA*, as in *P. monodon* (Wilson et al., 2000), *P. notialis* (García-Machado

et al., 1996), *A. franciscana* (Valverde et al., 1994), *Limulus polyphemus* (Lavrov et al., 2000), and *D. pulex* (Crease, 1999), and different from *Pagurus longicarpus*, in which the *tRNA^{Val}* gene is located in the 3'-end of the 16S and in the complementary strand (Hickerson and Cunningham, 2000).

The sequence is highly conserved. The highest identity is between *P. vannamei* and *P. stylirostris*, then *P. californiensis* has similar identity to *P. vannamei* and *P. stylirostris* and slightly lower identity to *P. monodon* (Wilson et al., 2000); the identity with other crustaceans such as *Pagurus longicarpus* (Hickerson and Cunningham, 2000), *A. franciscana* (Valverde et al., 1994) and *D. pulex* (Crease, 1999) is lower. Open thelycum shrimp belonging to the subgenera *Litopenaeus* (*P. vannamei* and *P. stylirostris*) have the highest identity (0.92), similar to 0.904 previously reported for partial sequences of the 12S *rRNA* (Palumbi and Benzie, 1991) and to *P. notialis* and *P. schmitti* with identities of 0.89 for a fragment of the 16S *rRNA* (García-Machado et al., 1993). The fragment from the closed thelycum shrimp *P. californiensis* has an identity of at least 0.881 with the above-mentioned shrimps. The identity is a little lower with *P. monodon* (0.838), *Pagurus longicarpus* (0.672), and even lower with *A. franciscana* (0.551) (Valverde et al., 1994).

The *tRNA^{Val}* sequence identity between the penaeid shrimp ranges from 95% to 97% and keeps the predicted cloverleaf secondary structure, since changes in a specific position appear to be compensated in the corresponding base forming the stems. The pair 6-66 in the acceptor stem is C:G in *P. californiensis* and T:A in *P. vannamei*, *P. stylirostris*, and *P. monodon*; the pair 49-63 in the T Ψ C stem is G:U in *P. californiensis*, G:C in *P. vannamei*, and *P. stylirostris* and A:U in *P. monodon*; the pair 50-62 in this same arm is U:A in *P. californiensis*, *P. vannamei*, and *P. stylirostris*, and only in *P. monodon* is it changed to U:C. Finally, there is a C in position 17 in *P. stylirostris*, while the other 3 penaeids have a U. The anticodon is UAC, as in other crustaceans (García-Machado et al., 1996; Hickerson and Cunningham, 2000; Lavrov et al., 2000; Wilson et al., 2000). The nucleotide distance matrix is presented in Table 2 below the diagonal based on the model of nucleotide substitution by the 2-parameter method (Kimura, 1980). The smallest distances were found between *P. vannamei* and *P. stylirostris* with a value of 0.0823, slightly smaller than 0.11 to 0.19 reported for the *COI* gene (Baldwin et al., 1998), but higher than 0.038 reported for a partial sequence of the 16S *rRNA* (Maggioli et al., 2001).

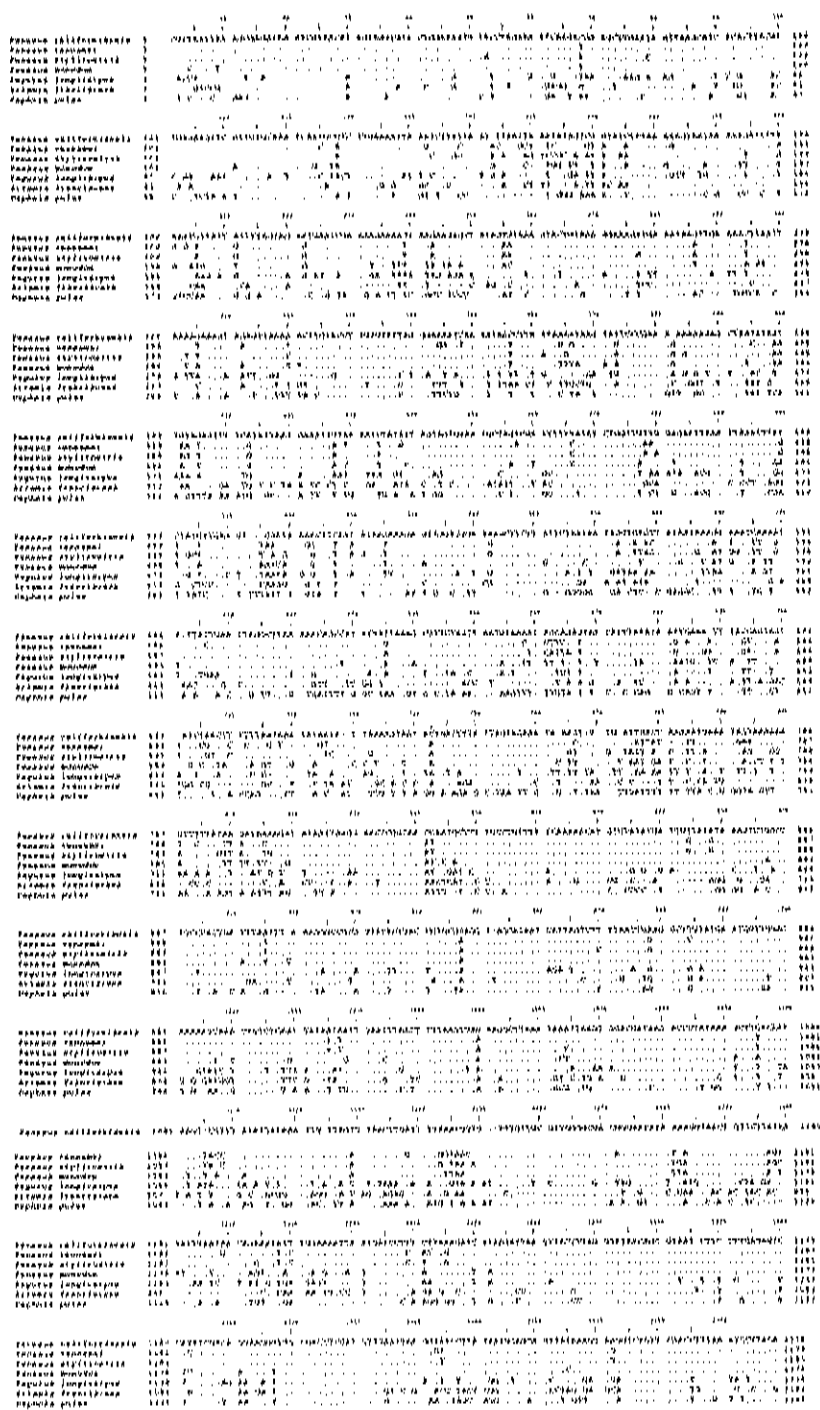


Figure 1. Nucleotide sequence alignment of the 12S-tRNA^{Val}-16S fragment from *Penaeus californiensis*, *Penaeus stylirostris*, and *Penaeus vannamei* with other crustaceans: *Pagurus longicarpus* (GenBank accession number AF150756), *Artemia franciscana* (X69067), *Daphnia pulex* (NC_000844), and *Penaeus monodon* (AF217843).

The genetic distance between the 2 open thelycum shrimps from the subgenera *Liopenaeus*, *P. vannamei* and *P. stylirostris* (Pérez-Farfante and Kensley, 1997), and *P. californiensis* is 0.1223 to 0.1258, in the range previously reported among penaeid subgenera for the rCOI gene

(Baldwin et al., 1998), while the distance between *P. monodon* and the 3 Pacific penaeid shrimp species was 0.1724 to 0.1799, but comparable to 0.125 to 0.113 for a fragment of the 16S rRNA (Baldwin et al., 1998). Finally, the penaeids studied here and *P. monodon* had, on aver-

Table 1. Base Composition and Length of the Fragment Containing the 16S-12S Ribosomal mtDNA from *Penaeus californiensis*, *Penaeus stylirostris*, and *Penaeus vannamei* and comparison with Other Crustacean Homologous Genes*

Crustacean	Size (bp)	Base Composition (%)					G+C
		A	C	G	T	A+T	
<i>Artemia franciscana</i>	1182	34.01	16.16	19.37	30.46	64.47	35.53
<i>Daphnia pulex</i>	1322	32.60	12.18	19.21	36.01	68.61	31.39
<i>Pagurus longicarpus</i>	1336	39.52	7.86	15.64	36.98	76.50	23.50
<i>Penaeus monodon</i>	1376	37.24	10.10	16.13	36.56	73.76	26.24
<i>Penaeus californiensis</i>	1378	38.61	10.23	18.29	32.87	71.48	28.52
<i>Penaeus stylirostris</i>	1380	37.61	10.29	18.41	33.70	71.30	28.70
<i>Penaeus vannamei</i>	1379	37.85	10.59	18.20	33.36	71.21	28.79

*References to published sequences are given in the text.

Table 2. Identity Sequence Matrix (above the diag.) and Genetic Distances by the Two-Parameter Method of Kimura (below the diag.) of the 16S-12S mtDNA Fragment*

	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>Artemia franciscana</i>		0.504	0.520	0.556	0.556	0.558	0.563
2 <i>Daphnia pulex</i>	0.5928		0.565	0.610	0.594	0.609	0.610
3 <i>Pagurus longicarpus</i>	0.5287	0.6194		0.673	0.668	0.673	0.672
4 <i>Penaeus monodon</i>	0.4750	0.5194	0.4059		0.841	0.838	0.836
5 <i>Penaeus californiensis</i>	0.4736	0.5580	0.4121	0.1724		0.880	0.882
6 <i>Penaeus stylirostris</i>	0.4704	0.5202	0.4076	0.1777	0.1256		0.920
7 <i>Penaeus vannamei</i>	0.4573	0.5182	0.4074	0.1799	0.1223	0.082	

*References to published sequences are given in the text.

age, a distance of 0.4083 to *Pagurus longicarpus* and 0.4990 to other crustaceans used as outgroups (*A. franciscana* and *D. pulex*).

Genetic Relationships

The topology resulting from maximum-likelihood analysis (Figure 2) shows that *P. vannamei* and *P. stylirostris* form a clade, with a bootstrap value of 0.975. The yellowleg shrimp *P. californiensis*, however, is located in a node with a bootstrap of 0.993. Even though the subdivision of the genus *Penaeus* has been proposed (Pérez-Farfante and Kensley, 1997) and used, some authors consider that such a subdivision is not necessary for a genus containing only 27 registered species, or that there is not enough molecular evidence to support this proposal (Baldwin et al., 1998). Although some molecular evidence has been used to support this argument, there is not clear enough definition in quantitative terms of the characteristics or distances to accept the new genus. Certainly, molecular data for a few

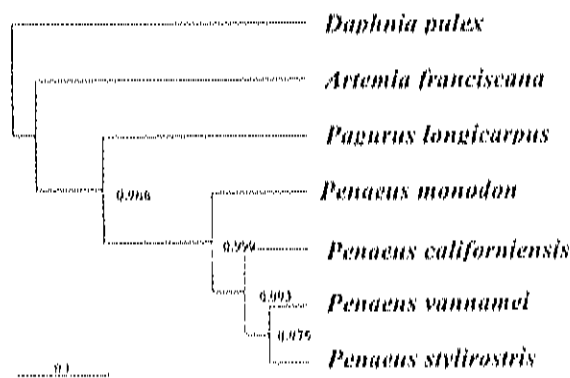


Figure 2. Phenogram obtained by maximum-likelihood based on genetic distances (scale) from Kimura 2-parameter method of the 3 Pacific shrimp species *Penaeus californiensis*, *Penaeus stylirostris*, and *Penaeus vannamei*, the Asian shrimp *Penaeus monodon*, the decapod *Pagurus longicarpus*, and the branchiopods *Daphnia pulex* and *Artemia franciscana*. Values on the base nodes are percentages of bootstrap, based on 1000 replicates.

genes is not enough, and additional information including biochemical, physiologic, and morphologic data is required in order to provide new tools to find and define a systematic shrimp classification.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Padilla-Sánchez, for technical support, J. Hernández-López and E. Villalpando-Canchola for help in the collection and maintenance of the shrimps, Dr. Gopan Murugan (CIBNOR, La Paz, BCS) for help with the maximum-likelihood analysis, and María Islas-Osuna for critical reading of the manuscript. This work was partially funded by SIMAC, grant 970106030, and CONACYT, grant 34348-B. L.E. Gutiérrez-Millán received a fellowship from CONACYT.

REFERENCES

- Aljanabi, S.M., and Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25:4692-4693.
- Awise, J.C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York, N.Y., Chapman & Hall.
- Baldwin, J.D., Bass, A.L., Bowen, B.W., and Clark, W.H.J. (1998). Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. *Mol Phylogenet Evol* 10:399-407.
- Benzie, J.A.H. (2000). Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquaculture Res* 31:95-119.
- Carr, S.M., and Griffith, O.M. (1987). Rapid isolation of animal mitochondrial DNA in a small fixed-angle rotor at ultrahigh speed. *Biochem Genet* 25:385-390.
- Clary, D.O., and Wolstenholme, D.R. (1985). The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *J Mol Evol* 22:252-271.
- Crease, T.J. (1999). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene* 233:89-99.
- de la Rosa-Vélez, J., Escobar-Fernández, R., Correa, E., Maqueda-Cornejo, M., and de la Torre-Cueto, J. (2000). Genetic structure of two commercial penaeids (*Penaeus californiensis* and *P. stylirostris*) from the Gulf of California, as revealed by allozyme variation. *Fish Bull* 98:674-683.
- De Rijn, P., and De Wachter, R. (1997). Rna Viz, a program for the visualization of RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res* 25:4679-4684.
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Seattle: University of Washington.
- García-Machado, E., Dennebouy, N., Oliva-Suarez, M., Mounolou, J.C., and Monnerot, M. (1993). Mitochondrial 16S-rRNA gene of two species of shrimps: sequence variability and secondary structure. *Crustaceana* 65:279-286.
- García-Machado, E., Dennebouy, N., Suarez, M.O., Mounolou, J.C., and Monnerot, M. (1996). Partial sequence of the shrimp *Penaeus nobilis* mitochondrial genome. *C R Acad Sci Paris — Sci la Vie/ life Sci* 319:473-486.
- Gusmão, J., Lazoski, C., and Sôze-Cava, A.M. (2000). A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. *Mar Biol* 137:435-446.
- Hickerson, M.C., and Cunningham, W.C. (2000). Dramatic mitochondrial gene rearrangements in the hermit crab *Pagurus longicarpus* (Crustacea, Anomura). *Mol Biol Evol* 17:639-644.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating the evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Palumbo, S., and Villablanca, F.X. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6196-6200.
- Layrov, D.V., J.L. B., and Brown, W.M. (2000). The complete mitochondrial DNA sequence of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Mol Biol Evol* 17:813-824.
- Maggioli, R., Rogers, A.D., Maclean, N., and D'Incao, F. (2001). Molecular phylogeny of Western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* shrimp based on mitochondrial 16S partial sequences. *Mol Phylogenet Evol* 18:66-73.
- Martínez-Córdova, L.R., Porchas-Cornejo, M.A., Villarreal-Colmenares, H., and Calderón-Pérez, J.A. (1998). Winter culture of yellowleg shrimp *Penaeus californiensis* in aerated ponds with low water exchange. *J World Aquacult Soc* 29:120-124.
- Martínez-Córdova, L.R., Porchas-Cornejo, M.A., Villarreal-Colmenares, H., Campaña-Torres, A., Pérez-Alvidrez, L.A., and Naranjo-Parameo, J. (1999). Alternate culture of white shrimp *Litopenaeus vannamei*, and yellowleg shrimp, *Farfantepenaeus californiensis*, during the summer-fall and fall-winter season in Sonora, Mexico. *J Appl Aquacult* 9:96-73.
- Palumbi, S.R., and Benzie, I. (1991). Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimps. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1:27-34.

- Pérez-Farfante, L., and Kensley, B. (1997). *Penaeoid and Scygestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Families and Genera*. The Netherlands: Backhuys Publishers.
- Rodríguez de la Cruz, M.C. (1976). Sinopsis biológica de las especies del género *Penaeus* del Pacífico Mexicano, Guaymas, México: Instituto Nacional de la Pesca.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminator inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467.
- Simon, C., Franke, A., and Martin, A. (1991). The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification. In: *Molecular Techniques in Taxonomy*, Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B., and Young, I.P.A. (eds.), NATO Series, 329-355.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., and Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87:651-701.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, E., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997). The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24:4876-4882.
- Valverde, J.R., Batuecas, B., Moratilla, C., Marco, R., and Gárcese, R. (1994). The complete mitochondrial DNA sequence of the crustacean *Artemia franciscana*. *J Mol Evol* 39:400-408.
- Wilson, K., Cahill, V., Ballment, E., and Benzie, J. (2000). The complete sequence of the mitochondrial genome of the Crustacean *Penaeus monodon*: are Malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods? *Mol Biol Evol* 17:863-874.

APÉNDICE 2

Gutiérrez-Millán I.E, Vega-Heredia S, Clavero-Salas A, Peregrino-Uriarte AB, Sánchez-Padilla M, Yepiz-Plascencia G (2002) PCR-RFLP de mtDNA como Marcador Molecular Potencial para la Autenticidad de la Identificación de Camarón IV Congreso del Noroeste en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora

**PCR-RFLP de mtDNA como Marcador Molecular Potencial para la Autenticidad
de la Identificación de Camarón**

^{1,2} Luis Enrique Gutiérrez-Millán, ^{1,3} Sarahí Vega-Heredía,
^{1,4} Alejandra Clavero-Salas, ¹ Alma B. Peregrino-Uriarte,
¹ Maribel Sánchez-Padilla y ¹ Gloria Yepíz-Plascencia^{*}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

²Depto. de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora

³Instituto Tecnológico de Los Mochis

⁴Instituto Tecnológico de Sonora

*Autor para correspondencia: Dra. Gloria Yepíz-Plascencia
Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.P. 1735
Hermosillo, Son
83000, Mexico
Tel: +52 (662) 289-24-00
Fax: +52 (662) 280-00-55
e-mail: gyepiz@cascabel.ciad.mx

Categoría: Estudiantil
Modalidad: Cartel

Hermosillo, Sonora

Septiembre, 2002

RESUMEN

El consumo de camarón en la región del Pacífico mexicano se sustenta preferencialmente en la producción natural o cultivada de tres especies de penéidos: *Penaeus vannamei*, *P. stylirostris* y *P. californiensis*. La identificación y origen de estas especies de crustáceos durante todo el ciclo de vida -y su posterior procesamiento como alimento- reviste especial importancia, tanto en términos de fisiología, sanidad, genética y conservación del recurso, como en términos económicos para la industria acuícola y alimentaria. El DNA mitocondrial (mtDNA) presenta características idóneas para ser utilizado en identificación de especies de interés alimentario, por requerirse cantidades mínimas de tejido y poderse recuperar aún de muestras procesadas, degradadas o mal preservadas. El objetivo de esta investigación fue demostrar la potencialidad del mtDNA como marcador molecular para autenticidad de especies de camarón a través del análisis de PCR-RFLP (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción de un fragmento de DNA producido mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa). El mtDNA se aisló usando modificaciones de métodos publicados. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para regiones conservadas de los genes ribosomales mitocondriales 16S y 12S. Los fragmentos de mtDNA obtenidos por PCR fueron purificados y digeridos con enzimas de restricción y analizados por electroforesis en geles de agarosa. Los patrones de restricción fueron especie-específicos, apropiados para su uso en la autenticidad de la identificación de especies de camarón.

INTRODUCCIÓN

La autenticación de alimentos es una demanda creciente a nivel mundial para certificar el origen de la especie –vegetal o animal- que se desea vender o consumir. Las leyes internacionales requieren la correcta identificación y etiquetado del nombre científico de la especie que se oferta al consumidor y éste tiene el derecho a ser verazmente informado del producto que está por consumir (Bossier, 1999). En el mercado de alimentos es frecuente encontrar especies morfológicamente similares, cuya identificación correcta es difícil aún para personal entrenado, tal es el caso de especies procesadas que se expenden enlatadas, alumadas e incluso especies en las cuales se comercializan sólo partes de sus cuerpos, tales como el callo, filete o abdomen, de moluscos, peces y crustáceos, respectivamente. Estos alimentos han sido frecuentemente vendidos al consumidor de manera fraudulenta, debido a las diferencias en calidad y costo de las especies involucradas. Así, se vuelve imprescindible contar con técnicas rápidas y confiables para la identificación de las especies comestibles que se ofertan al consumidor, no sólo para detectar productos fraudulentos, sino para evitar también el consumo de especies amenazadas, protegidas o en veda.

La identificación de especies de mariscos no sólo se limita al producto ya procesado, sino incluso a material biológico fresco cuya autenticación abarca incluso desde las etapas tempranas del desarrollo, especialmente de aquellas especies acuáticas sujetas a cultivo, como es el caso del camarón. Por "camarón" conocemos a un grupo de especies de crustáceos penéidos, cuya similitud morfológica limita seriamente la correcta identificación taxonómica, más aún en sus estadios de postlarva. En la región noroeste de México, se consumen preferencialmente tres especies de camarón: camarón blanco *Penaeus vannamei*, camarón azul *P. stylirostris* y camarón café *P. californiensis*. ¿Cómo identificar correctamente estas tres especies de camarón?

Las metodologías más empleadas a la fecha para la identificación de especies de mariscos –especialmente peces- son el enfoque isoeléctrico de proteínas del músculo

(IEF) y electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE), las cuales han provisto patrones de bandeo con la suficiente resolución para diferenciar especies estrechamente relacionadas (Lundstrom, 1981, 1983; Hamilton, 1982), específicamente en muestras frescas. Sin embargo, cuando se aplica a muestras cocinadas o procesadas, los resultados ya no son tan claros (An *et al.*, 1989), (Etienne *et al.*, 2000). El principal inconveniente del análisis de proteínas es la pérdida de solubilidad cuando las muestras que analizan provienen de alimentos térmicamente procesados (Sotelo *et al.*, 1993). Muchas proteínas son lábiles al calor, pierden su actividad biológica rápidamente, son sujetas a modificaciones en diversos tejidos y su presencia está en función de las células que estén involucradas en el análisis (Carrera *et al.*, 1999).

Una metodología alternativa y sumamente prometedora para la identificación de especies de mariscos es el análisis del ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) (Bartlett & Davison, 1991; 1992). Entre los diversos tipos de análisis de DNA destacan el estudio de microsatélites, RAPD, secuenciación y PCR-RFLP. Los dos primeros se limitan a DNA nuclear (nDNA), mientras que los dos últimos pueden ser aplicados tanto a nDNA, como a DNA mitocondrial (mtDNA). El manejo del camarón, que no siempre es el más adecuado debido a las altas temperaturas de la región, implica que cuando se intenta la extracción de DNA se enfrenta el investigador frecuentemente a un serio problema de degradación, debido a que ésta es directamente proporcional a la temperatura y al tiempo de conservación. Además, esta misma temperatura no óptima permite la acción continua de enzimas DNAsas que aceleran el proceso de degradación del DNA. De esta forma, para el análisis de autenticación de camarón se recomienda el uso de mtDNA, cuyas moléculas son muchísimo más pequeñas que el nDNA y por lo tanto menos propensas a degradación, además de estar presentes en las células animales en una proporción de copias mucho mayor con respecto al nDNA. Así, el mtDNA presenta características idóneas para ser utilizado en identificación de especies de interés alimentario, por requerirse cantidades mínimas de tejido y poder recuperarse aún de muestras procesadas, degradadas o mal preservadas.

El genoma mitocondrial es una molécula circular de doble cadena altamente variable en la secuencia de DNA, pero conservada en el contenido de sus genes. El mtDNA de metazoarios en general presenta dos genes de RNA ribosomal (rRNA) –subunidad grande (16S) y subunidad pequeña (12S)-, los genes de 22 RNAs de transferencia (tRNA) y de 13 subunidades proteicas, además de una región control hipervariable. (Wolstenholme, 1992). De estos genes, los más conservados son aquellos que codifican para rRNA, lo cual permite diseñar iniciadores específicos para PCR, basándose en las secuencias de otros organismos reportadas en bases de genes a nivel mundial.

La metodología de PCR-RFLP ha sido exitosamente empleada en la identificación de especies comestibles, tales como caracol (Borgo *et al.*, 1996), salmón y trucha (Carrera *et al.*, 1999) y merluza (Quinteiro *et al.*, 2001). En crustáceos, el enfoque de RFLP aplicado a extractos de mtDNA total fue aplicado por (Bouchon *et al.*, 1994) para diferenciar las especies asiáticas *Penaeus monodon* de *Penaeus japonicus*, pero a la fecha no existe información alguna para diferenciar peneidos de importancia comercial en América por PCR-RFLP. Sin embargo, existen informes de aplicación exitosa de RFLP empleados por (García *et al.*, 1994) y por (Klinbunga *et al.*, 1999) para diferenciar poblaciones de *P. vannamei* y *P. monodon*, respectivamente, lo cual hace suponer su posible aplicación para diferenciar también especies de *Penaeus*.

El objetivo de esta investigación fue demostrar la potencialidad del mtDNA como marcador molecular en estudios de autenticidad de especies de camarón a través del análisis de PCR-RFLP de esta molécula.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de mtDNA. Los camarones vivos de las tres especies fueron transportados al laboratorio y mantenidos en acuarios con agua salina artificial y aireación hasta su uso, o bien congelados a -70°C o los pleópodos conservados en etanol al 95%. El mtDNA se obtuvo siguiendo los métodos de (Carr & Griffith, 1987) y (Aljanabi & Martínez, 1997) y modificados por (Padilla-Sánchez, 1999). Se pesó 1g de pleópodos y se homogeneizó en un POLYTRON PT-MR 2100 con 15 ml de solución amortiguadora sacarosa-TE (0.25 M sacarosa, 60 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl y 1.5 NaCl, pH, 8). Después se centrifugó el homogeneizado a $1000 \times g$ por 30 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada (GS-15R, Beckman) para separar el núcleo y restos celulares. El sobrenadante con las mitocondrias se resuspendió en 15 ml TE-buffer especial para mitocondrias (60 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl y 1.5% NaCl, pH 8.0) y se centrifugó a $20,000 \times g$ por 20 minutos a 4°C (Avanti 30, Beckman). El pellet mitocondrial se resuspendió en 980 μl de solución amortiguadora TE (60 mM EDTA, 30 mM Trizma-Base y 1.5 % NaCl, pH 8), con la adición de 20 μl de Igepal y 10 μl de RNasa (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se incubó 30 minutos a 42°C . Posteriormente, a esta solución se le agregó 1/20 volumen de proteinasa K (2 mg/ml).

Las proteínas fueron extraídas con NaCl 6 M (para 450 μl de muestra, se agregan 300 μl de NaCl 6 M) y precipitadas por centrifugación a $12,800 \times g$ por 30 minutos a 4°C . El mtDNA fue extraído con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Para precipitar el mtDNA se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se resuspendió en TE (Sambrook *et al.*, 1989).

Se determinaron la concentración y pureza del mtDNA por espectrofotometría de luz ultravioleta, usando un espectrofotómetro Lambda Bío 20 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) y registrando la absorbancia de la solución a las longitudes de onda de 260 y 280 nm. La calidad del mtDNA se analizó en geles de agarosa al 1.2 % en bufer TAE 1X

(solución concentrada 50X: 242G Tris-Base, 57.1 ml ácido acético glacial, 100 ml .5 M EDTA, pH 8.0 en un litro).

PCR. Para llevar a cabo las reacciones de PCR, se diseñaron oligonucleótidos específicos (iniciadores) con base en la secuencia de mtDNA de crustáceos depositadas en el GenBank, de los genes 12S rRNA y 16S rRNA. El mtDNA fue usado como templado (10 ng) para PCR en un volumen de reacción total de 50 μ l, conteniendo 2.5 mM de cada uno de los dNTP's, 25 mM MgCl₂, 1 μ M de oligonucleótidos y 2.5 U de Taq, siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante (Perkin Elmer). Las amplificaciones de mtDNA fueron realizadas en un termociclador MJ Research programado para 1 ciclo inicial de alta astringencia de 94°C durante 3 min, 55°C por 1 min y 72°C por 3 min, seguido de 1 ciclo de baja astringencia de 94°C durante 1 min, 42°C por 1 min y 72°C por 3 min. El programa de PCR continúa después con 33 ciclos de astringencia media, con 94°C durante 1 min, 52°C por 1 min y 72°C por 3 min, para finalizar con una extensión final de 72°C durante 10 min. Para la amplificación del genoma mitocondrial se diseñaron iniciadores especiales del gen *16S rRNA* y se ensayó el protocolo de PCR en acuerdo con lo recomendado por (Hwang *et al.*, 2001). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio, visualizados con luz ultravioleta y fotografiados (Kodak Digital Science). Los fragmentos de PCR fueron purificados en solución y de geles de agarosa por Gene-Clean (Bio101, La Jolla, CA).

PCR-RFLP. Los productos de PCR fueron digeridos con enzimas de restricción (Sambrook *et al.*, 1989), produciendo patrones de fragmentos característicos. Para este tratamiento se utilizaron: *HindIII*, *EcoRI*, *Sau3AI*, *MboI*, *MspI* y *RsaI* con los amortiguadores y las condiciones recomendadas por el fabricante (Life Technologies, GIBCO BRL; Gaithersburg, MD).

La reacción de digestión se preparó en un microtubo de 1.7 ml estéril, donde se agregaron 2 μ l de la reacción de PCR, 1 μ l de buffer, 0.5 μ l de la enzima seleccionada, llevado a un volumen final de 10 μ l con 6.5 de agua bidestilada estéril e incubada a 37°C

por toda la noche. Las muestras digeridas se analizaron en geles de agarosa al 1.2 %, siguiendo la metodología descrita anteriormente. La clonación, secuenciación y análisis del fragmento 16SF-12SR fueron descritos con anterioridad por (Gutiérrez-Millán *et al.*, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aislamiento de mtDNA de pleópodos de camarón en las tres especies estudiadas resultó exitoso, obteniéndose DNA de excelente calidad, en suficiente cantidad y en forma siempre reproducible en todos los experimentos (Fig. 1). La adición de "salting out" para la precipitación de proteínas (Aljanabi & Martínez, 1997) favorece en gran medida la obtención de mtDNA de excelente pureza para ser usado en PCR-RFLP. El tamaño observado de aproximadamente 16 000 bp corresponde a lo informado en la literatura para otras especies de crustáceos, tales como *Daphnia pulex* (Crease, 1999), *Artemia franciscana* (Valverde *et al.*, 1994), *Pagurus longicarpus* (Hickerson & Cunningham, 2000) y *Penaeus monodon* (Wilson *et al.*, 2000).

La amplificación por PCR del gen 12S ribosomal mitocondrial de camarón fue exitoso (Figura 2A), habiéndose obtenido un fragmento de 650 bp para las tres especies de penéidos estudiados, lo cual coincide con el fragmento homólogo de *Penaeus monodon* (Wilson *et al.*, 2000). Este fragmento fue sometido a un análisis de restricción con las enzimas *HindIII* y *Mbol* y los patrones obtenidos no fueron suficientemente diferentes para ser distinguidos en las condiciones del análisis y discernir entre las tres especies, pero sí para diferenciar entre el subgénero *Litopenaeus* (*P. vannamei* y *P. stylirostris*) y el subgénero *Farfantepenaeus* (*P. californiensis*). Se recomienda clonar y secuenciar este fragmento, de donde se pudiese obtener un análisis de restricción *in silico* para proponer nuevas enzimas que pudiesen resultar más informativas en la identificación de las tres especies estudiadas.

El amplicón obtenido de los iniciadores 16SF y 12SR resultó ser de 1.4 Kb (Fig. 2B) en las tres especies, aunque es importante resaltar que en la amplificación de las tres especies pudo observarse frecuentemente una segunda banda de menor peso molecular, lo cual podría representar la amplificación de pseudogenes mitocondriales presentes en el genoma nuclear, tal y como lo han reportado (Ishiguro *et al.*, 2002) y (Yuan *et al.*, 1999). El fragmento 16SF-12SR fue sometido a digestión con *HindIII*, *Mbol*, *MspI* y

RsaI, lográndose observar patrones de bandeos especie-específicos (Figura 2C y Tabla I). La identificación de especies por PCR-RFLP fue inequívoca al emplear este amplicón. La relevancia de este marcador molecular reside en su capacidad de generar siempre resultados consistentes a pesar de posibles problemas de degradación de DNA, a diferencia de lo que sucede con el análisis de proteínas (An *et al.*, 1989). Por la importancia que reviste este fragmento para su uso potencial en autenticidad de camarón, se clonó, secuenció y analizó su composición y estructura (Gutiérrez-Millán *et al.*, 2002). Así mismo, la información generada permitió calcular las distancias genéticas en acuerdo con el modelo de Kimura de dos parámetros (Kimura, 1980), encontrándose una mayor similitud genética (0.92) entre los camarones de tético abierto (*P. vannamei* y *P. stylirostris*), en comparación con *P. californiensis* y *P. monodon* (Tabla II), como era de esperarse.

En muestras frescas y congeladas de camarón azul *P. stylirostris* y café *P. californiensis* fue posible lograr la amplificación total del DNA mitocondrial, habiéndose diseñado para ello iniciadores específicos internos del gen de la subunidad grande ribosomal o 16 S (Figura 3A,B), lo cual representa el primer informe en la literatura de este tipo de amplificación para camarones peneidos. El producto de PCR digerido con *EcoRI* (Figura 3C) lográndose con ello obtener un patrón especie-específico. Se recomienda la clonación y caracterización completa de los genomas mitocondriales de las tres especies de camarón económicamente importantes en el Pacífico mexicano, para su posible uso como marcador molecular en la identificación de estas especies. Posteriores estudios de restricción permitirán definir las enzimas más apropiadas para caracterizar el genoma mitocondrial completo de camarón.

CONCLUSIONES

La extracción de mtDNA es fácil, rápida y confiable para la generación de material biológico apropiado para estudios de autenticidad de alimentos.

El gen de la subunidad pequeña ribosomal mitocondrial (*12S rRNA*) amplificado por PCR podría resultar un excelente marcador molecular para identificación de especies de camarón, por su tamaño pequeño (650 bp) y fácil obtención a pesar de analizar muestras degradadas de DNA, como en el caso de alimentos procesados.

El amplicón 16SF-12SR resultó ser un excelente marcador molecular especie-específico para la identificación genética de especies de camarón.

Se propone el análisis de PCR-RFLP del genoma mitocondrial total amplificado de camarón como un análisis *ad hoc* para el análisis de autenticidad de muestras frescas o congeladas. Su validación requiere aún de estudios posteriores.

Proyecto financiado por CONACYT (34348-B)

BIBLIOGRAFÍA

- Aljanabi, S. M. & Martínez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* **25**, 4692-4693.
- An, H., Marshall, M. R., Otwell, W. S. & Wei, C. I. (1989). Species identification of raw and boiled shrimp by a urea gel isoelectric focusing technique. *J. Food Sci.* **54**, 233.
- Bartlett, S. E. & Davison, W. (1991). Identification of *Thunnus tuna* species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**, 309-317.
- Bartlett, S. E. & Davison, W. (1992). FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Biotechniques*, **3**, 408-411.
- Borgo, R., Souty-Grosset, C. & Bouchon, D. (1996). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. *J. Food Sci.* **61**, 1-4.
- Bossier, P. (1999). Authentication of seafoods products by DNA patterns. *J. Food Sci.* **64**, 189-193.
- Bouchon, D., Souty-Grosset, C. & Raimond, R. (1994). Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *P. japonicus* Bate. *Aquaculture*, **127**, 131-144.
- Carr, S. M. & Griffith, O. M. (1987). Rapid isolation of animal mitochondrial DNA in a small fixed-angle rotor at ultrahigh speed. *Biochem. Genet.* **25**, 385-390.
- Carrera, E., T., García, A., Céspedes, I., González, A., Fernández, P. E., Hernández & Martín, R. (1999). Salmon and trout analysis by PCR-RFLP for identity authentication. *J. Food Sci.* **64**, 410-413.
- Crease, T. J. (1999). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene*, **233**, 89-99.
- Étienne, M., Jerome, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kundiger, R., Mendes, R., Costa, H., Perez-Martin, R., Pineiro-Gonzalez, C., Craig, A., Mackie, I., Malmheden Yman, I., Ferm, M., Martinez, I., Jessen, F., Smelt, A. & Lutén, J. (2000). Identification of fish species after cooking by SDS-PAGE and urea IEF: a collaborative study. *J. Agric Food Chem* **48**, 2653-8.
- García, D. K., Faggart, M. A., Rhoades, L., Aleivar-Warren, A., Wyban, J. A., Carr, W. H., Sweeney, J. N. & Ebert, K. M. (1994). Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Molecular Marine Biology & Biotechnology* **3**, 270-280.
- Gutiérrez-Millán, L. E., Peregrino-Uriarte, A. B., Sotelo-Mundo, R., Vargas-Albores, F. & Yepiz-Plascencia, G. (2002). Sequence and conservation of a rRNA and tRNA^{Val} mitochondrial gene fragment from *Penaeus californiensis* and comparison with *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*. *Mar. Biotechnol.* **4**, 392-398.

- Hamilton, W. D. (1982). Fish species identification by thin layer agarose isoelectric focusing and densitometric scanning. *J Assoc Off Anal Chem*, **65**, 119-22.
- Hickerson, M. C. & Cunningham, C. W. (2000). Dramatic mitochondrial gene rearrangements in the hermit crab *Pagurus longicarpus* (Crustacea, Anomura). *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 639-644.
- Hwang, U. W., Park, C. J., Yong, T. S. & Kim, W. (2001). One-Step PCR Amplification of Complete Arthropod Mitochondrial Genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **19**, 345-352.
- Ishiguro, N., Nakajima, A., Horinuchi, M. & Shinagawa, M. (2002). Multiple nuclear pseudogenes of mitochondrial DNA exist in the canine genome. *Mamm Genome*, **13**, 335-40.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating the evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111-120.
- Klinbunga, S., Penman, D. J., McAndrew, B. J. & Tassanakajon, A. (1999). Mitochondrial DNA Diversity in Three Populations of the Giant Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. *Marine Biotechnology*, **1**, 113-121.
- Lundstrom, R. C. (1981). Rapid fish species identification by agarose gel isoelectric focusing of sarcoplasmic proteins. *J Assoc Off Anal Chem*, **64**, 38-43.
- Lundstrom, R. C. (1983). Identification of Pacific rockfish (Sebastes) species by isoelectric focusing. *J Assoc Off Anal Chem*, **66**, 974-80.
- Padilla-Sánchez, M. (1999) Fragmentos de los genes mitocondriales de rRNA de los camarones *Litopenaeus vannamei*, *Farfantepenaeus californiensis* y *Litopenaeus stylirostris*, Tesis de Licenciatura, Universidad de Sonora, Hermosillo.
- Quinteiro, J., Vidal, R., Izquierdo, M., Sotelo, C. G., Chapela, M. J., Perez-Martin, R. I., Rehbein, H., Hold, G. L., Russell, V. J., Pryde, S. E., Rosa, C., Santos, A. T. & Rey-Mendez, M. (2001). Identification of Hake species (Merluccius Genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *J Agric Food Chem*, **49**, 5108-14.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sotelo, C., Piñeiro, C., Gallardo, J. M. & Pérez-Martín, R. I. (1993). Fish species identification in seafood products. *Trends Food Sci. Technol.* **4**, 395-401.
- Valverde, J. R., Batuecas, B., Moratilla, C., Marco, R. & Garesse, R. (1994). The complete mitochondrial DNA sequence of the crustacean *Artemia franciscana*. *Journal of Molecular Evolution*, **39**, 400-408.
- Wilson, K., Cahill, V., Ballment, E. & Benzie, J. (2000). The complete sequence of the mitochondrial genome of the Crustacean *Penaeus monodon*: Are Malacostracan Crustaceans more closely related to Insects than to Branchiopods? *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 863-874.
- Wolstenholme, D. R. (1992). *Animal mitochondrial DNA: structure and evolution* (New York, Academic Press).

Yuan, J. D., Shi, J. N., Meng, G. X., An, L. G. & Hu, G. X. (1999). Nuclear pseudogenes of mitochondrial DNA as a variable part of the human genome. *Cell Res.* **9**, 281-290.

Tabla 1. Estimación de los tamaños totales de los fragmentos mitocondriales 16SF-12SR amplificados por PCR, con base en los patrones de restricción obtenidos con las enzimas *Hind III*, *Mbo I*, *Msp I* y *Rsa I* para las tres especies de peneidos analizadas.

Especie	<i>Enzimas de restricción</i>				<i>Promedio</i>
	<i>Hind III</i>	<i>Mbo I</i>	<i>Msp I</i>	<i>Rsa I</i>	
<i>P. vannameli</i>	1515	1448	1448	1328	1438
<i>P. stylirostris</i>	1534	1448	1448	1403	1458
<i>P. californiensis</i>	1374	1326	1264	1408	1343

Tabla 2. Matriz de identidad de secuencias (por arriba de la diagonal) y distancias genéticas de Kimura por el método de dos parámetros (por abajo de la diagonal) del fragmento 16S-12S ribosomal mtDNA para las especies de crustáceos *Artemia franciscana*, *Daphnia pulex*, *Pagurus longicarpus*, *Penaeus monodon*, *P. californiensis*, *P. stylirostris* y *P. vannamei*.

		1	2	3	4	5	6	7
1	<i>Artemia franciscana</i>		0.504	0.520	0.556	0.556	0.558	0.563
2	<i>Daphnia pulex</i>	0.5928		0.565	0.610	0.594	0.609	0.610
3	<i>Pagurus longicarpus</i>	0.5287	0.6194		0.673	0.668	0.673	0.672
4	<i>Penaeus monodon</i>	0.4750	0.5194	0.4059		0.841	0.838	0.836
5	<i>Penaeus californiensis</i>	0.4736	0.5580	0.4121	0.1724		0.880	0.882
6	<i>Penaeus stylirostris</i>	0.4704	0.5202	0.4076	0.1777	0.1258		0.920
7	<i>Penaeus vannamei</i>	0.4573	0.5182	0.4074	0.1799	0.1223	0.082	

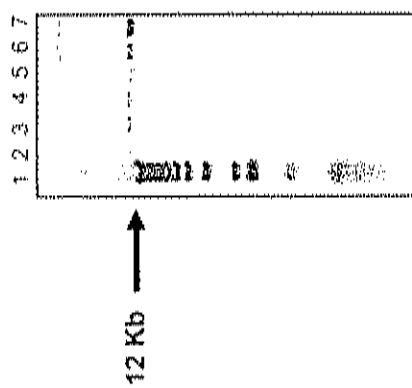


Fig. 1. Aislamiento de mtDNA de camarón blanco *Penaeus vannamei* (carriles 2 al 7). 1, 1 Kb Ladder. Los aislamientos de camarón azul *P. stylirostris* y camarón café *P. californiensis* mostraron la misma calidad y reproducibilidad.

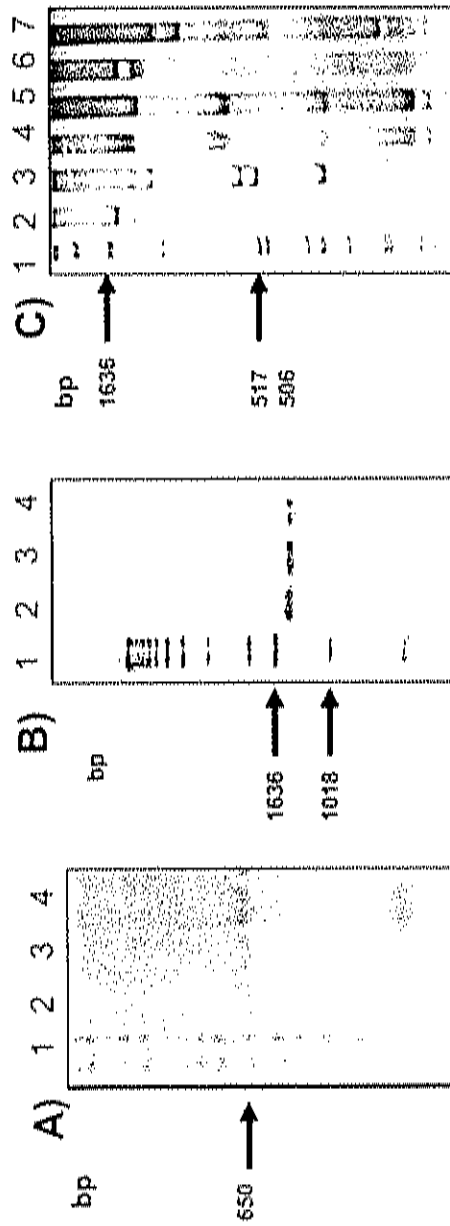


Fig. 2. (A) PCR del fragmento 12SF-12SR2 mtDNA de camarones. Carril 1, 1 Kb DNA Ladder Plus; Carril 2, *P. vannamei*; carril 3, *P. stylirostris*; carril 4, *P. californiensis*. (B) PCR del fragmento 16SF-12SR mtDNA de *P. stylirostris*. Carril 1, 1 Kb DNA Ladder Plus; Carriles 2-4, *P. stylirostris*. Las amplificaciones de *P. vannamei* y *P. californiensis* mostraron el mismo resultado. (C) PCR-RFLP del fragmento 16SF-12SR de *P. californiensis* con las enzimas *Hind III*, los *Sac* 3.1I y *Msp* I y *Rsa* I (carriles 3 al 7, respectivamente). En el carril 2 se presenta el fragmento sin digerir, mientras que el carril 1 muestra el estándar 1 Kb Ladder. Los patrones de los camarones blanco *P. vannamei* y azul *P. stylirostris* mostraron patrones diferentes especie-específicos (ver Tabla I).

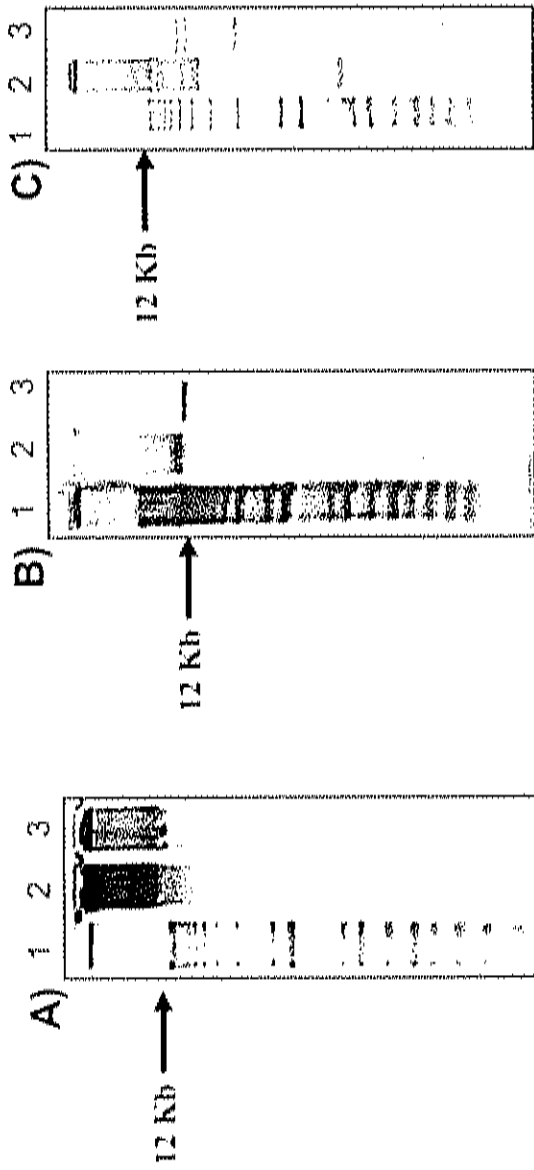


Fig. 3. (A) PCR del genoma mitocondrial total de *P. stylirostris* (carril 2) y *P. californiensis* (carril 3). (B) Purificación del genoma mitocondrial total amplificado por PCR de *P. stylirostris* (carril 2) y *P. californiensis* (carril 3). (C) PCR-RFLP del mtDNA amplificado de *P. stylirostris* (carril 2) y de *P. californiensis* (carril 3) y digerido con la enzima *EcoRI*. En los carriles 1 de los tres geles se presenta el estándar 1 Kb Ladder Plus.

APÉNDICE 3

Yepíz-Plascencia G, Gutiérrez-Millán LE, Villalpando Canchola E (2002) Marcadores moleculares y genes: utilidad potencial para la camaronicultura. In: Martínez-Córdova LR (ed) Camaronicultura. Avances y Tendencias. AGT Editor S.A., p 111-135

Camaronicultura

Avances y tendencias

Luis Rafael Martínez Córdova



AGT EDITOR S.A.

Marcadores moleculares y genes: utilidad potencial para la camaronicultura

**Gloria Yepiz Plascencia, Luis Enrique Gutiérrez Millán
y Enrique Villalpando Canchola**

Introducción

¿Genética en camaronicultura? En los albores de la camaronicultura tecnificada, la reproducción del camarón de manera inicial se basaba en la captura en altamar de reproductores silvestres (CICTUS, 1984), lo cual convertía al cultivo en una tecnología de ciclo abierto. En este tipo de operaciones, los reproductores eran usados hasta su agotamiento y luego remplazados por organismos recién capturados en su medio natural. Así, la genética tenía poco o nada que hacer para mejorar el pie de cría en estas empresas camaronícolas. En esa época, abundantes trabajos de investigación se orientaron a estimar la variabilidad genética de poblaciones naturales de camarón. Se intentaba con estas investigaciones determinar la variación genética (polimorfismo y heterozigosidad), consanguinidad y distancias genéticas entre poblaciones distantes geográficamente, a través del uso de marcadores genéticos alozímicos (Proctor *et al.*, 1974; Marvín *et al.*, 1977; Lester, 1979; Mulley y Later, 1980).

Cuando el cultivo empezó su conversión a ciclo cerrado, es decir, una tecnología independiente de la captura de reproductores silvestres, las alozimas permitieron evaluar la caída en la "salud genética" de los camarones en cautiverio, lo cual era una evidencia manifiesta de la pérdida de variabilidad genética en el camarón, expresada en

términos prácticos como una baja en la productividad de los organismos bajo cultivo (Sbordoni *et al.*, 1986; Sbordoni *et al.*, 1987). De esta manera empezó a surgir la incertidumbre entre los productores de camarón, acerca de la conveniencia de perpetuar el ciclo cerrado en los laboratorios de producción de poslarvas. ¿Cómo asegurarse de la "calidad genética" de los organismos en cautiverio?, ¿cómo evaluar dicha calidad en términos confiables?, ¿eran las alozimas lo suficientemente resolutivas para detectar variación genética en familias de camarón sujetas a programas de mejoramiento? Un hecho era innegable: si se deseaba establecer una industria camaronícola firme a lo largo del tiempo, era urgente independizar la tecnología de los *stocks* naturales y lograr la domesticación del camarón, tal y como se había logrado siglos atrás con especies pecuarias y agrícolas, que hoy sustentan la nutrición humana a nivel mundial.

Hoy día, a pesar de existir algunos *stocks* domesticados de camarón, en específico del camarón tigre *Penaeus monodon* en Asia y el blanco *Penaeus vannamei* en América, por desgracia la mayoría de los productores siguen prefiriendo remplazar sus reproductores con organismos silvestres, manteniendo en sus instalaciones una especie de ciclo semicerrado, quizás por falta de conocimiento o una asesoría genética adecuada. Como afirma Benzie (1998); la genética y la biotecnología pueden darles a los camaronicultores especies libres o resistentes a diversos patógenos (Wyban *et al.*, 1993), mejores tasas de crecimiento, bajos valores de conversión alimenticia, menores índices de mortalidad y mayores volúmenes de producción. No deben seguirse poniendo en riesgo las poblaciones naturales, debido a su sobreexplotación, ni comprometer tampoco a las grandes industrias camaronícolas ante nuevas y mortales epidemias virales y bacteriológicas que impacten de modo negativo la producción de camarón.

Las líneas de camarón domesticadas y mejoradas genéticamente fortalecen en gran medida la camaronicultura a nivel mundial. En definitiva, el conocimiento sobre el genoma del camarón permitirá encontrar la correlación entre características fenotípicas y genotípicas deseadas y el estudio de su herencia a la progenie; también es importante recordar que en realidad la expresión de los genes está íntimamente ligada a la bioquímica y fisiología de los organismos y que las aportaciones desde cada una de estas disciplinas, aportarán conocimientos que integrados, harán más exitoso el cultivo del camarón. Este capítulo se enfoca a describir algunos de los métodos para caracterizar genomas y los conocimientos existentes en cuanto a fragmentos del genoma, genes o los productos de genes hasta ahora descritos en camarones penaeidos y la utilización de los mismos hasta donde ha sido comunicado para distinguir poblaciones.

Marcadores moleculares

Cuando se requiere un estudio de variabilidad genética, ya sea en poblaciones naturales o cautivas de camarón, o desarrollar un programa de mejoramiento genético, es impres-

4
cindible contar con marcadores que nos permitan comparar la composición genética entre especies, poblaciones, familias o individuos. Un marcador es un rasgo o característica propia de los organismos que permite identificarlos y al mismo tiempo compararlos con otros organismos. En los inicios de la investigación genética, Gregor Mendel utilizó marcadores fenotípicos en los chícharos que él estudiaba, es decir, empleó características observables (color, rugosidad, etc.) de los individuos. Conforme avanzó la genética, se empezaron a buscar marcadores que estuvieran relacionados de manera más directa con el genotipo (constitución genética total de un individuo), ya que lo que se buscaba era evaluar la variabilidad genética a través de características heredables. Así, se empezaron a utilizar marcadores inmunológicos, basados en las propiedades antigénicas de las proteínas (Awise, 1994) pero, pronto fueron desplazados por marcadores más versátiles y resolutivos: las alozimas o aloenzimas.

¿Alozimas o ADN?

Éstas son enzimas similares o idénticas en términos funcionales que son producidas por diferentes alelos de un gen. La forma más común de detectarlas es a través de su migración diferencial en un gel (por lo general almidón o acrilamida) sometido a electroforesis. Estos marcadores moleculares constituyeron un hito en la historia de la genética de camarón, ya que sentaron las bases y las metodologías para el análisis genético-estadístico de la variabilidad genética (Lester y Pante, 1992). En la actualidad éstos siguen siendo aún utilizados por muchos laboratorios del mundo para evaluar variabilidad genética en camarón (Benzie *et al.*, 1993; Garcia *et al.*, 1994; de la Rosa-Vélez *et al.*, 1999; de la Rosa-Vélez *et al.*, 2000; Gusmão *et al.*, 2000; Garcia-Machado *et al.*, 2001) por ser metodologías de bajo costo, resolución aceptable y relativamente fáciles de aplicar. Sin embargo, la década de 1990 trajo consigo el desarrollo explosivo de la aplicación de la biología molecular al estudio de la variabilidad genética. Los marcadores moleculares empleados ya no son productos del genotipo, como las alozimas, sino que constituyen el genotipo mismo, es decir, el ácido desoxirribonucleico o ADN. De tal modo que lo que ahora se evalúa es la variabilidad genética *per se*, ya no su estimación indirecta. Los marcadores moleculares de ADN resultan valiosos para el desarrollo e implementación de programas de mejoramiento genético de camarón (Davis y DeNise, 1998). A través de tales marcadores de ADN es posible evaluar la variabilidad genética de los organismos silvestres "fundadores" de un proyecto de domesticación, de tal manera que se minimicen los riesgos de la indeseada consanguinidad. De igual forma, el ADN se emplea para diseñar programas de reproducción de camarón, evaluación de pedigrí, monitoreo de la "calidad genética" y correlación entre la constitución genética y características productivas como conversión alimenticia, sobrevivencia, crecimiento y resistencia o susceptibilidad a enfermedades (Alcivar-Warren *et al.*, 1997; Hetzel *et al.*,

1997). En términos generales, el ADN puede clasificarse en ADN mitocondrial (ADNmt) o ADN nuclear (ADNn).

ADN mitocondrial (ADNmt)

Éste está localizado dentro de las mitocondrias (organelos celulares productores de energía). El ADNmt es una molécula de secuencia única, de forma circular, con excepción de sólo algunos genomas lineales (Nosek *et al.*, 1998). La cantidad total de ADNmt relativo al ADNn es menor a 1% (Lewin, 1997). No obstante su tamaño pequeño, es un genoma muy útil para estudios de genética y evolución debido a que por lo general no presenta recombinación, posee una alta tasa evolutiva, es muy fácil de purificar y se hereda sólo por vía materna (White y Densmore, 1992). Estas características convierten al ADNmt en un marcador molecular idóneo para estudios de linajes genéticos de camarón.

A partir de los trabajos de Palumbi y Benzie (1991), se hizo evidente que el ADNmt era una molécula mucho más eficaz que las alozimas para detectar variabilidad genética en camarón. Sus investigaciones demostraron que a pesar de las semejanzas morfológicas entre diversas especies de camarón, éstos presentan una variabilidad genética mucho mayor que la encontrada incluso entre taxa superiores a especie en grupos de mamíferos. Estos autores investigaron sólo pequeñas porciones de los genes mitocondriales citocromo oxidasa subunidad I (COI) y 12S ribosomal, a través de técnicas de PCR (reacción de la polimerasa en cadena) y secuenciación. Otros autores han utilizado el gen COI para revelar incluso la existencia de una nueva especie de *Penaeus* (Gusmão *et al.*, 2000) o determinar la filogenia y biogeografía de diversas especies de camarón (Baldwin, 1998); o bien, el mismo gen mitocondrial junto con el gen citocromo oxidasa subunidad III (COIII) del mismo genoma para evaluar la diversidad genética entre poblaciones cubanas de camarón (García-Machado *et al.*, 2001). Otro gen mitocondrial ampliamente utilizado es el 16S ribosomal mitocondrial, mediante el cual se han evaluado las diferencias genéticas entre especies de camarones *Farfantepenaeus* y *Litopenaeus* (Gutiérrez-Millán *et al.*; Maggioni *et al.*, 2001) o entre las especies *Penaeus notialis* y *Penaeus schmitti* (García-Machado *et al.*, 1993). Estos mismos autores (García-Machado *et al.*, 1996) han secuenciado casi la mitad del genoma mitocondrial de *Penaeus notialis* e incluso existe ya la secuenciación completa del ADNmt del camarón tigre *Penaeus monodon* (Wilson, 2000). Utilizando la secuenciación del ADNmt total como marcador molecular es posible realizar estudios comparativos entre diversos taxa, mediante el análisis del orden de los genes mitocondriales (Boore *et al.*, 1995; Lang *et al.*, 1999; Hickerson, 2000; Wilson, 2000).

También existe en el genoma mitocondrial del camarón una región llamada *D-loop* o "región control" que parece ser de gran aplicación para la camaronicultura, pero que aún no ha sido del todo estudiada. Esta región es una porción de ADNmt no codificante que sirve de inicio de la replicación y transcripción del genoma mitocondrial. Es una región

hipervariable susceptible de ser utilizada incluso para la identificación de individuos (*fingerprinting*), característica deseable para un marcador molecular que se quiera utilizar en el análisis de pedigrí y mejoramiento genético del camarón. Debe recordarse que esta región, al igual que el ADNmt total, se hereda sólo por vía materna, por lo cual es relativamente fácil seguir los linajes genéticos a través de distintas generaciones de camarón en cautiverio. En la actualidad, existe un grupo de investigación conjunto entre el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) y la universidad de Sonora enfocados a estudiar la estructura y diferenciación de la región control de los camarones del Pacífico mexicano: *P. vannamei*, *Penaeus stylirostris* y *Penaeus californiensis*.

ADNmt-RFLP

El ADNmt también es un excelente marcador molecular aún sin dilucidar su secuencia. El análisis que permite esto es conocido como polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), por sus siglas en inglés (*Restriction Fragment Length Polimorphism*). Este análisis consiste en purificar o semipurificar la molécula de ADNmt y posteriormente someterla a una digestión con enzimas que "cortan" el ADN en fragmentos de diversos tamaños, los cuales después son separados con base en tamaño por lo general mediante electroforesis en gel. Los patrones de bandeo resultantes permiten evaluar las diferencias existentes entre los organismos analizados. Este enfoque también ha sido muy aplicado en camarón (Benzie *et al.*, 1993; Bouchon *et al.*, 1994; Garcia *et al.*, 1994; Alcivar-Warren *et al.*, 1997; Klinbunga *et al.*, 1999), por su poder resolutivo y fácil aplicación a un tamaño muestral grande.

ADNn-genes ribosomales

El ADNn, a diferencia del genoma mitocondrial, es una molécula muy grande y compleja. Presenta irregularmente dos tipos de secuencias nucleotídicas intercaladas: regiones codificantes y no codificantes. Entre las primeras se pueden clasificar la mayor parte de los genes (a excepción de los mitocondriales) que constituyen a los animales, así como a los genes ribosomales que codifican para la maquinaria de síntesis de proteínas en los organismos: ácido ribonucleico (ARN) mensajero o ARNm, ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosomal (ARNr) (Brown, 1999). Este último tipo, es la forma más abundante en todas las células y es un componente esencial de los ribosomas. En los organismos eucariotes multicelulares, 3 de los 4 genes ribosomales nucleares se agrupan en una sola unidad de transcripción, en el orden 18S, 5.8S y 28S. La secuencia entre el sitio de iniciación y el gen 18S se conoce como espaciador transcrito externo (ETS, por sus siglas en inglés), mientras que al interior de la unidad de transcripción, los genes se separan por espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2). La unidad entera de trans-

cripción se repite cientos o miles de veces, separadas cada una de ellas por espaciadores intergénicos (IGS o NTS, es decir, espaciadores no transcritos). Mientras que las secuencias de los genes ribosomales son altamente conservadas, las secuencias y estructuras tanto de los IGS, como de los ITS puede variar de modo amplio entre o dentro de especies. Esta variabilidad genética de los genes de ARNr también ha sido utilizada en camarón como marcador molecular (Bagshaw y Quiel, 1998).

ADNn-RAPD

Cuando se extrae al ADN nuclear, es posible llevar a cabo un análisis rápido de la constitución genética de los organismos, para efectos comparativos, conocido como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* o ADN polimórfico amplificado aleatoriamente). Este tipo de marcadores moleculares consisten de fragmentos cortos de ADN amplificado vía PCR mediante pequeños iniciadores (*primers*) arbitrarios, por lo general de 10 bases de longitud; los cuales se alinean aleatoriamente (por complementariedad) en el ADNn y con la ayuda de una enzima polimerasa se sintetizan fragmentos al azar del genoma nuclear. Los fragmentos resultantes son analizados con base en tamaño y se analizan las diferencias entre los individuos muestreados (Grosberg *et al.*, 1996). Estos marcadores RAPD, se han empleado en camarón para estimar la diversidad genética de organismos tanto silvestres, como cultivados (García *et al.*, 1994; García y Benzie, 1995; Aubert y Lightner, 2000). Algunas de estas investigaciones con RAPD han producido información valiosa de otros marcadores moleculares de camarón: los microsatélites (García *et al.*, 1996).

ADNn-microsatélites

Los microsatélites (conocidos también como STR: *Short Tandem Repeats*) son un tipo de marcador genético que consiste de numerosas repeticiones de secuencias cortas de bases de ADNn (dinucleótidos, trinucleótidos o tetranucleótidos) (Awise, 1994) no codificante, con una inmensa variabilidad (altamente polimórficos) en el número de copias de repeticiones, lo cual los convierte en los marcadores de elección para estudios poblacionales, mapeo genético (ligamiento), reproducción selectiva, identificación de *stocks*, seguimiento de pedigrí y linaje, programas de domesticación acuática y de mejoramiento genético (selección asistida por marcadores). Estos marcadores moleculares han sido descritos en camarón blanco *P. vannamei* (Bagshaw y Buckholt, 1997); caracterizados para ser utilizados en mapeo genético y en relación con *loci* de características productivas en camarón Kuruma *Penaeus japonicus* (Moore *et al.*, 1999); identificados y usados para determinar la estructura poblacional en *stocks* silvestres de *P. monodon* (Xu, 1999; Brooker *et al.*, 2000) y asociados a heterosis en *stocks* cultivados de camarón azul

P. stylirostris (Bierne, 2000). Los microsatélites son sin duda los marcadores moleculares del futuro, por su gran abundancia en los genomas nucleares de estos organismos, su alto nivel de polimorfismo y su excelente poder de resolución, capaz de discriminar incluso entre organismos altamente consanguíneos. El análisis de microsatélites constituye una mina de información genética que proporcionará a los genetistas y camaronicultores una excelente herramienta en la toma de decisiones: la llamada huella genética (o *fingerprinting*) del camarón.

Por otro lado, para un programa de cultivo exitoso de camarón o de cualquier otro organismo, sobre todo si se pretende que sea cerrado, es necesario definir las características deseadas, la forma temprana de detectarlas, cuantificarlas y seleccionarlas en particular en los camarones ha utilizar como progenitores o pie de cría, así como la forma en que se transmiten o heredan a la descendencia. Considerando que los fenotipos son una combinación de la expresión de varios genes, encontrar los genes cruciales y definir su interrelación es una ardua labor. Una buena estrategia, es la identificación de genes con importancia clave para el crecimiento, reproducción, defensa contra enfermedades y estrés, que permita definir los niveles normales de expresión de los genes (proteínas) o de metabolitos clave productos de una reacción enzimática y esencial e iniciar la detección temprana de cambios positivos y negativos durante los cultivos para después entender la forma de transmisión genética. En este respecto, la información es aún escasa y muy reciente, sin embargo, por la relación directa con el cultivo, se discutirán los conocimientos sobre genes caracterizados con importancia en la alimentación, reproducción y sistema de defensa. Sin embargo, antes de describir este conocimiento, es necesario recordar que como ya se mencionó, el ADN o genoma contiene la información genética para la formación de cualquier organismo y por lo tanto, también para el camarón; que los genomas tienen regiones que se expresan (codificantes), es decir, que por el proceso de transcripción dan origen a ARNm, ARNr y ARNt (aunque existen otros ARN que son componentes de complejos proteicos, esos no se tratarán en esta ocasión) y que los ARNm al ser traducidos son utilizados como moléculas transmisoras de información para la síntesis de proteínas con secuencias de aminoácidos específicas, lo cual da origen a proteínas estructurales y enzimas que en conjunto con lípidos y carbohidratos, forman las células.

Genes de proteasas digestivas

La capacidad de digestión de los alimentos está directamente relacionada con su aprovechamiento para crecimiento y desarrollo. Para el cultivo de un organismo, esto representa el costo de la alimentación y en relación con la capacidad de asimilación o conversión alimenticia. La digestión es un proceso esencial para la absorción de los nutrientes. En los crustáceos, el principal órgano productor de enzimas digestivas es el hepatopáncreas,

también llamada glándula digestiva (Dall *et al.*, 1990), en donde se producen enzimas hidrolíticas para degradar proteínas, carbohidratos y lípidos. Se han identificado genes que codifican serinproteasas tipos tripsina (Klein *et al.*, 1996) y quimiotripsina (Sellos y Van, 1992), cisteinproteasas como catepsina L (Le Boulay *et al.*, 1996), amilasas (van Wormhoudt y Sellos, 1996) y un tipo específico de glucosidasas, como la α glucosidasa (Le Chevalier *et al.*, 2000). Algunas de estas proteínas digestivas son codificadas por varios genes. En el caso de tripsina, se han estudiado tres genes con diferencias polimórficas que los clasifican en tres familias de la superfamilia de tripsina (Klein *et al.*, 1998) y en el caso de quimiotripsina, se han identificado dos familias de genes (Sellos y van Wormhoudt, 1999). Lo mismo ocurre con el gen de amilasa, en donde se reportan por lo menos tres polimorfismos a nivel de ADNc (van Wormhoudt y Sellos, 1996) y en el ADNc de catepsina L, en donde se han informado dos variantes (Le Boulay *et al.*, 1996).

Además de varios genes para estas enzimas, otra característica de por lo menos los genes de enzimas digestivas hasta ahora estudiados, es el estar interrumpidos por intrones (secuencias internas no codificantes, del inglés, *intervining sequences*), pues los genes de tripsina tienen dos intrones (Klein, 1998 #1353), los de quimiotripsina seis (Sellos, 1999 #1), y los de L catepsina cinco (Le Boulay *et al.*, 1998).

La cantidad de ARNm para estas enzimas se ha relacionado con el alimento consumido. En experimentos que evaluaron las cantidades de ARNm de tripsina, quimiotripsina y amilasa en camarones alimentados con diferentes concentraciones y calidades de proteína, se encontró que aumentan los niveles de tripsina al elevar los niveles de caseína, mientras que el efecto en los niveles de amilasa es opuesto, indicando que las altas cantidades de proteína inducen de alguna forma la expresión de las proteasas digestivas al mismo tiempo que reprimen las amilasas (Le Moullac *et al.*, 1997), reflejando con probabilidad el uso de proteína también como fuente energética.

No sólo se han encontrado variaciones en la expresión de estos genes como respuesta a la dieta, sino que también se ha demostrado que existen cambios relacionados a la muda; por ejemplo, los niveles de ARNm de quimiotripsina aumentan en el estadio de premuda temprana y en el de posmuda (van Wormhoudt *et al.*, 1995), los de tripsina aumentan en premuda (Klein *et al.*, 1996), y también se han informado variaciones de L catepsina con respecto a la muda (Le Boulay *et al.*, 1996), seguramente relacionado con la habilidad de los camarones en general para consumir alimento, ya que el hepatopáncreas sigue siendo un órgano muy activo en transcribir otros genes, como lo demuestra la alta concentración de ARNm de quitinasa en premuda (Tan *et al.*, 2000).

Así, hasta hoy, se han comunicado genes de enzimas hidrolizantes de proteínas y de carbohidratos provenientes de la dieta, pero no hay reportes de lipasas que actúen de manera directa en la digestión de los lípidos dietarios y su posterior absorción, sin embargo, los lípidos dietarios deben de llegar a las células por medio de algún transporte, lo cual se tratará más adelante.

Genes de proteínas de transporte

Aunque existe información sobre genes de camarón de proteasas digestivas, es casi nula la de genes de proteínas de transporte, aunque actualmente se están realizando este tipo de investigaciones en varios laboratorios. Las proteínas de transporte de oxígeno y de lípidos son esenciales para la vida en todos los vertebrados e invertebrados. En el camarón, como en otros crustáceos y moluscos, la proteína de transporte de oxígeno es llamada hemocianina (Hcy), se encuentra en la hemolinfa o sangre, donde es la proteína más abundante y está formada por lo menos por dos subunidades similares (pero no idénticas), que se unen por puentes disulfuros originando complejos de alto peso molecular, formados por 6, 12, 18 (múltiplos de 6) o más subunidades, siendo la forma hexamérica la unidad básica funcional para llevar a cabo el transporte de oxígeno. La hemocianina contiene cobre (Cu) que es coordinado a las histidinas de los polipéptidos y es el responsable de ligar el oxígeno. La Hcy también se considera como proteína de reserva que almacena aminoácidos que son utilizados para síntesis de otras proteínas en periodos de ayuno o en otras condiciones de estrés (Figueroa-Soto *et al.*, 1997). En camarones, sólo hay un reporte de la caracterización del gen de Hcy de *P. vannamei* (Sellos *et al.*, 1997) de una de las subunidades, aunque otras secuencias de ADNc han sido depositado en el banco de datos de *GenBank the National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Las secuencias de aminoácidos deducidas de estos genes, tienen regiones similares a fenoloxidasas (tirosinasas) de artrópodos y a proteínas de reserva de insectos, por los que son clasificadas como una superfamilia de hemocianina (Burmester, 2001).

Estudios recientes demostraron que el amonía ambiental afecta las concentraciones de Hcy en plasma (Chen *et al.*, 1994; Racotta y Hernández-Herrera, 2000), pero se desconoce si esto está relacionado con la expresión directa del o los genes de Hcy. El único reporte existente de cambios de la expresión del gen de Hcy, comunica cambios por estadios de muda (Sellos *et al.*, 1997), reflejando tal vez, cambios generales en la transcripción para llevar a cabo el cambio de exoesqueleto. Proteínas de transporte de otros metales, elementos necesarios como cofactores o parte integral en algunas proteínas que catalizan una gran variedad de reacciones enzimáticas deben de existir en camarones, y de seguro serán descritos en un futuro próximo.

Por otra parte, las lipoproteínas transportan los lípidos vía hemolinfa desde los sitios de absorción y síntesis, hacia los tejidos de utilización para poder ser movilizados en el medio acuoso. Los lípidos tienen diversas funciones: son necesarios para la formación de membranas celulares; precursores de enzimas esteroideas; están involucrados en la transducción de señales; el colesterol es esencial en la dieta (no puede ser sintetizado *de novo* en artrópodos); los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y ω -6 son necesarios para un buen crecimiento y maduración y al final, y de gran importancia, son la principal forma de reserva energética (Lee, 1991).

Estudios realizados en la década de 1970 fueron pioneros en demostrar la absorción y transporte de lípidos marcados radiactivamente contenidos en la dieta, desde el intestino hacia la hemolinfa, siguiendo hacia el hepatopáncreas y músculo en forma espacio-temporal ordenada, pero es hasta mucho después que se purifican y caracterizan las lipoproteínas, tanto en sus componente apoproteicos (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995) como lipídicos (Ruiz-Verdugo *et al.*, 1997; Lubzens *et al.*, 1997) y revisado en Yepiz-Plascencia *et al.* (2000b). Estos estudios reportan dos tipos de lipoproteínas plasmáticas clasificadas de acuerdo a la densidad como de alta densidad o *High Density Lipoproteins* (HDL) y de muy alta densidad o *Very High Density Lipoproteins* (VHDL). Los genes que codifican para estas proteínas son sujeto de estudios actuales, así se sabe que la HDL de *P. vannamei* se sintetiza en el hepatopáncreas de donde se presume es secretada a la hemolinfa (Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000a), lo que ha sido confirmado por el aislamiento del ADNc correspondiente de un banco de genes de este tejido (Romo-Figueroa y Yepiz-Plascencia, datos no publicados). Para la VHDL, en camarones penaeidos sólo existe un reporte del ADNc de esta apolipoproteína de ~200 kDa, la del camarón tigre *P. monodon*, en donde también se informa detección del ARNm en branquias, corazón, hepatopáncreas, órgano linfoide y músculo (Yeh *et al.*, 1999). Hasta el momento, no existen reportes que relacionen cambios en la expresión de estos genes con los lípidos provenientes en la dieta, y menos aún con la calidad, cantidad, o condiciones fisiológicas o ambientales en los cuales se cultivan los camarones, pero es muy probable que existan.

Control hormonal y reproducción

Partiendo de las condiciones de una buena alimentación, los camarones desarrollan su crecimiento por medio de ciclos de muda hasta alcanzar su etapa de maduración y reproducción. Éstos se encuentran íntimamente relacionados ya que ambos se regulan por mecanismos de acciones antagónicas y retroalimentación hormonal. La reproducción exitosa es un requisito clave para los cultivos, pues es deseable que los progenitores generen gran cantidad de descendientes. Por lo anterior, se describirán enseguida las hormonas que tienen una función importante en estos procesos.

El sistema endocrino de crustáceos consiste de glándulas tipo epitelial y estructuras endocrinas de origen neural; la mayor parte de las hormonas de crustáceos parecen tener un origen neural. Las estructuras endocrinas consisten de: 1) órgano Y, 2) complejo órgano-X glándula del seno, 3) órgano mandibular, 4) órgano pericárdico, 5) órgano poscomisural, 6) ovarios y 7) glándula androgénica (véase revisiones generales, Fingerman, 1987; Keller, 1992; Huberman, 2000).

El órgano Y es la fuente de hormonas ecdisteroides que se secretan en forma del precursor ecdisona a la hemolinfa para ser transformada en la hormona activa 20-OH-ecdisona, por la enzima hidroxilasa presente en epidermis, otros tejidos y órganos. La

tasa de síntesis y secreción de ecdisona puede ser el mecanismo predominante de control de las concentraciones ecdisteroides en la hemolinfa (Chang, 1991). El recambio periódico del exoesqueleto de los crustáceos durante el proceso de muda está controlado por dos hormonas antagónicas: la hormona de la muda (ecdisteroides) encargada de la estimulación y la hormona inhibidora de la muda (MIH) encargada de la supresión.

Los ecdisteroides controlan el crecimiento cíclico del tejido en crustáceos durante el ciclo de muda. La circulación de 20-OH-ecdisona en la hemolinfa varía mucho a lo largo del ciclo de muda. De inmediato después de la ecdisis etapa A, su concentración es muy baja y por lo general permanece así durante el periodo de intermuda C4. En la etapa de premuda temprana D0-D1 se incrementa ligeramente, mientras que en la etapa D2-D3 aumenta de manera drástica, seguido por una reducción precipitada justo antes de la ecdisis. En los adultos los ecdisteroides están relacionados con aspectos de la regulación del desarrollo reproductivo y se ha demostrado que dosis fisiológicas de éstos reinician la meiosis en oocitos en etapa de descanso (Chan, 1995).

El efecto de la hormona inhibidora de la muda (MIH) cesa o es reducido, debido a guías o señales ambientales lo cual conlleva a la activación del órgano-Y y subsecuentemente al incremento de 20-OH-ecdisona. Por comparación del gen MIH del cangrejo *Cancer pagurus* con una secuencia de una alta identidad al factor corión 1/ultraespiráculo (CF1/USP) que constituye la pareja de unión del receptor de ecdisteroides en insectos, se ha considerado que también existe la retroalimentación negativa por ecdisteroides durante el periodo de intermuda (Dell *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2000).

El complejo órgano-X glándula del seno (OXGS) es el mayor centro de control neuroendocrino de crustáceos y se localiza en los pedúnculos oculares de decápodos. El órgano-X permanece en el margen próximo ventral de la *medula terminalis*. Aquí se sintetizan una familia de neuropéptidos los cuales son transportados vía el tracto axonal a la glándula del seno (SG), esta última es una agrupación de terminales de axones en forma de bulbo, junto con algunas células gliales que almacena y libera las neurohormonas a la hemolinfa (Fingerman, 1987).

Este complejo OXGS es la fuente de hormonas peptídicas que regulan diversas funciones. La MIH regula el crecimiento, mientras que la reproducción es controlada principalmente por la hormona inhibidora de la gónada (GIH) y hormonas inhibidora del órgano mandibular (MO-IH). Aspectos metabólicos como el nivel de glucosa en la hemolinfa, lípidos y secreción de enzimas en el hepatopáncreas se regulan por hormonas hiperglucémicas de crustáceos (CHH) además de otras funciones como transporte de iones en las branquias.

Los miembros de la familia de péptidos CHH/MIH/GIH son por lo común de 70 a 80 aminoácidos de longitud, con una masa molecular de 8 a 9 kDa, contienen seis residuos conservados de cisteínas formando tres enlaces disulfuros y se clasifican como una familia de hormonas debido a la fuerte similitud de sus secuencias (Chang, 1991; Wang, 2000). En muchos de los casos se han encontrado múltiples papeles funcionales cruza-

dos de estas hormonas dentro de especies individuales por lo que es extremadamente difícil asignar sus funciones fisiológicas específicas (Chan *et al.*, 1998; Dirksen *et al.*, 2001).

Hoy día esta familia comprende más de 32 miembros identificados de al menos 12 especies de decápodos. Una comparación por medio de la técnica de alineamiento de secuencias múltiple, búsqueda de regiones similares *motifs* y conservación de aminoácidos se separan en dos grupos. En especies de penaeidos las hormonas reguladoras de la muda y de los niveles de glucosa son estructuralmente similares al prototipo CHH del cangrejo *Carcinus maenas* y otro grupo semejante a GIH (reproducción o de vitelogénesis). El tipo precursor de CHH consiste de una secuencia señal, una secuencia más o menos corta llamada péptido precursor relacionado (CPRP), la hormona madura y el sitio básico de procesamiento, mientras que al precursor tipo GIH es las secuencias comprendidas en la inhibición de la reproducción, pero le falta el CPRP (Lacombe, 1999 #19; Lu *et al.*, 2000).

Parece ser una característica común la existencia de múltiples copias de los genes en esta familia. En el cangrejo *Cancer pagurus* se postulan hasta 10 copias de genes por genoma (Tang *et al.*, 1999), mientras que en el camarón *Metapenaeus ensis* se han encontrado al menos ocho diferentes genes CHH (Gu y Chan, 1998; Gu, 2000) y en *P. monodon* se han identificado seis diferentes ADNc semejantes a CHH (Davey *et al.*, 2000; Udomkit *et al.*, 2000) y en *P. japonicus* han sido identificados cinco péptidos de la SG semejantes a CHH (Ohira *et al.*, 1997). Todos los análisis de los genes de la familia CHH desarrollados hasta ahora han revelado una organización similar, el gen consiste de tres exones interrumpidos por dos intrones, aun más el sitio de enlace intron/exon es altamente conservado (Gu, 2000). Si bien se considera que las hormonas de la familia CHH/MIH/GIH regulan el metabolismo energético en crustáceos ahora se sabe que son hormonas pleiotrópicas que posiblemente afecten cada aspecto de la fisiología de crustáceos.

El órgano mandibular (MO) son estructuras pares que se localizan cercanas al órgano-Y. En langostinos del género *Procambarus* se ubica en la base del tendón mandibular y se conoce que secreta el isoprenoide metil farnesoato (MF) y ácido farnesoico. El MF es un precursor de la hormona juvenil en insectos con una función muy definida en la metamorfosis y reproducción, aunque su papel en crustáceos no está bien definido. En el cangrejo araña *Libinia emarginata* se ha observado una correlación entre los altos niveles de MF con la vitelogénesis en hembras y morfotipos reproductivos de machos (Chaves, 2001). Laufer (1998) demostró estimulación de maduración de ovarios en el langostino *Macrobrachium rosenbergii* y en *P. vannamei*. Se ha propuesto que el efecto de MF en los ovarios puede ser indirecto por medio de la estimulación del órgano-Y que sintetiza y secreta más ecdisteroides, los cuales de manera subsecuente se acumulan en los ovarios y estimulan la maduración de los oocitos (Chang, 1991).

En ovarios de *Cancer quadricarinatus* el MF participa en la regulación de la vitelogénesis activando las proteincinasas C, este mecanismo es similar al modo de

acción sugerido para la hormona juvenil en insectos (Soroka *et al.*, 2000). También se ha encontrado que los MO se hipertrofian después de la ablación (Fingerman, 1987).

En crustáceos hembras la última fase de maduración de las gónadas para formar el ovocito maduro se llama vitelogénesis, este proceso comprende la síntesis o deposición de vitelo. El componente principal de este material nutritivo para el desarrollo del embrión es la vitelina (Vn), una glucolipocarotenoproteína derivada de un precursor llamado vitelogenina (Vg) (Quackenbush, 1992; Thurn, 1999) que se ha reportado se sintetiza en tejido extraovárico, la ubicación precisa se demostró por medio de la verificación de ARNm de Vg en el hepatopáncreas de langostino *M. rosenbergii* y de *P. japonicus* (Chen *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000), aunque se ha propuesto que también se sintetiza en el ovario (Fainzilber *et al.*, 1992; Thurn, 1999).

De Kleijn (1994) ha sugerido que la GIH tiene una función de inhibición del proceso de muda. Esta hormona se ha descrito sólo en langosta y en isópodos, en donde se ha observado que en langostas hembras este proceso ocurre después de la eclosión de sus larvas cuando las concentraciones de CHH y CIH en hemolinfa son bajos, de esta forma altos niveles de GIH pueden prevenir la muda durante las etapas inmaduras de reproducción, mientras que CHH previene la muda en las últimas etapas de la reproducción. De este modo sincronizan los procesos de reproducción y muda durante el ciclo reproductivo.

La identificación de sustancias estimuladoras de las gónadas llevará a un control de los procesos reproductivos lo que significará un beneficio directo a las prácticas de acuicultura de crustáceos, si bien estos aspectos han sido investigados de manera amplia aún no se tiene un conocimiento preciso de la regulación de este proceso. La realización de la ablación unilateral de hembras de camarón es una práctica común, esta técnica produce un aumento predecible en la maduración y desove, pero conlleva problemas como deterioro en la calidad de las larvas y disminución en cantidad a corto plazo, es una alteración permanente que al final interfiere con la capacidad del organismo para regular un gran número de procesos fisiológicos (Vaca y Alfaro, 2000).

El desarrollo y reproducción en crustáceos se regulan por una combinación de hormonas neuropeptídicas, ecdisteroides, metil farnesoato y neuroreguladores (Laufer y Landau, 1991; Homola y Chang, 1997). El Metil farnesoato y los ecdisteroides son sintetizados bajo el control negativo de los MO-IH y MIH producidos por el complejo OXGS respectivamente. En ensayos *in vitro* se presenta un incremento significativo del diámetro de oocitos de *P. vannamei* por exposición a 17-hidroxiprogesterona, metil farnesoato y hormona juvenil III. En *M. ensis* hay un comportamiento similar por inyección de progesterona, en *P. japonicus* se induce la vitelogénesis por 17-hidroxiprogesterona. En *P. vannamei* se ha demostrado una mejora significativa en la calidad del espermátforo por inyección de 17-metil testosterona (Vaca y Alfaro, 2000).

La regulación del proceso de maduración ovárica no depende sólo de la regulación de síntesis de ecdisteroides o de la inhibición del órgano mandibular, sino que también hay regulación por efecto de CHH. En el camarón *M. ensis* se presenta una regulación por

expresión antagónica de dos isoformas: las MeCHH-A y MeCHH-B, en donde se requiere un alto nivel de A para las etapas gonadales iniciales (I-II) y un alto nivel de B para la maduración gonádica durante la parte media y final de la vitelogénesis (Gu, 2000).

Aunque la regulación hormonal de este proceso no se ha elucidado por completo, sin duda, la información existente es base para futuros estudios. Por otro lado, también es importante la información sobre las proteínas necesarias para la reproducción. La que ha recibido mayor atención es la vitelina (Vt) que se encuentra en ovario y su precursor vitelogenina (Vg). La primera es una lipoproteína cuya función principal es la de proveer nutrientes (aminoácidos y lípidos) para el oocito en formación. El origen extraovárico de la vitelina ha sido un tema controversial (Tsutsui *et al.*, 2000; Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000b), ya que hasta hace poco no existían datos que demostraran de manera concreta la síntesis del ARNm correspondiente a esta proteína tanto en el ovario como en otros tejidos. Sin embargo, en los últimos años, ya se reportan algunos ejemplos. En el camarón *P. semisulcatus*, la Vg, se sintetiza en mayor proporción en ovarios que en hepatopáncreas (Fainzilber *et al.*, 1992), y se asume que acarrea lípidos del hepatopáncreas al ovario (Khayat *et al.*, 1994; Lubzens *et al.*, 1997).

Genes del sistema inmunitario

La función del sistema inmunitario del camarón así como el de otros crustáceos, insectos e invertebrados en general, es defender al organismo de compuestos extraños. No se ha demostrado hasta el momento, que los invertebrados sinteticen anticuerpos, que son los componentes más conocidos del sistema inmunitario de vertebrados. Sin embargo, al igual que en los vertebrados, el reconocimiento y ataque para la eliminación de compuestos extraños o no propios, es mediado por las células sanguíneas o hemocitos y por proteínas que reconocen el material no propio y desencadenan una serie de reacciones que culminan en el encapsulamiento de los materiales extraños y en la fagocitosis mediada por los hemocitos (Vargas-Albores, 1995; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 1998; Vargas-Albores y G., 2000).

Se han descrito dos sistemas centrales en el mecanismo de defensa de los camarones: el sistema profenoloxidasa (proFO) (Gollas-Galván *et al.*, 1997; Sung *et al.*, 1998; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 1998; Vargas-Albores y G., 2000) y el sistema de coagulación (Muta y Iwanaga, 1996; Montaña-Pérez *et al.*, 1999). Varias proteínas están involucradas en la activación y control de estos sistemas y la información sobre éstas es variable; existen reportes indicando desde la detección, la caracterización incluyendo propiedades bioquímicas y cinéticas, estudios de activación por componentes microbianos, etc., sin embargo, la información sobre los genes apenas empieza a conocerse. Hasta el momento, en la bibliografía sólo se han comunicado los ADNc completos de profenoloxidasa del camarón tigre *P. monodon* (Sritunyalucksana *et al.* 1999a) y de la

proteína de coagulación (Yeh *et al.*, 1999), aunque en la actualidad se realizan estudios en varios laboratorios.

La información de estos genes y el entendimiento de su regulación, han sido propuestos como base que permitirá proponer estrategias para aumentar o estimular los sistemas de defensa del camarón o aumentar su resistencia para disminuir las pérdidas en el cultivo ocasionados por infecciones bacterianas o virales. Sin embargo, hasta la fecha, los resultados de aplicación de los llamados inmunoestimulantes no son totalmente concluyentes, algunos reportan activación de funciones inmunitarias (Sritunyalucksana *et al.*, 1999b), otros mayor resistencia a vibriosis (Scholz *et al.*, 1999) y algunos más describen que las condiciones de manejo y aclimatación pueden causar efecto en los componentes de defensa (Sanchez *et al.*, 2001), pero en ningún caso se ha demostrado de manera directa aumento en la expresión de los genes (incremento del ARNm) aunados a mayor cantidad de proteína que confiera mayor resistencia a enfermedades. Existe un importante grupo de proteínas llamadas antibacterianas que tienen acción directa sobre microorganismos, en particular un tipo de ellas fue descrita por primera vez en camarones penaeidos y se ha llamado peneidinas (Destoumieux *et al.*, 1997), los niveles de ARNm de peneidinas bajan en los hemocitos de camarones tratados con microorganismos al mismo tiempo que suben las concentraciones de las peneidinas en plasma (Destoumieux *et al.*, 2000), que parece indicar el ataque a los microorganismos a través de las peneidinas.

Además, recientes estudios empiezan a relacionar de modo directo proteínas involucradas en transporte de lípidos con proteínas del sistema inmunitario. La lipoproteína de alta densidad (HDL), es la proteína de reconocimiento de β glucanos provenientes de microorganismos y que participa en la activación del sistema profenoloxidasa del camarón (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1998), mientras que la VHDL es la proteína de coagulación, sugiriendo que probablemente la disponibilidad adecuada de los lípidos dietarios (Lavens, 2000) es necesaria para la formación de estas proteínas y un sistema eficiente de defensa (Chim *et al.*, 2001). Esta búsqueda dirigida de genes o actividades de genes es la estrategia más utilizada para obtener información sobre los genomas de camarones, ya antes se mencionó la búsqueda o caracterización de marcadores como RAPDS y microsatélites que buscan características de patrones de bandeo o de regiones de ADN, sin conocer de manera definida su función. Además, en la década de 1990 se propuso la caracterización de EST (*Expressed Sequence Tags*) o etiquetas de secuencias expresadas que estudia en forma de ADNc los ARNm presentes en un tejido, órgano, célula o estadio particular para proveer información inicial de la expresión de genes en esas condiciones. Usando esta metodología (Gross *et al.*, 2001), reportó genes expresados en hepatopáncreas y en hemocitos de los camarones blancos *P. vannamei* y *P. setiferus* que describen información inicial parcial de genes involucrados en funciones celulares esenciales como replicación del ADN, síntesis de proteínas por los ribosomas, etc., pero además describe una variedad esperada de genes involucrados en el sistema de defensa expresados en

los hemocitos, pero además provee información por primera vez, de que el hepatopáncreas tiene un papel importante en esta función.

En los próximos años, de seguro veremos aumentar de modo importante el conocimiento sobre los genes del camarón, la regulación de los mismos, la caracterización del genoma, así como la aplicación de estos conocimientos para contar con cultivos más eficientes, más productivos y menos costosos, así como el poder seleccionar con base en los genomas los camarones a conservar para pies de crías y de seguro el poder tener huellas genéticas *fingerprinting* individuales como ya sucede con otros organismos.

◆ Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado con los proyectos CONACYT 29091-B y 34348-B.

◆ Bibliografía

- ALCIVAR-WARREN, A., OVERSTREET, R. DHAR, A. K., ASTROFSKY, K., CARR, W. H., SWEENEY, J. y LOTZ, J. M., 1997. Genetic susceptibility of cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and baculovirus penaei: possible relationship with growth status and metabolic gene expression. *Journal of Invertebrate Pathology*. 70, 190-197.
- AUBERT, H. y LIGHTNER, D. V., 2000. Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. *Marine Biology*. 137, 875-885.
- AVISE, J. C., 1994. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. New York, Chapman and Hall.
- BAGSHAW, J. C. y BUCKHOLT, M. A., 1997. A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Gene*. 184, 211-214.
- BAGSHAW, J. C. y QUIEL, J. A., 1998. Structure and polymorphism of ribosomal RNA genes in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 159, 333-343.
- BALDWIN, J. D. B., A.L. BOWEN. B.W. y CLARK, W.H., 1998. Molecular Phylogeny and Biogeography of the Marine Shrimp *Penaeus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 10, 399-407.
- BENZIE, J. A. H., BALLMENT E. y FRUSHER, S., 1993. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. *Aquaculture*. 111, 89-93.
- BENZIE, J. A. H., 1998. Penaeid genetics and biotechnology. *Aquaculture*. 164, 23-47.
- BIERNE, N. B., I. VONAU, V. BONHOMME F. BÉDIER y E. AQUACOP, 2000. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*. 184, 203-219.

- BOORE, J. L., COLLINS, T. M., STANTON, D., DAEHLER, L. L. y BROWN, W., M., 1995. Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. *Nature*. 376, 163-165.
- BOUCHON, D., SOUTY-GROSSET, C. y RAIMOND, R., 1994. Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *P. japonicus* Bate. *Aquaculture*. 127, 131-144.
- BROOKER, A. L., BENZIE, J. A. H., BLAIR, D. y VERSINI, J.-J., 2000. Population structure of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in Australian waters, determined using microsatellite markers. *Marine Biology*. 136, 149-157.
- BROWN, T. A., 1999. Genomes. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- BURMESTER, T., 2001. Molecular Evolution of the Arthropod Hemocyanin Superfamily. *Molecular Biology and Evolution*. 18, 184-195.
- CHAN, S. M., 1995. Possible roles of 20-hydroxyecdysone in the control of ovary maturation in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Comparative Biochemistry & Physiology - C: Comparative Pharmacology and Toxicology*. 112C, 51-59.
- CHAN, S. M., CHEN, X. G. y GU, P. L., 1998. PCR cloning and expression of the molt-inhibiting hormone gene for the crab (*Charybdis feriatus*). *Gene*. 224, 23-33.
- CHANG, E. S., 1991. Crustacean molting hormones: cellular effect, role in reproduction, and regulation by molt-inhibiting hormones. En: *Frontiers of Shrimp Research*. (R. F. DeLoach, W. J. Dougherty & M. A. Davidson, eds) pp. 83-105. New York: Elsevier Science Pub.
- CHAVES, A. R., 2001. Effects of sinus gland extract on mandibular organ size and methyl farnesoate synthesis in the crawfish. *Comparative Biochemistry & Physiology - A: Comparative Physiology*. 128A, 327-333.
- CHEN, J. C., CHENG, S. Y. y CHEN, C. T., 1994. Changes of haemocyanin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry & Physiology - A: Comparative Physiology*. 109A, 339-347.
- CHEN, Y. N., TSENG, D. Y., HO P. Y. y KUO, C. M., 1999. Site of vitellogenin synthesis determined from a cDNA encoding a vitellogenin fragment in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Molecular Reproduction and Development*. 54, 215-22.
- CHIM, L., LEMAIRE, P., DELAPORTE, M., LE MOULLAC, G., GALOIS, R. y MARTIN, J. L. M., 2001. Could a diet enriched with n-3 highly unsaturated fatty acids be considered a promising way to enhance the immune defences and the resistance of Penaeid prawns to environmental stress? *Aquaculture Research*. 32, 91-94.
- CICTUS, 1984. El Cultivo del Camarón Azul *Penaeus stylirostris* Stimpson, Hermosillo, Sonora, Universidad de Sonora.
- DALL, W., HILL, J., ROTHLSBERG, P. C. y SHAPLES, D. J., 1990. The Biology of the Penaeidae, Academic Press.

- DAVEY, M. L., HALL, M. R., WILLIS, R. H., OLIVER, R. W. A., THURN, M. J. y WILSON, K. J., 2000. Five Crustacean Hyperglycemic Family Hormones of *Penaeus monodon*: Complementary DNA sequence and identification in Single Sinus Glands by Electrospray Ionization-Fourier Mass Spectrometry. *Marine Biotechnology*. 2, 80-91.
- DAVIS, G. P. y DENISE, S. K., 1998. The impact of genetic markers on selection. *Journal of Animal Science*. 76, 2331-2339.
- DE KLEIJN, D. P., SLEUTELS F. J., MARTENS, G. J. y VAN HERP F., 1994. Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*. *FEBS Letters*. 353, 255-8.
- DE LA ROSA-VÉLEZ, J., ESCOBAR, R., CORREA F. y FÉLIX E., 1999. High allozyme variation and genetic similarity of two populations of commercial penaeids, *Penaeus brevisrostris* (Kingsley) and *P. vannamei* (Boone), from the Gulf of California. *Aquaculture Research*. 30, 459-463.
- DE LA ROSA-VÉLEZ, J., ESCOBAR-FERNÁNDEZ, R., CORREA, F., MAQUEDA-CORNEJO, M. y DE LA TORRE-CUETO, J., 2000. Genetic structure of two commercial penaeids (*Penaeus californiensis* and *P. stylirostris*) from the Gulf of California, as revealed by allozyme variation. *Fisheries Bulletin*. 98, 674-683.
- DELL, S., SEDLMEIER, D., BÖCKING, D. y DAUPHIN-VILLEMANT, C., 1999. Ecdysteroid Biosynthesis In Crayfish Y-Organs: Feedback Regulation by Circulating Ecdysteroids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 41, 148-155.
- DESTOUMIEUX, D., BULET, P., LOEW, D., VANDORSSELAER, A., RODRIGUEZ, J. y BACHERÉ, E., 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (decapoda). *Journal of Biological Chemistry*. 272, 28398-28406.
- DESTOUMIEUX, D., MUÑOZ, M., COSSEAU, C., RODRIGUEZ, J., BULET, P., COMPS, M. y BACHÈRE, E., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science*. 113, 461-469.
- DIRCKSEN, H., BOCKING, D., HEYN, U., MANDEL, C., CHUNG, J. S., BAGGERMAN, G., VERHAERT, P., DAUFELDT, S., PLOSCH, T., JAROS, P. P., WAELKENS, E., KELLER, R. y WEBSTER, S. G., 2001. Crustacean hyperglycaemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the shore crab, *Carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. *Biochemical Journal*. 356, 159-170.
- FAINZILBER, M., TOM, M., SHAFIR, S., APPLEBAUM, S. W. y LUBZENS, E., 1992. Is there extraovarian synthesis of vitellogenin in penaeid shrimp? *Biological Bulletin*. 183, 233-241.
- FIGUEROA-SOTO, C. G., CALDERÓN DE LA BARCA, A. M., VÁZQUEZ-MORENO, L., HIGUERA-CIAPARA, L. y YEPIZ-PLASCENCIA, G., 1997. Purification of hemocyanin from the white shrimp (*Penaeus vannamei* Boone), by immobilized metal affinity chromatography. *Comparative Biochemistry & Physiology - B. Comparative Biochemistry*. 117B, 203-208.

- FINGERMAN, M. 1987. The endocrine mechanisms of crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*. 7, 1-24.
- GARCIA, D. K., FAGGART, M. A., RHOADES, L., ALCIVAR-WARREN, A. A., WYBAN, J. A., CARR, W. H., SWEENEY, J. N. y EBERT, K. M., 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Molecular Marine Biology & Biotechnology*. 3, 270-280.
- GARCIA, D. K. y BENZIE, J. A. H., 1995. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture*. 130, 137-144.
- GARCIA, D. K., DHAR, A. K. y ALCIVAR-WARREN, A., 1996. Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 5(1), 71-83.
- GARCIA-MACHADO, E., DENNEBOUY N., OLIVA-SUAREZ, M., MOUNOLOU, J. C. y MONNEROT, M., 1993. Mitochondrial 16S-rRNA gene of two species of shrimps: Sequence variability and secondary structure. *Crustaceana*. 65, 279-286.
- _____, 1996. Partial sequence of the shrimp *Penaeus notialis* mitochondrial genome. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III-Sciences de la Vie-Life Sciences*. 319, 473-486.
- GARCIA-MACHADO, E., ROBAINAS, A., ESPINOSA, G., OLIVA, M., PÁEZ, J., VERDECIA, N. y MONNEROT, M., 2001. Allozyme and mitochondrial DNA variation in Cuban populations of the shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biology*. 138, 701-707.
- GOLLAS-GALVÁN, T., HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. y VARGAS-ALBORES, F., 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comparative Biochemistry & Physiology - A: Comparative Physiology*. 117A, 419-425.
- GROSBERG, R. K., LEVITAN, D. R. y CAMERON, B. B., 1995. Characterization of Genetic Structure and Genealogies Using RAPD-PCR Markers: A Random Primer for the Novice and Nervous. En: *Molecular Zoology: Advances, Strategies, and Protocols*. (J. D. Ferraris & S. B. Palumbi, eds) pp. 67-100. New York: Wiley-Liss, Inc.
- GROSS, P. S., BARTLETT, T. C., BROWDY, C. L., CHAPMAN, R. W. y WARR, G. W., 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Developmental and Comparative Immunology*. 25, 565-567.
- GU, P.-L. y CHAN, S. M., 1998. The shrimp hyperglycemic hormone-like neuropeptide is encoded by multiple copies of genes arranged in a cluster. *FEBS Letters*. 441, 397-403.
- GU, P. L. Y., K. L. y CHAN, S. M., 2000. Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. *FEBS Letters*. 472, 122-126.

- GUSMÃO, J., LAZOSKI, C. y SÓLE-CAVA, A. M., 2000. A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. *Marine Biology*. 137, 435-446.
- GUTIÉRREZ-MILLÁN, L. E., PEREGRINO-URIARTE A. B., SOTELO-MUNDO, R., VARGAS-ALBORES, F. y YEPIZ-PLASCENCIA, G. Sequence and conservation of a rRNA and tRNA Val mitochondrial genes fragment from *Penaeus californiensis* and comparison with *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*. Submitted.
- HETZEL, D. J. S., CROCOS, P. J., DAVIS, G. P., MOORE, S. S. y PRESTON, N., 1997. Response to selection and heritability for growth in the Kuruma prawn, *P. japonicus*. Paper presented at: Proceedings of the Sixth International Symposium on Genetics in Aquaculture (Sterling, Scotland).
- HICKERSON, M. C. C. W., 2000. Dramatic Mitochondrial Gene Rearrangements in the Hermit Crab *Pagurus longicarpus* (Crustacea, Anomura). *Molecular Biology and Evolution*. 17, 639-644.
- HOMOLA, E. y CHANG, E. S., 1997. Distribution and Regulation of Esterases That Hydrolyze Methyl Farnesoate in *Homarus americanus* and Other Crustaceans. *General and Comparative Endocrinology*. 106, 62-72.
- HUBERMAN, A., 2000. Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture*. 191, 191-208.
- KELLER, R., 1992. Crustacean neuropeptides: Structures, functions and comparative aspects. *Experientia*. 48, 439-446.
- KHAYAT, M., SHENKER, O., FUNKENSTEIN, B., TOM, M., LUBZENS, E. y TIETZ, A., 1994. Fat transport in the penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus* (De Haan). *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*. 46, 22-32.
- KLEIN, B., LE MOULLAC, G., SELLOS, D. y VAN WORMHOUDT, A., 1996. Molecular cloning and sequencing of trypsin cdnas from *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) - use in assessing gene expression during the moult cycle. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 28, 51-563.
- KLEIN, B., SELLOS, D. y VAN, W. A., 1998. Genomic organization and polymorphism of a Crustacean trypsin multi-gene family. *Gene*. 216, 123-129.
- KLINBUNGA, S., PENMAN, D. J., MCANDREW, B. J. y TASSANAKAJON, A., 1999. Mitochondrial DNA Diversity in Three Populations of the Giant Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. *Marine Biotechnology*. 1, 113-121.
- LANG, B. F., GRAY, M. W. y BURGER, G., 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annual Review of Genetics*. 33, 351-397.
- LAUFER, H. y LANDAU, M., 1991. Endocrine control of reproduction in shrimp and other crustacea. En: *Frontiers of Shrimp Research* (P. F. DeLoach, W. J. Dougherty & M. A. Davidson, eds) pp. 65-81. New York: Elsevier Science Pub.
- LAUFER, H., BIGGERS, W. J. y AHL, J. S. B., 1998. Stimulation of Ovarian Maturation in the Crayfish *Procambarus clarkii* by Methyl Farnesoate. *General and Comparative Endocrinology*. 111, 113-118.

- LAVENS, P. S., P., 2000. Experiences on importance of diet for shrimp postlarval quality. *Aquaculture*. 191, 169-176.
- LE BOULAY, C., VAN WORMHOUDT, A. y SELLOS, D., 1996. Cloning and expression of cathepsin 1-like proteinases in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* during the intermolt cycle. *Journal of Comparative Physiology - B, Biochemical, Systemic, & Environmental Physiology*. 166, 310-318.
- LE BOULAY, C., SELLOS, D. y VAN WORMBOUDT, A., 1998. Cathepsin L gene organization in crustaceans. *Gene*. 218, 77-84.
- LE CHEVALIER, P., D., S. y VAN WORMHOUDT, A., 2000. Molecular cloning of a cDNA encoding alpha-glucosidase in the digestive gland of the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *CMLS, Cellular and Molecular Life Science*. 57, 135-1143.
- LE MOULLAC, G., KLEIN, B., SELLOS, D. y VAN WORMHOUDT, A., 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (crustacea decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 208, 107-125.
- LEE, R., 1991. Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. 7, 187-207.
- LESTER, L. J., 1979. Population genetics of penaeid shrimp from the Gulf of Mexico. *Journal of Heredity*. 70, 175-180.
- LESTER, L. J. y PANTE, M. J. R., 1992. Genetics of *Penaeus* species. En: *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. (A. W. Fast y L. J. Lester, eds.) pp. 29-52. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers.
- LEWIN, B., 1997. Genes VI. New York, Oxford University Press.
- LU, W., WAINWRIGHT, G., WEBSTER, S. G., REES, H. H. y TURNER, P. C., 2000. Clustering of mandibular organ-inhibiting hormone and moult-inhibiting hormone genes in the crab, *Cancer pagurus*, and implications for regulation of expression. *Gene*. 253, 197-207.
- LUBZENS, E. RAVID, T., KHAYAT, M., DAUBE, N. y TIETZ, A., 1997. Isolation and Characterization of the High-Density Lipoproteins from the hemolymph and ovary of the Penaeid Shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan): Apoproteins and Lipids. *Journal of Experimental Zoology*. 278, 339-348.
- MAGGIONI, R., ROGERS, A. D., MACLEAN, N. y D'INCAO, F., 2001. Molecular Phylogeny of Western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* Shrimp Based on Mitochondrial 16S Partial Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 18, 66-73.
- MARVIN, K. T., BENTON, R. C., LANSFORD, L. M. y CAILLOUET, C. W., 1977. Polymorphism in phosphohexose isomerase in white shrimp, *Penaeus setiferus* Linnaeus, and pink shrimp, *P. duorarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology. B* 57B, 95-97.
- MONTAÑO-PÉREZ, K., YEPIZ-PLASCENCIA, G., HIGUERA-CIAPARA, I. y VARGAS-ALBORES F., 1999. Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry & Physiology - B: Comparative Biochemistry* 122B, 381-387.

- MOORE, S. S., WHAN, V., DAVIS, G., BYRNE, K., HETZEL, D. J. y PRESTON, N., 1999. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*. 173, 19-32.
- MULLEY J. C. y LATER, B. D. H., 1980. Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid prawns. *Evolution*. 34, 904-916.
- MUTA, T. y IWANAGA, S., 1996. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 8, 41-47.
- NOSEK, J., TOMÁSKA, L., FUKUHARA, H., SUYAMA, Y. y KOVÁČ, L., 1998. Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line. *Trends in Genetics*. 14, 84-188.
- OHIRA T., WATANABE, T., NAGASAWA, H. y AIDA, K., 1997. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a crustacean hyperglycemic hormone from the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Molecular Marine Biology & Biotechnology*. 6, 59-63.
- PALUMBI, S. R. y BENZIE, J., 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. *Molecular Marine Biology & Biotechnology*. 1, 27-34.
- PROCTOR, R. R., MARVIN, K. T., LANSFORD, L. M. y BENTON, R. C., 1974. Phosphoglucosmutase polymorphism in brown shrimp, *Penaeus aztecus*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 31, 1405-1407.
- QUACKENBUSH, L. S., 1992. Yolk synthesis in the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry & Physiology - A: Comparative Physiology*. 103A, 711-714.
- RACOTTA, I. S. y HERNÁNDEZ-HERRERA, R., 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei* to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry & Physiology - A: Comparative Physiology*. 125A, 437-443.
- RUIZ-VERDUGO, L. M., GARCIA-BAÑUELOS, M., VARGAS-ALBORES, F., HIGUERA-CIAPARA, I. y YEPIZ- PLASCENCIA, G. M., 1997. Amino acids and lipids of the plasma HDL from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Comparative Biochemistry & Physiology - B: Comparative Biochemistry*. 118B. 91-96.
- SANCHEZ, A. PASCUAL, SANCHEZ, A., VARGAS-ALBORES, F., LE MOULLAC, G. y ROSAS C., 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*. 198, 13-28.
- SBORDONI, V., DE MATTHAEIS, E., COBOLLI-SBORDONI, M., LA ROSA, G. y MATTOCCIA, M., 1986. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Aquaculture*. 57, 239-251.
- SBORDONI, V., LA ROSA, G., MATTOCCIA, M., COBOLLI-SBORDONI, M. y DE MATTHAEIS, E., 1987. Genetic changes in seven generations of hatchery stocks of the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). En: *Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture* (K. Tiews, ed.) pp. 143-155, Berlin: Heenemann-Verlag.
- SCHOLZ, U., GARCIA-DIAZ, G., RICQUE, D., CRUZ SUAREZ, L. E., VARGAS ALBORES, F. y LATCHFORD, J. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei*

- (Boone) by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*. 176, 271-283.
- SELLOS, D. y VAN, W. A., 1992. Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *FEBS Letters*. 309, 219-224.
- SELLOS, D., LEMOINE, S. y VAN WORMHOUDT, A., 1997. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda) structure, evolution and physiological aspects. *FEBS Letters*. 407, 153-158.
- SELLOS, D. y VAN WORMHOUDT, A., 1999. Polymorphism and evolution of collagenolytic serine protease genes in crustaceans. *Biochim Biophys Acta*. 1432, 419-24.
- SOROKA, Y., SAGI, A., KHALAILA, L., ABDU, U. y MILNER, Y., 2000. Changes in protein Kinase C during vitellogenesis in the Crayfish *Cherax quadricarinatus*-Possible activation by Methyl Farnesoate. *General and Comparative Endocrinology*. 118, 200-208.
- SRITUNYALUCKSANA, K., CERENIUS, L. y SÖDERHÄLL, K., 1999a. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*. 23, 179-186.
- SRITUNYALUCKSANA, K. S., SITHISARN, P., WITHAYACHUMNARNKUL, B. y W., F. T., 1999b. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish & Shellfish Immunology*. 9, 21-30.
- SUNG, H. H., CHANG, H. J., HER, C. H., CHANG, J. C. y SONG, Y. L., 1998. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 71, 26-33.
- TAN, S. H., DEGNAN, B. M. y LEHNERT, S. A., 2000. The *Penaeus monodon* Chitinase 1 Gene Is Differentially Expressed in the Hepatopancreas During the Molt Cycle. *Marine Biotechnology*. 2, 126-135.
- TANG, C., LU, W., WAINWRIGHT, G., WEBSTER, S. G., REES, H. H. y TURNER, P. C., 1999. Molecular characterization and expression of mandibular organ-inhibiting hormone, a recently discovered neuropeptide involved in the regulation of growth and reproduction in the crab *Cancer pagurus*. *Biochemical Journal*. 343 pt 2, 355-60.
- THURN, M. J. H., M.R., 1999. Ovarian Function in the Giant Tiger Prawn (*Penaeus monodon*) as determined by *In Vitro* bioassay. *Physiological and Biochemical Zoology*. 72, 588-596.
- TSUTSUI, N., KAWAZOE, L., OHIRA, T., S., J., YANG, W.-J., WILDER, M. y AIDA, K., 2000. Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the Kurma Prawn, *Penaeus japonicus*. *Zoological Science*. 17, 651-660.
- UDOMKIT, A., CHOOLUCK, S., SONTAYANON, B. y PANYIM, S., 2000. Molecular cloning of a cDNA encoding a member of CHI/MIH/GIH family from *Penaeus monodon* and analysis of its gene structure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 244, 145-156.

- VACA, A. A. y ALFARO, J., 2000. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. *Aquaculture*. 182, 373-385.
- VAN WORMHOUDT, A., SELLOS, D., DONVAL, A., PLAIRE-GOUX, S. y LE MOULLAC, G., 1995. Chymotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Experientia*. 51, 159-163.
- VAN WORMHOUDT, A. y SELLOS, D., 1996. Cloning and sequencing analysis of three amylase cDNAs in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) - evolutionary aspects. *Journal of Molecular Evolution*. 42, 543-551.
- VARGAS-ALBORES, F., 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular responses. *Journal of Marine Biotechnology*. 3, 153-156.
- VARGAS-ALBORES, F. y YEPIZ-PLASCENCIA, G., 1998. Shrimp Immunity. *Trends in Comparative Biochemical & Physiology*. 5, 197-210.
- VARGAS-ALBORES, F. y G., Y.-P., 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*. 191, 13-21.
- WANG, Y. J. H., T. K. HOLMAN, G.M. CHAVEZ, A.R. y KEELEY, L.L., 2000. Primary structure of CHH/MIH/GIH-like peptides in sinus gland extracts from *Penaeus vannamei*. *Peptidess*. 21, 477-484.
- WHITE, S. y DENSMORE, L. D. L., 1992. Mitochondrial DNA isolation. In: *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach* (A. R. Hoelzel, ed.) pp. 29-58. New York: Oxford University.
- WILSON, K. C., V. BALLMENT, E. y BENZIE, J., 2000. The Complete Sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: Are Malacostracan crustaceans more closely related to insects than to Branchiopods? *Molecular Biology and Evolution*. 17, 863-874.
- WYBAN, J. A., SWINGLE, J. S., SWEENEY, J. N. y PRUDER, G. D., 1993. Specific pathogen free *Penaeus vannamei*. *World Aquaculture*. 24, 39-45.
- XU, Z., DHAR, A. K., WYRZYKOWSKI, J. y ALCIVARWARREN, A., 1999. Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome. *Animal Genetics*. 30, 150-156.
- YEH, M.-S., HUANG, C.-J., LEU, J. H., LEE, Y. C. y TSAI, L. H., 1999. Molecular cloning and characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *European Journal of Biochemistry*. 266, 624-633.
- YEPIZ-PLASCENCIA, G., SOTELO-MUNDO, R., VAZQUEZ-MORENO, L., ZIEGLER, R. y HIGUERA-CIAPARA, I., 1995. A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and partial characterization. *Comparative Biochemistry & Physiology - B: Comparative Biochemistry*. 111B, 181-187.
- YEPIZ-PLASCENCIA, G., VARGAS-ALBORES, F., JIMENEZ-VEGA, F., RUIZ-VERDUGO, L. M. y ROMO-FIGUEROA, G., 1998. Shrimp plasma HDL and β -glucan binding protein (BGBP)

comparison of biochemical characteristics. *Comparative Biochemistry y Physiology - B: Comparative Biochemistry*. 121B, 309-314.

YEPIZ-PLASCENCIA, G., GOLLAS, G. T., VARGAS-ALBORES, F. y GARCIA-BAÑUELOS, M.,

2000a. Synthesis of Hemolymph High-Density Lipoprotein β -Glucan Binding Protein by *Penaeus vannamei* Shrimp Hepatopancreas. *Marine Biotechnology*. 2, 485-492.

YEPIZ-PLASCENCIA, G., VARGAS-ALBORES, F. y HIGUERA-CIAPARA, L. 2000b. Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture*. 191, 177-189.

LITERATURA CITADA

- Aleivar-Warren A, Overstreet RM, Dhar AK, Astrofsky K, Carr WH, Sweeney J, Lotz JM (1997) Genetic susceptibility of cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and baculovirus penaei: possible relationship with growth status and metabolic gene expression. *Journal of Invertebrate Pathology* 70:190-197
- Aljanabi SM, Martínez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25:4692-4693
- Allendorf FW, Ryman N, Utter FM (1987) Genetics and fishery management: past, present and future. In: Ryman N, Utter F (eds) *Populations genetics and fishery management*. Washington Sea Grant Program, Univ. Wash. Press, Seattle, p 1-19
- Amato G, Gatesy J, Brazaitis P (1998) PCR assays of variable nucleotide sites for identification of conservation units: Examples from *Caiman*. In: DeSalle R, Schierwater B (eds) *Molecular Evolution: Approaches and Applications*. Birkhauser, Basel, Switzerland, p 177-189
- Andersson SGE, Kurland CG (1999) Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:535-541
- Arnaud S, Bonhomme F, Borsa P (1999) Mitochondrial DNA analysis of the genetic relationships among populations of sead mackerel (*Decapterus macarellus*, *D. macrosoma*, and *D. russelli*) in South-East Asia. *Marine Biology* 135:699-707
- Aubert H, Lightner DV (2000) Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. *Marine Biology* 137:875-885
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York
- Avise JC (1986) Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 312:325-342

- Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York
- Bagshaw JC, Buckolt MA (1997) A novell satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Gene* 184:211-214
- Bagshaw JC, Quiel JA (1997) Structure and polymorphism of ribosomal RNA genes in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 159:333-343
- Baldwin JD, Bass AL, Bowen BW, Clark WH (1998) Molecular Phylogeny and Biogeography of the Marine Shrimp *Penaeus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10:399-407
- Ball AO, Leonard S, Chapman RW (1998) Characterization of (GT)_n microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Mol. Ecol.* 7:1251-1253
- Ballard JWO (2000) Comparative Genomics of Mitochondrial DNA in *Drosophila simulans*. *Journal of Molecular Evolution* 51:64-75
- Ballard JWO (2000) Comparative Genomics of Mitochondrial DNA in Members of the *Drosophila melanogaster* Subgroup. *Journal of Molecular Evolution* 51:48-63
- Ballard JWO, Olsen GJ, Faith DP, Odgers WA, Rowell DM, Atkinson PW (1992) Evidence from 12S ribosomal RNA that onychophorans are modified arthropods. *Science* 258:1345-1348
- Bauer RT (1986) Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. *J. Crust. Biol.* 6:313-325
- Bauer RT (1991) Sperm transfer and storage structures in penaeoid shrimps: a functional and phylogenetic perspective. In: Bauer RT, Martin JW (eds) *Crustacean sexual biology*. Columbia University, New York, p 183-207
- Beard CB, Hamm DM, Collins FH (1993) The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol. Biol.* 2:103-124
- Benzie JAH (1999) Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquaculture Research* 31:95-119

- Benzie JAH (2000) Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquaculture Research* 31:95-119
- Benzie JAH, Ballment E, Frusher S (1993) Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. *Aquaculture* 111:89-93
- Benzie JAH, Frusher S, Ballment E (1992) Geographical variation in allozyme frequencies of populations of *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda) in Australia. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 43:715-725
- Berg OG, Kurland CG (2000) Why Mitochondrial Genes are Most Often Found in Nuclei. *Molecular Biology and Evolution* 17:951-961
- Bernasconi MV, Pawlowski J, Valsangiacomo C, Piffaretti J-C, Ward P (2000) Phylogeny of the Scathophagidae (Diptera, Calyptera) based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16:308-315
- Bierne N, Beuzart J, Vonau V, Bonhomme F, Bédier E, AQUACOP (2000) Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 184:203-219
- Billington N, Herbert PDN (1991) Mitochondrial DNA density in fishes and its implications for introductions. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48:80-94
- Birky CW (1995) Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:11331-11338
- Blanchette M, Kunisawa T, Sankoff D (1999) Gene order breakpoint evidence in animal mitochondrial phylogeny. *J. Mol. Evol.* 49:193-203
- Boore JL (1999) Animal Mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27:1767-1780
- Boore JL, Brown WM (1994) Mitochondrial genomes and the phylogeny of mollusks. *Nautilus* 108 (suppl. 2):61-78
- Boore JL, Brown WM (1998) Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:668-674

- Boore JL, Collins TM, Stanton D, Daehler LL, Brown WM (1995) Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. *Nature* 376:163-165
- Borgo R, Souty-Grosset C, Bouchon D, Gomot L (1996) PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. *Journal of Food Science* 61:1-4
- Bouchon D, Souty-Grosset C, Raimond R (1994) Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *P. japonicus* Bate. *Aquaculture* 127:131-144
- Boyce TM, Zwick ME, Aquadro CF (1989) Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics* 123:825-836
- Bridge D, C.W. C, Schierwater B, DeSalle R, Buss LW (1992) Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8750-8753
- Brooker AL, Benzie JAH, Blair D, Versini J-J (2000) Population structure of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in Australian waters, determined using microsatellite markers. *Marine Biology* 136:149-157
- Brown GG, Gadaleta G, Pepe G, Saccone C, Sbisà E (1986) Structural conservation and variation in the d-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 192:503-511
- Brown TA (1999) *Genomes*. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Brown WM, George MJ, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:1967-1971
- Brzuzan P (2000) Tandemly repeated sequences in mtDNA control region of whitefish, *Coregonus lavaretus*. *Genome* 43:584-587
- Bueklin A, Frost BW, Kocher TD (1992) DNA sequence variation of the mitochondrial 16S rRNA in *Calanus* (Copepoda: Calanoidea): Intraspecific and interspecific patterns. *Molecular Marine Biology & Biotechnology* 1:397-407

- Bucklin A, Kann L (1991) Mitochondrial DNA variation of copepods: markers of species identity and population differentiation in *Calanus*. Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole 181:357
- Bucklin A, Kocher TD (1996) Source regions for recruitment of *Calanus finmarchicus* to Georges Bank: evidence from molecular population genetic analysis of mtDNA. Deep-Sea Research II: Tropical Studies in Oceanography 43:1665-1681
- Bucklin A, Lajeunesse TC (1994) Molecular genetic variation of *Calanus pacificus* (Copepoda: calanoida): preliminary evaluation of genetic structure and subspecific differentiation based on mtDNA sequences. Californian Cooperative Oceanic Fisheries Investigation Report 35:45-51
- Burkenroad MD (1981) The higher taxonomy and evolution of Decapoda (Crustacea). Trans. San Diego Mus. Nat. Hist. 19:251-268
- Camin JH, Sokal RR (1965) A method for deducing branching sequences in phylogeny. Evolution 19:311-326
- Carr SM, Griffith OM (1987) Rapid isolation of animal mitochondrial DNA in a small fixed-angle rotor at ultrahigh speed. Biochemical Genetics 25:385-390
- Chen, Giles, Greenstone (2002) Molecular Evidence for a Species Complex in the Genus *Aphelinus* (Hymenoptera: Aphelinidae), with Additional Data on Aphidiine Phylogeny (Hymenoptera: Braconidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 95:29-34
- Clary DO, Wolstenholme DR (1985) The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. J. Mol. Evol. 22:252-271
- Clayton DA (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. Cell 28:693-705
- Clayton DA (1984) Transcription of the Mammalian Mitochondrial Genom. TIBS, TIBS 53:573-594
- Clayton DA (1991) Nuclear gadgets in mitochondrial DNA replication and transcription. TIBS 3:107-111

- Clayton DA (1992) Transcription and replication of animal mitochondrial DNA. *Int. Rev. Cytol.* 141:217-232
- Colbourne JK, Hebert PDN (1996) The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): a molecular phylogenetic approach. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 351:349-360
- Crease TJ (1999) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene* 233:89-99
- Crease TJ, Little TJ (1997) Partial sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Daphnia pulex*. *Current Genetics* 31:48-54
- Crozier RH, Crozier YC (1993) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* 133:97-117
- Crozier RH, Dobric N, Imai HT, Graur D, Cornuet J-M, Taylor RW (1995) Mitochondrial-DNA sequence evidence on the phylogeny of Australian jack-jumper ants of the *Myrmecia pilosula* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4:20-30
- Cummings MP, Otto SP, Wakeley J (1995) Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 12:814-822
- Curole JP, Kocher TD (1999) Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes. *Trends Ecol Evol.* 14:394-398
- Dall W, Hill J, Rothlisberg PC, Staples DJ (1990) The biology of Penaeidae. In: J.H.S. B, A.J. S (eds) *Advances in marine biology*. Academic Press, New York, USA, p 489 p.
- Davis JJ, Nixon KC (1992) Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Syst. Biol.* 41:421-435
- de la Rosa-Vélez J, Escobar R, Correa F, Félix E (1999) High allozyme variation and genetic similarity of two populations of commercial penaeids, *Penaeus brevisrostris* (Kingsley) and *P. vannamei* (Boone), from the Gulf of California. *Aquaculture Research* 30:459-463

- de la Rosa-Vélez J, Escobar-Fernández R, Correa F, Maqueda-Cornejo M, de la Torre-Cueto J (2000) Genetic structure of two commercial penaeids (*Penaeus californiensis* and *P. stylirostris*) from the Gulf of California, as revealed by allozyme variation. *Fisheries Bulletin* 98:674-683
- De Matthaeis E, Allegrucci G, Caccone A, Cesaroni D, Cobolli Sbordoni M, Sbordoni V (1983) Genetic differentiation between *Penaeus kerathurus* and *P. japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 12:191-197
- De Rijk P, de Watcher R (1997) RnaViz, a program for the visualisation of RNA secondary structures. *Nucleic Acids Res.* 25:4679-4684
- DeSalle R, Birstein V (1996) PCR identification of black caviar. *Nature* 381:197-198
- Dietrich CH, Whitcomb RF, Black IV WC (1997) Phylogeny of the grassland leafhopper genus *Flexamia* (Homoptera: Cicadellidae) based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8:139-149
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19:4008
- Edmands S (2001) Phylogeography of the intertidal copepod *Tigriopus californicus* reveals substantially reduced population differentiation at northern latitudes. *Molecular Ecology* 10:1743 -1750
- Edwards AWF, Cavalli-Sforza LL (1964) Reconstruction of evolutionary trees. In: Heywood VH, McNeill J (eds) *Phenetic and Phylogenetic Classification*. Systematics Association, London, p pp. 67-76
- Escobar R (1991) Variabilidad genética de dos poblaciones distantes del camarón café (*Penaeus californiensis* Holmes, 1900) en el Golfo de California Departamento de Ecología. CICESE, Ensenada, B.C.
- Faber JE, Stepien CA (1998) Tandemly repeated sequences in the mitochondrial DNA control region and phylogeography of the pike-perches *Stizostedion*. *Mol. Phylogen. Evol.* 10:310-322

- FAO (1998) Report of the Ad Hoc Expert Meeting on Indicators and Criteria of Sustainable Shrimp Culture. FAO, Rome, Italy, p 76 p.
- Felgenhauer BE, Abele L (1983) Phylogenetic relationships among shrimp-like decapods. In: Schram FR (ed) Crustacean phylogeny. A. A. Balkema, Rotterdam, Netherlands, p 291-311
- Felsenstein J (1973) Maximum-likelihood estimation of evolutionary trees from continuous characters. *Amer. J. Human Genetics* 25:471-492
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from gene frequencies and quantitative characters: finding maximum likelihood estimates. *Evolution* 35:1229-1242
- Felsenstein J (1993) PHYLIP (Phylogenetic Inference Package) and manual. Department of Genetics, University of Washington, Seattle
- Féral J-P (2001) How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 3788:1-26
- France SC, Kocher TD (1996) Geographic and bathymetric patterns of mitochondrial 16S rRNA sequence divergence among deep-sea amphipods, *Eurythenes gryllus*. *Marine Biology* 126:633-644
- Fuller KM, Zouros E (1993) Dispersed discrete length polymorphism of mitochondrial DNA in the scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). *Current Genetics* 23:265-369
- García DK, Benzie JAH (1995) RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture* 130:137-144
- García DK, Dhar AK, Aleivar-Warren A (1996) Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Molecular Marine Biology & Biotechnology* 5:71-83
- García DK, Faggart MA, Rhoades L, Aleivar-Warren A, Wyban JA, Carr WH, Sweeney JN, Ebert KM (1994) Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Molecular Marine Biology & Biotechnology* 3:270-280

- García-Machado E, Dennebouy N, Oliva- Suarez M, Mounolou JC, Monnerot M (1993) Mitochondrial 16S-rRNA gene of two species of shrimps: Sequence variability and secondary structure. *Crustaceana* 65:279-286
- García-Machado E, Dennebouy N, Suarez MO, Mounolou JC, Monnerot M (1996) Partial sequence of the shrimp *Penaeus notialis* mitochondrial genome. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Serie III-Sciences de la Vie-Life Sciences* 319:473-486
- García-Machado E, Pempera M, Dennebouy N, Oliva-Suarez M, Mounolou JC, Monnerot M (1999) Mitochondrial Genes Collectively Suggest the Paraphyly of Crustacea with Respect to Insecta. *Journal of Molecular Evolution* 49:142-149
- García-Machado E, Robainmas 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
- Garesse R, Carrodeguas JA, Santiago J, Pérez ML, Marco R, Vallejo CG (1997) *Artemia* mitochondrial genome: Molecular biology and Evolutive considerations. *Comparative Biochemistry and Physiology* 117B:357-366
- Gilles A, Lecointre G, Miquelís A, Loerstercher M, Chappaz R, Brun G (2001) Partial combination applied to phylogeny of European cyprinids using the mitochondrial control region. *Mol Phylogenet Evol.* 19:22-33
- Giribet G, Edgecombe GD, Wheeler WC (2001) Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature* 413:157-161
- Giribet G, Ribera C (2000) A Review of Arthropod Phylogeny: New Data Based on Ribosomal DNA Sequences and Direct Character Optimization. *Cladistics* 16:204-231
- Glaessner MF (1969) Decapoda. In: Moore RC (ed) *Treatise on invertebrate paleontology, part R, Arthropoda 4, 2*. Geological Society of America, Boulder, Colorado, and the University of Kansas, Lawrence, Kansas, p R399-R533

- Gollas-Galván T, Hernández-López J, Vargas-Albores F (1997) Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology* 117A:419-425
- Gollas-Galván T, Hernández-López J, Vargas-Albores F (1999) Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 122B:77-82
- Gollas-Galván T, Sotelo-Mundo R, Yepiz-Plascencia G, Vargas-Requena C, Vargas-Albores F (2003) Purification and characterization of $\alpha 2$ -macroglobulin from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. En Prensa.*
- Goto SG, Kimura MT (2001) Phylogenetic utility of mitochondrial *COI* and nuclear *Gpdh* genes in *Drosophila*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18:404-422
- Grandjean F, Souty-Grosset C (1996) Isolation and characterization of mitochondrial DNA from the endangered white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes pallipes*, Lereboullet, 1858. *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture* 343:175-182
- Grandjean F, Souty-Grosset C (1997) Preliminary results on the genetic variability of mitochondrial DNA in the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Sciences de la Vie / Life Sciences* 320:551-556
- Grandjean F, Souty-Grosset C, Holdich DM (1997) Mitochondrial DNA variation in four British populations of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*: implications for management. *Aquatic Living Resources* 10:121-126
- Grandjean F, Souty-Grosset C, Raimond R, Holdich DM (1997) Geographical variation of mitochondrial DNA between populations of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Freshwater Biology* 37:493-501
- Gray MW (1992) The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* 141:233-257
- Gray MW (1993) Origin and evolution of organelle genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:884-890

- Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283:1476-1481
- Gray MW, Lang BF, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Brossard N, Delage E, Littlejohn TG, Plante I, Rioux P, Saint-Louis D, Zhu Y, Burger G (1998) Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res.* 15:865-878
- Guryev V, Makarevitch I, Blinov A, Martin J (2001) Phylogeny of the genus *Chironomus* (Diptera) inferred from DNA sequences of mitochondrial *cytochrome b* and *cytochrome oxidase I*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19:9-21
- Gusmão J, Lazoski C, Sólé-Cava AM (2000) A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. *Marine Biology* 137:435-446
- Gutiérrez-Millán LE, Peregrino-Uriarte AB, Sotelo-Mundo R, Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G (2002) Sequence and conservation of a rRNA and tRNA^{Val} mitochondrial genes fragment from *Penaeus californiensis* and comparison with *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*. *Marine Biotechnology* 4:392-398
- Gutiérrez-Millán LE, Vega-Heredia S, Clavero-Salas A, Peregrino-Uriarte AB, Sánchez-Padilla M, Yepiz-Plascencia G (2002) PCR-RFLP de mtDNA como Marcador Molecular Potencial para la Autenticidad de la Identificación de Camarón IV Congreso del Noroeste en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora
- Guzmán-Murillo A, Ochoa JL, Vargas-Albores F (1993) The hemolytic activity in the haemolymph from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology* 106A:271-275
- Harris SEG, Dillion RTJ, Sandifer PA, Lester LJ (1990) Electrophoresis of isozymes in cultured *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 85:330
- Harrison RG (1989) Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology. *Trends in Ecology and Evolution* 4:6-11

- Hartl DL, Clark AG (1989) Principles of Population Genetics. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Heth DD, Rawson PD, Hilbish TJ (1995) PCRbased nuclear markers identify introduced *Mytilus edulis* genotypes in British Columbia. *Aquaculture* 137:51
- Hickerson MC, C.W. C (2000) Dramatic Mitochondrial Gene Rearrangements in the Hermit Crab *Pagurus longicarpus* (Crustacea, Anomura). *Molecular Biology and Evolution* 17:639-644
- Hoelzel AR, Green A (1992) Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. In *Molecular genetic analysis of populations*. In: Hoelzel AR (ed). Oxford University Press, Oxford, p pp. 159-187
- Hoelzel AR, Hancock JM, Dover GA (1991) Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Mol. Biol. Evol.* 8:475-493
- Hrincevich AW, Foltz DW (1996) Mitochondrial DNA sequence variation in a sea star (*Leptasterias* spp.) species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6:408-415
- Hwang JS, Lee JS, Goo TW, Yun EY, Sohn HR, Kim HR, Kwon OY (1999) Molecular genetic relationships between Bombycidae and Saturniidae based on the mitochondria DNA encoding of large and small rRNA. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 15:223-228
- Hwang UW, Kim W (1999) General properties and phylogenetic utilities of ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J. Parasitol.* 31:215-228
- Hwang UW, Park CJ, Yong TS, Kim W (2001) One-Step PCR Amplification of Complete Arthropod Mitochondrial Genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19:345-352
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJe (1990) *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., San Diego
- Jin L, Nei M (1990) Limitations of the evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 7:82-102

- Johns DR (1995) Mitochondrial DNA and disease. *N. Engl. J. Med.* 333:638-644
- Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed) *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York
- Kashyap RL, Subas S (1974) Statistical Estimation of Parameters in a Phylogenetic Tree Using a Dynamic Model. *Journal of Theoretical Biology* 47:75-101
- Kimura M (1980) A simple method for estimating the evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120
- King JL, Hanner R (1998) Cryptic species in a "living fossil" lineage: taxonomic and phylogenetic relationships within the genus *Lepidurus* (Crustacea: Notostraca) in North America. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10:23-36
- Kitaura J, Wada K, Nishida M (1998) Molecular phylogeny and evolution of unique mud-using territorial behavior in oecypodid crabs (Crustacea: Brachyura: Oecypodidae). *Mol. Biol. Evol.* 15:626-637
- Klein B, Le Moullac G, Sellos D, Van Wormhoudt A (1996) Molecular cloning and sequencing of trypsin cdnas from *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) - use in assessing gene expression during the moult cycle. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 28:551-563
- Klein B, Sellos D, A. VW (1998) Genomic organisation and polymorphism of a Crustacean trypsin multi-gene family. *Gene* 216:123-129
- Klinbunga S, Penman DJ, McAndrew BJ (1998) A preliminary study of ribosomal DNA polymorphism in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Marine Biotechnology* 6:186-188
- Klinbunga S, Penman DJ, McAndrew BJ, Tassanakajon A (1999) Mitochondrial DNA Diversity in Three Populations of the Giant Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. *Marine Biotechnology* 1:113-121

- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:6196-6200
- Koufopanou V, Reid DG, Ridgway SA, Thomas RH (1999) A molecular phylogeny of the patellid limpets (Gastropoda: Patellidae) and its implications for the origins of their antitropical distribution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11:138-156
- Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky N (2001) Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in Anophelinae (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18:479-487
- Laubier A, Pasteur N, Moriyasu M (1984) Estimation du polymorphisme enzymatique d'une population de *Penaeus japonicus* maintenue en élevage depuis quatre générations. *Oceanol. Acta* 7:451-456
- Lavrov DV, J.L. B, Brown WM (2000) The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Horseshoe Crab *Limulus polyphemus*. *Molecular Biology and Evolution* 17:813-824
- Le Boulay C, Van Wormhoudt A, Sellos D (1996) Cloning and expression of cathepsin I-like proteinases in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* during the intermolt cycle. *Journal of Comparative Physiology* 166B:310-318
- Le Moullac G, Klein B, Sellos D, Van Wormhoudt A (1997) Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (crustacea decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 208:107-125
- Lehman N, Pfrender ME, Morin PA, Crease TJ, Lynch M (1995) A hierarchical molecular phylogeny within the Genus *Daphnia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4:395-407
- Lessinger AC, Azeredo-Espin AML (2000) Evolution and structural organisation of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. *Medical and Veterinary Entomology* 14:71-80

- Lester LJ (1979) Population genetics of penaeid shrimp from the Gulf of Mexico. *J. Heredity* 70:175-180
- Lester LJ (1983) Developing a selective breeding program for penaeid shrimp mariculture. *Aquaculture* 33:41-50
- Lester LJ, Cook JP (1987) Ontogenic changes in isozyme patterns of *Penaeus* species. *Comp. Biochem. Physiol. B* 86:253-258
- Lester LJ, Pante MJR (1992) Genetics of penaeid shrimp. In: Fast AW, Lester LJ (eds) *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Elsevier, Amsterdam, p 29-52
- Levings CS, Vasil IK (1995) *The Molecular Biology of Plant Mitochondria*. Kluwer Academic Publishers, Boston
- Lewin B (1997) *Genes VI*. Oxford Univ Press, New York
- Leys R, Cooper SJB, Schwarz MP (2000) Molecular phylogeny of the large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera: Apidae), based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17:407-418
- Litjens P, Lessinger AC, Azeredo-Espin AML (2001) Characterization of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Medical and Veterinary Entomology* 15:183-188
- Ludwig A, Jenneckens J (2000) A PCR test for mitochondrial heteroplasmy in sturgeon. *Animal Genetics* 31:153-154
- Lunt DH, Whipple LE, Hyman BC (1998) Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology* 7:1441-1455
- Machida RJ, Miya MU, Nishida M, Nishida S (2002) Complete Mitochondrial DNA Sequence of *Tigriopus japonicus* (Crustacea: Copepoda). *Marine Biotechnology* 4:406-417
- Maggioni R, Rogers AD, Maclean N, D'Incao F (2001) Molecular Phylogeny of Western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* Shrimp Based on Mitochondrial 16S Partial Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18:66-73

- Mantovani B, Passamonti M, Scali V (2001) The mitochondrial cytochrome oxidase II gene in *Bacillus* stick insects: Ancestry of hybrids, androgenesis, and phylogenetic relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19:157-163
- Margulis (1981) *Symbiosis in Cell Evolution*. W.H. Freeman, San Francisco, CA.
- Martinez-Cordova LR, Porchas-Cornejo MA, Villarreal-Colmenares H, Calderon-Perez JA (1998) Winter culture of yellowleg shrimp *Penaeus californiensis* in aerated ponds with low water exchange. *Journal of the World Aquaculture Society* 29:120-124
- Martinez-Cordova LR, Porchas-Cornejo MA, Villarreal-Colmenares H, Campaña-Torres A, Perez-Alvidrez LA, Naranjo-Paramo J (1999) Alternate culture of white shrimp *Litopenaeus vannamei*, and yellowleg shrimp, *Farfantepenaeus californiensis*, during the summer-fall and fall-winter season in Sonora, Mexico. *Journal of Applied Aquaculture* 9:67-73
- Marvin KT, Benton RC, Lansford LM, Caillouet CW (1977) Polymorphism in phosphohexose isomerase in white shrimp *Penaeus setiferus* and pink shrimp *Penaeus duorarum duorarum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 57B:95-97
- Marvin KT, Caillouet CW (1976) Phosphoglucosmutase polymorphism in white shrimp, *Penaeus setiferus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 53B:127-131
- Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* 288:911-940
- Mattoccia M, La Rosa G, De Matthaeis E, Cobolli Sbordoni M, Sbordoni V (1987) Patterns of genetic variability and differentiation in mediterranean populations of *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda) *Proc. World Symp. on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux I*: 131-141
- Maus C, Peschke K, Dobler S (2001) Phylogeny of the genus *Aleochara* inferred from mitochondrial cytochrome oxidase sequences (Coleoptera: Staphylinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18:202-216

- Meyran J, Monnerot M, Taberlet P (1997) Taxonomic Status and Phylogenetic Relationships of Some Species of the Genus *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) Deduced from Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8:1-10
- Michel-Salzat AM, Bouchon D (2000) Phylogenetic analysis of mitochondrial LSU rRNA in oniscids. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences* 323:827-837
- Miya M, Nishida M (2000) Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17:437-455
- Montaño-Pérez K, Yepiz-Plascencia G, Higuera-Ciapara I, Vargas-Albores F (1999) Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 122B:381-387
- Moore SS, Whan V, Davis GP, Byrne K, Hetzel DJS, Preston N (1999) The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 173:19-32
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18:269-292
- Mulley JC, Latter BDH (1980) Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid prawns. *Evolution* 34:904-916
- Nass S, Nass MMK (1963) Ultramitochondrial Fibers with DNA characteristics. *J. Cell. Biol.* 19:593-629
- Nesbo CL, Arab MO, Jacobsen KS (1998) Heteroplasmy, length and sequence variation in the mtDNA control region of three percide fish species (*Perca fluviatilis*, *Scerina cernua*, *Stizostedion luciperca*). *Genetics* 148:1907-1919
- Newton MA (1996) Bootstrapping phylogenies: Large deviations and dispersion effects. *Biometrika* 83:315-328

- Meyran J, Monnerot M, Taberlet P (1997) Taxonomic Status and Phylogenetic Relationships of Some Species of the Genus *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) Deduced from Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8:1-10
- Michel-Salzat AM, Bouchon D (2000) Phylogenetic analysis of mitochondrial LSU rRNA in oniscids. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences* 323:827-837
- Miya M, Nishida M (2000) Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17:437-455
- Montaño-Pérez K, Yepiz-Plascencia G, Higuera-Ciapara I, Vargas-Albores F (1999) Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 122B:381-387
- Moore SS, Whan V, Davis GP, Byrne K, Hetzel DJS, Preston N (1999) The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 173:19-32
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18:269-292
- Mulley JC, Latter BDH (1980) Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid prawns. *Evolution* 34:904-916
- Nass S, Nass MMK (1963) Ultramitochondrial Fibers with DNA characteristics. *J. Cell. Biol.* 19:593-629
- Nesbo CL, Arab MO, Jacobsen KS (1998) Heteroplasmy, length and sequence variation in the mtDNA control region of three percide fish species (*Perca fluviatilis*, *Scerina cernua*, *Stizostedion luciperca*). *Genetics* 148:1907-1919
- Newton MA (1996) Bootstrapping phylogenies: Large deviations and dispersion effects. *Biometrika* 83:315-328

- Neyman J (1971) Molecular studies of evolution: a source of novel statistical problems. In: Gupta SS, Yackel J (eds) Statistical decision theory and related topics. Academic Press, New York, p 1-27
- Nosek J, L. T, Fukuhara H, Suyama Y, Kovac V (1998) Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line. Trends in Genetics 14:184-188
- Ojala D, Montoya J, Attardi G (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. Nature 290:470-474
- Padilla-Sánchez M (1999) Fragmentos de los genes mitocondriales de rRNA de los camarones *Litopenaeus vannamei*, *Farfantepenaeus californiensis* y *Litopenaeus stylirostris* Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, p 75 pp.
- Palumbi SR, Benzie JAH (1991) Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. Molecular Marine Biology & Biotechnology 1:27-34
- Palumbi SR, Cipriano F (1998) Species identification using genetic tools: the value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. Journal of Heredity 89:459-464.
- Palva TK, Palva ET (1993) Rapid isolation of fish mitochondrial DNA with a commercially available plasmid isolation kit. The Progressive Fish-Culturist 55:125-127
- Paquín B, Laforest M-J, Forget L, Roewer I, Wang Z, Longcore J, Lang BF (1997) The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. Curr. Genet. 31:380-395
- Perez ML, Valverde JR, Batuecas B, Amat F, Marco R, Garesse (1994) Speciation in the *Artemia* Genus: Mitochondrial DNA Analysis of Bisexual and parthenogenetic Brine Shrimps. Journal of Molecular Evolution 38:156-168
- Pérez-Farfante I (1969) Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. Fish. Bull. 67:461-591

- Pérez-Farfante I, Kensley B (1997) Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Keys and diagnoses for the families and genera. Backhuys Publishers, The Netherlands
- Pont-Kingdon GA, Beagley CT, Okimoto R, Wolstenholme DR (1994) Mitochondrial DNA of the sea anemone, *Metridium senile* (Cnidaria): prokaryote-like genes for tRNA^{f-Met} and small subunit ribosomal RNA, and standard genetic code specificities for AGR and ATA codons. *J. Mol. Evol.* 39:387-399
- Proctor RR, Marvin KT, Lansford LM, Benton RC (1974) Phosphoglucomutase polymorphism in brown shrimp *Penaeus aztecus*. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 31:1405-1407
- Quesada H, Wenne R, Skibinski DOF (1995) Differential introgression in mitochondrial DNA across systematic boundaries within the marine mussel genus *Mytilus*. *Proceedings of the Royal Society of London, Ser. B* 262:51-56
- Raimond R, Marcadé I, Bouchon D, Rigaud T, Bossy J, Souty-Grosset C (1999) Organization of the large mitochondrial genome in the isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics* 151:203-210
- Rand DM (1993) Endotherms, ectotherms and mitochondrial genome-size variation. *Journal of Molecular Evolution* 37:281-295
- Rand DM (1994) Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. *Trends in Ecology and Evolution* 9:125-131
- Ravago RG, Monje VD, Juinio-Meñez MA (2002) Length and sequence variability in mitochondrial control region of the milkfish, *Chanos chanos*. *Marine Biotechnology* 4:40-50
- Regier JCaJWS (1997) Molecular phylogeny of the major arthropod groups indicates polyphyly of crustaceans and a new hypothesis for the origin of hexapods. *Molecular Biology and Evolution* 14:902-913
- Richter S, Braband A, Aladin N, Scholtz G (2001) The phylogenetic relationships of "predatory water fleas" (Cladocera: Onychopoda, Haplopoda) inferred from 12S rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19:105-113

- Riga A, Monnerot M, Sellos D (1995) Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the repeated unit and the flanking gene of the scallop *Pecten maximus* mitochondrial DNA: new putative replicative origin features. *J. Mol. Evol.* 41:189-196
- Rodríguez de la Cruz C (1987) *Crustáceos Decápodos del Golfo de California*. Secretaría de Pesca, México, D.F.
- Rosenberry B (1996) World shrimp farming 1996. In: Rosenberry R (ed) *Shrimp News International*, p 167 p.
- Saccone C, Attimonelli M, Sbisa E (1987) Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 26:205-211
- Saccone C, Pesole G, Sbisa E (1991) The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. *J. Mol. Evol.* 33:83-91
- Saitoh K, Hayashizaki K, Yokoyama Y, Asahida T, Toyohara H, Yamashita Y (2000) Complete sequence of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) mitochondrial genome: structural properties and cue for resolving teleostean relationship. *J. Hered.* 91:271-278
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) A new method for sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467
- Sankoff D, Leduc G, Antoine N, Paquin B, Lang BF, Cedergren R (1992) Gene order comparisons for phylogenetic inference: evolution of the mitochondrial genome. *Proceedings National Academy Sciences, USA* 89:6575-6579
- Sarver SK, Silberman JD, Walsh PJ (1998) Mitochondrial DNA sequence evidence supporting the recognition of two subspecies or species of the Florida spiny lobster *Panulirus argus*. *Journal of Crustacean Biology* 18:177-186

- Saville BJ, Kohli Y, Anderson JB (1998) mtDNA recombination in a natural population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:1331-1335
- Sbordoni V, De Matthaeis E, Cobolli Sbordoni M, La Rosa G, Mattoccia M (1986) Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea Decapoda). *Aquaculture* 57:239-251
- Sbordoni V, La Rosa G, Mattoccia M, Cobolli Sbordoni M, De Matthaeis E (1987) Genetic changes in seven generations of hatchery stocks of the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* (Crustacea Decapoda) Proc. World Symp. on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux I: 143-155
- Schatz GE, Haslbrunner E, Tuppy H (1964) Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15:127-132
- Schneider-Broussard R, Neigel JE (1997) A large subunit mitochondrial ribosomal DNA sequence translocated to the nuclear genomes of two stone crabs. *Molecular Biology and Evolution* 14:156-165
- Schubart CD, Cuesta JA, Rodríguez A (2001) Molecular phylogeny of the crab genus *Brachynotus* (*Brachyura:Varunidae*) based on the 16S rRNA gene. *Hydrobiologia* 449:41-46
- Schwenk K, Sand A, Boersma M, Brehm M, Mader E, Offerhaus D, Spaak P (1998) Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the cladocera. *Aquatic Ecology* 32:37-51
- Sellos D, Van Wormhoudt A (1992) Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vanameii* (Crustacea, Decapoda). *FEBS* 309:219-224
- Shadel GS, Clayton DA (1993) Mitochondrial transcription initiation. *J. Biol. Chem.* 268:16083-16086
- Shao J, Tu D (1995) *The Jackknife and Bootstrap*. Springer, New York
- Sheffler IE (2000) A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1:3-31

- Shultz JW, Regier JC (2000) Phylogenetic analysis of arthropods using two nuclear protein-coding genes supports a crustacean + hexapod clade. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 267:1011-1019
- Simon C, Franke A, Martin A (1991) The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification. In: Hewitt GM, Johnston AWB, Young JPW (eds) *Molecular Techniques in Taxonomy*. NatoASI Series, p 329-355
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87:651-701
- Singh VK, Kumar A (2001) PCR primer design. *Molecular Biology Today* 2:27-32
- Slatkin (1995) Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.;
- Smith MJ, Arndt A, Gorski S, Fajber E (1993) The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene arrangements. *J. Mol. Evol.* 36:545-554
- Smith PT, Kambhampati S (1999) Status of the *Cotesia flavipes* species complex (Braconidae: Microgastrinae) based on mitochondrial 16S rRNA and NADH1 dehydrogenase gene sequence. *Journal of Kansas Entomological Society* 72:306-314
- Stanton DJ, Crease TJ, Hebert PDN (1991) Cloning and characterization of *Daphnia* mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 33:152-155
- Stepien CA, Hubers AN, Skidmore J (1999) Diagnostic genetic markers and evolutionary relationships among invasive dreissenoid and corbiculoid bivalves: Phylogenetic signal from mitochondrial 16S rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13:31-49
- Stepien CA, Kocher TD (1997) Molecules and Morphology in Studies of Fish Evolution. In: Kocher TD, Stepien CA (eds) *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, San Diego, p Ch. 1, pp. 1-11

- Sun PS (1994) Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3:1-6
- Sun PS (1995) Expression of the molt-inhibiting hormone-like gene in the eyestalk and brain of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 4:262-268
- Tam YK, Chu KH (1993) Electrophoretic study on the phylogenetic relationships of some species of *Penaeus* and *Metapenaeus* (Decapoda: Penaeidea) from the South China Sea. J. Crust. Biol. 13:697-705
- Tam YK, Kornfield I (1998) Phylogenetic relationships of clawed lobster genera (Decapoda: Nephropidae) based on mitochondrial 16S rRNA gene sequences. Journal of Crustacean Biology 18:138-146
- Tam YK, Kornfield I, Ojeda FP (1996) Divergence and zoogeography of mole crabs, *Emerita* spp (decapoda, hippidae), in the americas. Marine Biology 125:489-497
- Tassanakajon A, Pongsomboon S, Jarayabhand P, Klinbunga S, Boonsaeng V (1998) Genetic structure in wild populations of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, using randomly amplified polymorphic DNA analysis. J. Mar. Biotechnol. 6:249-254
- Tassanakajon A, Pongsomboon S, Rimphanitchayakit V, Jarayabhand P, Boonsaeng V (1997) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 6:110-115
- Taylor DJ, Hebert PDN, Colbourne JK (1996) Phylogenetics and evolution of the *Daphnia longispina* group (Crustacea) based on 12S rDNA sequence and allozyme variation. Molecular Phylogenetics and Evolution 5:495-510
- Taylor MFJ, McKechnie SW, Pierce NE, Kreitman ME (1993) The lepidopteran mitochondrial DNA control region: structure and evolution. Molecular Biology and Evolution 10:1259-1272

- Terrett J, Miles S, Thomas RH (1994) The mitochondrial genome of *Cepaea nemoralis* (Gastropoda: Stylommatophora): gene order, base composition and heteroplasmy. *The Nautilus* 108(suppl. 2):79-84
- Theisen BF, Christensen B, Arctander P (1995) Origin of clonal diversity in triploid parthenogenetic *Trichoniscus pusillus pusillus* (Isopoda Crustacea) based upon allozyme and nucleotide sequence data. *Journal of Evolutionary Biology* 8:71-80
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876-4882
- Torpe JP, Smartt J (1995) Genetic diversity as a component of biodiversity. In: Heywood VH (ed) *Global biodiversity assessment*. UNEP, Cambridge University Press, Cambridge, p 57-69
- Turan C, Carvalho GR, Mork J (1998) Molecular genetic analysis of Atlanto-Scandian herring (*Clupea harengus*) population using allozymes and mitochondrial DNA markers. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 78:269-283
- Vallejo CG, Lopez M, Ochoa P, Manzanares M, Garesse R (1996) Mitochondrial differentiation during the early development of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Biochemical Journal* 314:505-510
- Valverde JR, Batuecas B, Moratilla C, Marco R, Garesse R (1994) The complete mitochondrial DNA sequence of the crustacean *Artemia franciscana*. *Journal of Molecular Evolution* 39:400-408
- Van Wormhoudt A, Sellos D (1996) Cloning and sequencing analysis of three amylase cDNAs in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) - evolutionary aspects. *Journal of Molecular Evolution* 42:543-551
- Van Wormhoudt A, Sellos D, Donval A, Plaire-Goux S, Le Moullac G (1995) Chymotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei*(Crustacea: Decapoda). *Experientia* 51:159-163

- Vargas-Albores F, G. Y-P (2000) Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191:13-21
- Vargas-Albores F, Guzmán-Murillo A, Ochoa JL (1991) Posibles indicadores de salud de los camarones y su aplicación en la acuicultura. *Biotecnología* 1:17-25
- Vargas-Albores F, Guzmán-Murillo A, Ochoa JL (1993) A Lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* HOLMES) haemolymph. *Comparative Biochemistry and Physiology* 104A:407-413
- Vargas-Albores F, Hernández-López J, Gollas-Galván T, Montaña-Pérez K, Jiménez-Vega F, Yepiz-Plascencia G (1998) Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. In: Flegel TW (ed) *Advances in shrimp biotechnology*, Bangkok, p 26-30
- Vargas-Albores F, Jiménez-Vega F, Söderhäll K (1996) A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. *Developmental and Comparative Immunology* 20:299-306
- Vargas-Albores F, Jiménez-Vega F, Yepiz-Plascencia G (1997) Purification and comparison of β -1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 116B:453-458
- Vogler AP, Welsh A (1997) Phylogeny of North American *Cicindela* tiger beetles inferred from multiple mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8:225-235
- von Sternberg R (1996) Phylogenetic and systematic position of the *Penaeus* Subgenus *Litopenaeus* (Decapoda: Penaeidae). *Tropical Biology On Line* 44
- Vonau V, Ohresser M, Bierne N, Delsert C, Beuzart I, Bedier E (1999) Three polymorphic microsatellites in the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Animal Genet.* 30:234-235
- Wägele JW, Stanjek G (1995) Arthropod phylogeny inferred from partial 12srRNA revisited: monophyly of the Tracheata depends on sequence alignment. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 33:75-80

- Wakeley J (1996) The excess of transitions among nucleotide substitutions: new methods of estimating transition bias underscore its significance. *Trends in Ecology and Evolution* 11:158-163
- Wares JP (2001) Patterns of Speciation Inferred from Mitochondrial DNA in North American *Chthamalus* (Cirripedia: Balanomorpha: Chthamaloidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18:104–116,
- Warrior R, Gall J (1985) The mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* and *Hydra littoralis* consists of two linear molecules. *Arch. Sc. Geneve* 38:439-445
- Weiner MP, Gaskstetter T, Costa GL, Bauer JC, Kretz KA (1995) Cloning PCR-generated DNA fragments. In: Griffin AM, Griffin HG (eds) *Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends*. Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K.
- Weir B (1990) *Genetic data analysis: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Association Incorporated, Sunderland, MA.
- Williams ST, Knowlton N (2001) Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the snapping shrimp genus *Alpheus*. *Molecular Biology and Evolution* 18:1484-1493
- Wilson AC, Ochman H, Prager EM (1987) Molecular time scale for evolution. *Trends in Genetics* 3:241-247
- Wilson K, Cahill V, Ballment E, Benzie JAH (2000) The Complete Sequence of the Mitochondrial Genome of the Crustacean *Penaeus monodon*: Are Malacostracan Crustaceans More Closely Related to Insects than to Branchiopods? *Molecular Biology and Evolution* 17:863-874
- Wolf C, Burgener M, Hübner P, Lüthy J (2000) PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 33:144-150
- Wolfus GM, Garcia DK, Alcivar-Warren A (1997) Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture* 152:35-47

- Wolstenholme DR (1992) Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.* 141:173-216
- Wuthisuthmethavee S, Lumubol P, Rattanamahavichai N, Toojinda T, Tragoonrung S, Vanavichit A (2000) Development of microsatellite markers and comparison of PCR-based markers for diversification in shrimps Plant & Animal Genome VIII Conference, San Diego, CA.
- Xu Z, Dhar AK, Wyrzykowski, Alcivar-Warren A (1999) Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome. *Animal Genetics* 30:150-156
- Yamauchi MM, Miya MU, Nishida M (2002) Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Gene* 295:89-96
- Yang ZH, Yoder AD (1999) Estimation of the transition/transversion rate bias and species sampling. *J. Mol. Evol.* 48:274-283
- Yepiz-Plascencia G (1998) Manual de Prácticas. Técnicas Básicas de Biología Molecular. CIAD, Hermosillo, Sonora
- Yepiz-Plascencia G, Gutiérrez-Millán LE, Villalpando Canchola E (2002) Marcadores moleculares y genes: utilidad potencial para la camaricultura. In: Martínez-Córdova LR (ed) Camaricultura. Avances y Tendencias. AGT Editor S.A., p 111-135
- Yepiz-Plascencia G, Vargas-Albores F, Jiménez-Vega F, Ruiz-Verdugo LM, Romo-Figueroa G (1998) Shrimp plasma HDL and β -glucan binding protein (BGBP): comparison of biochemical characteristics. *Comparative Biochemistry and Physiology* 121B:309-314
- Zrzavý J, Stys P (1997) The basic body plan of Arthropoda: insights from evolutionary morphology and developmental biology. *J. Evol. Biol.* 10:353-367