

**VARIACIÓN ALÉLICA Y GENOTÍPICA DE  
LEUCIN-AMINOPEPTIDASA (LAP-2) Y FOSFOGLUCOMUTASA  
(PGM) EN *Procambarus clarkii* (DECAPODA: CAMBARIDAE),  
ACLIMATADO A DIFERENTES TEMPERATURAS Y EXPUESTO  
AL ENDURECIMIENTO TÉRMICO**

**ALLELIC AND GENOTYPIC VARIATION OF  
LEUCINE-AMINOPEPTIDASE (LAP-2) AND PHOSPHOGLUCOMUTASE  
(PGM) IN *Procambarus clarkii* (DECAPODA: CAMBARIDAE),  
ACCLIMATED AT DIFFERENT TEMPERATURES AND EXPOSED  
TO THERMAL HARDENING**

Francisco Correa S.<sup>1\*</sup>  
Fernando Díaz H.<sup>2</sup>  
Elizabeth Sierra U.<sup>2</sup>  
Luis F. Bückle R.<sup>2</sup>  
Benjamín Barón S.<sup>2</sup>  
Diana Rodríguez C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Genética  
Instituto de Investigaciones Oceanológicas  
Universidad Autónoma de Baja California  
Apartado postal 453  
Ensenada, CP 22800, Baja California, México  
\* E-mail: [correa@faro.ens.uabc.mx](mailto:correa@faro.ens.uabc.mx)

<sup>2</sup> Departamento de Acuicultura  
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)  
Km. 107 Carretera Tijuana-Ensenada  
Ensenada, CP 22860, Baja California, México

*Recibido en febrero de 1998; aceptado en mayo de 1998*

**RESUMEN**

En este estudio se analiza la variación alozimática y genotípica de leucin-aminopeptidasa (Lap-2) y fosfoglucomutasa (Pgm) en *Procambarus clarkii* de Baja California, México, sometido a diferentes condiciones térmicas. La exposición sucesiva de los organismos a la temperatura crítica máxima (TCMax) no evidenció una respuesta de endurecimiento. Sin embargo, existen diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas de Lap-2 y Pgm entre los organismos aclimatados a 20 y 33°C, y la población proveniente del campo. Por otro lado, las frecuencias de los genotipos heterocigotos de Lap-2 y Pgm son más altas en las TCMax final de 20 y 33°C, en comparación con la población proveniente del campo. Estos resultados demuestran una variación en las frecuencias alozimáticas y genotípicas que son determinadas por el efecto de la temperatura en *P. clarkii*. Se observa, además, una selección a favor de los organismos heterocigotos en las TCMax.

*Palabras clave:* *Procambarus clarkii*, variación genética, endurecimiento térmico.

## ABSTRACT

In this study, the allozymic and genotypic variation of leucine-aminopeptidase (Lap-2) and phosphoglucomutase (Pgm) in *Procambarus clarkii* from Baja California is analyzed, under different thermic conditions. The repeated exposure of the organisms to the critical thermal maximum (CTMax) did not show a hardening response. However, there are differences in the allelic and genotypic frequencies of Lap-2 and Pgm among the organisms acclimated at 20 and 33°C, and the field population. On the other hand, the frequencies of the heterozygote genotypes of Lap-2 and Pgm are higher in the final CTMax of 20 and 33°C, compared to the field population. These results show a variation in the allozymic and genotypic frequencies which are determined by the effect of temperature on *P. clarkii*. Also observed is a selection in favor of the heterozygote organisms in the CTMax.

*Key words:* *Procambarus clarkii*, genetic variation, thermal hardening.

## INTRODUCCIÓN

Los estudios genéticos en *Procambarus clarkii* han sido enfocados al análisis de la variabilidad genética de poblaciones naturales (Brown, 1981; Busack, 1988). A nivel fisiológico, los estudios están orientados al análisis de las respuestas de comportamiento sobre el preferendum térmico y evitación (Espina *et al.*, 1993; Bückle *et al.*, 1994), balance energético (Barón *et al.*, 1994; Sierra *et al.*, 1997), respuestas al estrés a altas temperaturas (Díaz *et al.*, 1994; Bückle *et al.*, 1995) y al estrés inducido por hipoxia e hipertermia (Espina *et al.*, 1995). Hasta el momento no existen estudios que integren resultados genéticos y fisiológicos. La mayoría de los estudios en esta nueva área han sido realizados en moluscos, en los cuales se tratan de encontrar correlaciones de diferentes aspectos metabólicos y sus relaciones funcionales con diferentes grados de heterocigosis (Hilbish y Koehn, 1985; Zouros y Mallet, 1989); en copépodos calanoideos (Bradley, 1978); anémonas (Hoffmann, 1985); y blénidos (Johnson, 1977).

*Procambarus clarkii* está confinado a cuerpos de agua dulce y esta restricción ofrece la ventaja de estimar la variabilidad genética y sus respuestas fisiológicas que tiene esta especie en diferentes condiciones experimentales.

El presente trabajo se basa en un estudio de Busack (1988) sobre la variabilidad genética de varias poblaciones naturales de *P. clarkii*. En ese estudio se menciona la existencia de diferencias en las frecuencias alélicas de acuerdo

## INTRODUCTION

The genetic studies on *Procambarus clarkii* have focused on the analysis of the genetic variability of natural populations (Brown, 1981; Busack, 1988). At the physiological level, the studies are oriented to the analysis of behavior responses to thermic and avoidance preferendum (Espina *et al.*, 1993; Bückle *et al.*, 1994), energy budget (Barón *et al.*, 1994; Sierra *et al.*, 1997), stress responses at high temperatures (Díaz *et al.*, 1994; Bückle *et al.*, 1995) and stress caused by hypoxia and hypothermia (Espina *et al.*, 1995). To date, there are no studies that integrate genetic and physiological results. Most of the studies in this new area focus on mollusks, which seek correlation between different metabolic aspects and their functional relationships with different degrees of heterozygosity (Hilbish and Koehn, 1985; Zouros and Mallet, 1989); on copepods (Bradley, 1978); anemones (Hoffmann, 1985); and blennies (Johnson, 1977).

*Procambarus clarkii* is confined to freshwater bodies and this restriction provides the opportunity to estimate the genetic variability and physiological responses of this species under different experimental conditions.

The present study is based on the work of Busack (1988) on the genetic variability of several natural populations of *P. clarkii*, which mentions the existence of differences in the allelic frequencies according to the geographic distribution, probably clinal variations. The differences in the allelic frequencies, particularly

con la distribución geográfica y es probable que se trate de una variación clinal. Las diferencias en las frecuencias alélicas, en particular la leucin-aminopeptidasa y la fosfoglucomutasa, se registraron en diferentes latitudes geográficas y quizás éstas sean el resultado del efecto de la temperatura en estas poblaciones. Sin embargo, existen otros factores, como la deriva genética, migración, selección y mutación, que influyen en diferentes magnitudes a nivel genético en las poblaciones de cualquier especie. Sólo el análisis de un número mayor de loci puede demostrar la estructura genética de la población en su totalidad. Sin embargo, existen loci que son polimórficos y son "sensibles" a factores externos, como pueden ser la temperatura y la salinidad. Precisamente este tipo de loci son los que hay que estudiar porque pueden aportar información sobre los patrones y procesos que ocurren durante la adaptación de los organismos al ambiente.

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo es detectar y analizar las diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas de *P. clarkii* en los loci leucin-aminopeptidasa (Lap) y fosfoglucomutasa (Pgm), en: (1) organismos provenientes del campo, (2) organismos aclimatados a dos temperaturas, y (3) organismos aclimatados y posteriormente sometidos repetidamente a la temperatura crítica máxima (TCMax).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de acociles fueron recolectadas en la represa de La Misión en Baja California, México (31°51' latitud N y 116°37' longitud O). La dureza del agua y la temperatura fueron de 680 mg/L de CaCO<sub>3</sub> y 17.0°C, respectivamente; el oxígeno disuelto fue de 7.8 mg O<sub>2</sub>/L y el pH, 8.65. Se separaron 500 organismos en dos grupos y se mantuvieron en el laboratorio en estanques de 500 L bajo un fotoperiodo simulado de 12/12 h luz/oscuridad, con un periodo de 30 min de transición, y aclimatados por un mes a 20 y 33 ± 1°C. El alimento, con 35% de proteína, fue suministrado diariamente y fue equivalente al 5% de la masa corporal, con una razón proteína:energía de 81.4 mg/Kcal.

leucine-aminopeptidase and phosphoglucomutase, were recorded at different geographical latitudes, and they may be the result of the effect of temperature on these populations. However, there are other factors, such as genetic drift, migration, selection and mutation, that influence the genetic levels of populations of any species. Only the analysis of a large number of loci can demonstrate the genetic structure of the entire population. However, there are loci that are polymorphic and "sensitive" to external factors, such as temperature and salinity. It is precisely these types of loci that must be studied, since they may provide information on the patterns and processes that occur as organisms adapt to the environment.

The objective of this work is to detect and analyze differences in the allelic and genotypic frequencies of *P. clarkii* in the leucine-aminopeptidase (Lap) and phosphoglucomutase (Pgm) loci in: (1) organisms from the field, (2) organisms acclimated at two temperatures, and (3) acclimated organisms that were later exposed repeatedly to the critical thermal maximum (CTMax).

## MATERIAL AND METHODS

The prawn samples were collected from La Misión Dam in Baja California, Mexico (31°51'N latitude and 116°37'W longitude). The hardness and temperature of the water were 680 mg/L of CaCO<sub>3</sub> and 17.0°C, respectively; dissolved oxygen was 7.8 mg O<sub>2</sub>/L, and the pH, 8.65. Five hundred organisms were separated into two groups and maintained in the laboratory in 500-L tanks, under a simulated light/dark photoperiod of 12/12 h, with transition periods of 30 min. They were acclimated for one month at 20 and 33 ± 1°C. The nutrient, with 35% protein, was supplied daily and was equivalent to 15% of the body mass, with an energy:protein ratio of 81.4 mg/Kcal.

For each acclimation temperature, 224 animals were exposed to the CTMax in 40-L aquariums, where the water temperature was increased with a 1000-W heater at a rate of 1°C/min. The time and point of the CTMax for *P. clarkii* was the complete loss of corporal equilibrium (complete loss of righting response,

Para cada temperatura de aclimatación, se expusieron 224 animales a la TCMax en acuarios de 40 L, donde la temperatura del agua se incrementó con un calentador de 1000 W a una razón de 1°C/min; el tiempo y el punto de la TCMax para *P. clarkii* fue la pérdida completa del equilibrio corporal (*complete loss of righting response*, CLRR) (Díaz *et al.*, 1994). El experimento térmico se realizó consecutivamente, exponiendo los organismos a la TCMax a las 0.0, 0.5, 1.5, 3, 6, 9, 15 y 24 h. Las TCMax de los organismos control (0.0 h) y aquellos expuestos sucesivamente hasta las 24 h fueron contrastados con la prueba de Mann-Whitney.

Los análisis electroforéticos fueron realizados en un total de 240 organismos de la población natural, de los animales aclimatados por un mes a 20 y 33°C, y de los animales sobrevivientes expuestos a la TCMax, solamente para los de 0.0 y 24 h que fueron previamente aclimatados a 20 y 33°C.

Para los análisis electroforéticos se utilizó el sistema en gel de almidón (Sigma) al 12.5% (Correa y de la Rosa, 1996). Los organismos fueron homogeneizados con una solución de Tris-HCl 0.01M pH 6.8 y centrifugados a 2°C a 10,000 rpm por 20 min. Tris-EDTA-Borato pH 8.6 fue usado como sistema amortiguador. Las condiciones electroforéticas fueron 50 mA para cada celda y 200 V por 6 h. Las enzimas analizadas fueron la leucin-aminopeptidasa (Lap; E.C. 3.4.1.1) y la fosfoglucomutasa (Pgm; E.C. 2.7.5.1). Las técnicas de tinción histoquímica de estas enzimas están ampliamente descritas en Abreu-Grobois (1983). El procesamiento de los datos electroforéticos fueron realizados con los programas BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1989) y Genepop (Raymond y Rousset, 1994). Ambos programas proporcionan los principales estimadores genéticos, como el porcentaje de heterocigosis esperado y observado, de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Las opciones #3 y #6 del Genepop fueron utilizadas para obtener la matriz de probabilidad donde se indica la independencia entre subpoblaciones, tratamientos y composición por locus, de acuerdo con la prueba exacta de Fisher, en tablas de contingencia empleando el método de Markov.

CLRR) (Díaz *et al.*, 1994). The thermic hardening was done by repeatedly exposing the organisms for 0.0, 0.5, 1.5, 3, 6, 9, 15 and 24 h to the CTMax. The Mann-Whitney test was used to compare the CTMax reached by the control organisms (0.0 h) to those exposed repeatedly for 24 h.

Electrophoretic analyses were made on 240 organisms from the natural population, the animals acclimated for a month at 20 and 33°C, and the surviving animals exposed to the CTMax for only 0.0 and 24 h that had been acclimated previously at 20 and 33°C.

A system of 12.5% starch gel (Sigma) was used for the electrophoretic analyses (Correa and de la Rosa, 1996). The organisms were homogenized with a solution of Tris-HCl 0.01 M pH 6.8 and centrifuged at 2°C at 10,000 rpm during 20 min. Tris-EDTA-borate pH 8.6 was used as a buffer system. The electrophoretic conditions were 50 mA for each cell and 200 V for 6 h. The enzymes analyzed were leucine-aminopeptidase (Lap; E.C. 3.4.1.1) and phosphoglucomutase (Pgm; E.C. 2.7.5.1). The techniques of the histochemical dyeing of these enzymes are described in Abreu-Grobois (1983). The electrophoretic data were processed with the programs BIOSYS-1 (Swofford and Selander, 1989) and Genepop (Raymond and Rousset, 1994). Both programs provide the main genetic estimators, such as the percentage of heterozygosity expected and observed, according to the Hardy-Weinberg equilibrium. Options #3 and #6 of Genepop were used to obtain the probability matrix, where the independence among subpopulations, treatments and composition per locus are indicated, according to Fisher's exact test, in contingency tables using Markov's chain method.

## RESULTS

The CTMax of *P. clarkii* observed in the control (0.0 h) and the CTMax of the organisms exposed repeatedly for 24 h at the acclimation temperatures of 20 and 33°C were not significantly different ( $P < 0.001$ ). The CTMax values for the organisms acclimated at 20°C and exposed eight times to the CTMax ranged from

## RESULTADOS

La TCM<sub>ax</sub> de *P. clarkii* observada en el control (0.0 h) y la TCM<sub>ax</sub> de los organismos expuestos sucesivamente hasta las 24 h a las temperaturas de aclimatación de 20 y 33°C no fueron significativamente diferentes ( $P < 0.001$ ). Los valores de la TCM<sub>ax</sub> para los organismos aclimatados a 20°C y expuestos ocho veces a la TCM<sub>ax</sub> tuvieron un intervalo de 38.2 a 39.0°C, y para aquellos aclimatados a 33°C, de 41.4 a 42.2°C.

La frecuencia del alelo A, en el locus Lap-2, de la población natural de *P. clarkii* es 0.986 y en los animales aclimatados a 20 y 33°C, la frecuencia de este alelo es 1.000 (tabla 1). Sin embargo, los valores inicial y final para los organismos aclimatados a 20°C y expuestos a la TCM<sub>ax</sub> es de 0.875 y 0.850, respectivamente. Cuando la temperatura de aclimatación de los animales es de 33°C y posteriormente son expuestos a la TCM<sub>ax</sub>, las frecuencias inicial y final del alelo A en el locus Lap-2 son 1.000 y 0.778, respectivamente (tabla 1). Un patrón similar se registra para el locus Pgm (tabla 1), excepto que para los organismos aclimatados a 20 y 33°C, la frecuencia alélica de A es de 0.870 y 0.854, respectivamente.

Para el locus Lap-2 en la población de campo y en los organismos expuestos a la TCM<sub>ax</sub> final aclimatados a 20 y 33°C, los valores de heterocigosis están en equilibrio ( $\alpha = 0.05$ ), de acuerdo con el modelo de Hardy-Weinberg (tabla 1). Sin embargo, para la población aclimatada a 20°C y expuesta a la TCM<sub>ax</sub> inicial se presenta una deficiencia significativa ( $\alpha = 0.001$ ) de heterocigosis. Para el locus Pgm se presenta un exceso de heterocigosis no significativo para casi todas las subpoblaciones, excepto para las expuestas a la TCM<sub>ax</sub> final de 20°C, donde existe un exceso de heterocigosis significativo ( $\alpha = 0.05$ ) y un desequilibrio, de acuerdo con el modelo de Hardy-Weinberg. Al examinar la independencia de las frecuencias alélicas de las subpoblaciones y los tratamientos térmicos (Raymond and Rousset, 1994), en Lap-2 (tabla 2) se observa que para las subpoblaciones 1-5, 1-7, 2-4, 2-5, 2-7, 3-4, 3-5 y 3-7, se rechaza la hipótesis nula de independencia ( $\alpha = 0.05$ ) entre la variación alélica del locus y los

38.2 to 39.0°C, and for those at 33°C, from 41.4 to 42.2°C.

The frequency of allele A in locus Lap-2 of the natural population of *P. clarkii* is 0.986 and in the animals acclimated at 20 and 33°C, the frequency of this allele is 1.000 (table 1). However, the initial and final values for the organisms acclimated at 20°C and exposed to the CTMax are 0.875 and 0.850, respectively. When the acclimation temperature of the animals is 33°C and they are then exposed to the CTMax, the initial and final frequencies of allele A in locus Lap-2 are 1.000 and 0.778, respectively (table 1). A similar pattern was reported for locus Pgm (table 1), except that for the organisms acclimated at 20 and 33°C, the allelic frequency of A is 0.970 and 0.854, respectively.

For locus Lap-2 in the field population and the organisms exposed to the final CTMax acclimated at 20 and 33°C, the values of heterozygosity are in equilibrium ( $\alpha = 0.05$ ), according to the Hardy-Weinberg model (table 1). However, for the population acclimated at 20°C and exposed to the initial CTMax, there is a significant heterozygosity deficiency ( $\alpha = 0.001$ ). For locus Pgm the excess of heterozygosity present is not significant for almost all subpopulations, except for those exposed to the final CTMax at 20°C, where there is a significant excess of heterozygosity ( $\alpha = 0.05$ ) and a disequilibrium, according to the Hardy-Weinberg model. Upon examining the independence of allelic frequencies in the subpopulations and thermal treatments (Raymond and Rousset, 1994) in Lap-2 (table 2), the null hypothesis of independence ( $\alpha = 0.05$ ) is rejected between the allelic variation of the locus and treatments for the subpopulations 1-5, 1-7, 2-4, 2-5, 2-7, 3-4 and 3-7. In other words, there is an effect of temperature on the allelic variation among the subpopulations. In the rest of the comparisons of Lap-2, the independence is accepted. In Pgm (table 3), the null hypothesis for the subpopulations 1-5, 1-7, 4-5 and 5-6 is rejected and, therefore, there is a significant difference ( $\alpha = 0.05$ ) in the allelic variation of the different populations.

With regard to the genotypic frequencies in Lap-2 for the natural population, the frequency of genotype AA is 0.972 and for the organisms

**Tabla 1.** Frecuencias alélicas de Lap-2 y Pgm de *Procambarus clarkii*. TCMax = temperatura crítica máxima; He (ss) = heterocigosis esperada (sin sesgo); Ho = heterocigosis observada; e.s. = error estándar; He (H-W) = heterocigosis esperada de acuerdo con las expectativas de Hardy-Weinberg; D = estadígrafo de deficiencia o exceso de heterocigotos; ( $\chi^2$ ) gl = prueba de chi cuadrada y grados de libertad.

**Table 1.** Allelic frequencies of Lap-2 and Pgm of *Procambarus clarkii*. CTMax = critical thermal maximum; He (ss) = expected heterozygosity (unbiased); Ho = observed heterozygosity; e.s. = standard error; He (H-W) = expected heterozygosity according to Hardy-Weinberg expectations; D = statistics of heterozygote deficiency or excess; ( $\chi^2$ ) gl = chi-square test and degrees of freedom.

Locus	Población de campo	Organismos aclimatados durante 30 días		TCMax aclimatado a 20°C		TCMax aclimatado a 33°C	
		20°C	33°C	Inicial 0.0 h	Final 24 h	Inicial 0.0 h	Final 24 h
<b>Lap-2</b>							
(n)	36	38	37	8	10	6	9
A	0.986	1.000	1.000	0.875	0.850	1.000	0.778
B	0.014	0.000	0.000	0.125	0.150	0.000	0.222
He (ss)	0.028	0.000	0.000	0.233	0.268	0.000	0.366
Ho	0.028	0.000	0.000	0.000	0.300	0.000	0.222
D	0.000	---	---	-1.000	0.118	---	-0.393
( $\chi^2$ ) gl	(0.000) 1	---	---	(15.077) 1	(0.199) 1	---	(1.773) 1
				***			
<b>Pgm</b>							
(n)	20	23	24	23	28	21	26
A	0.950	0.870	0.854	0.913	0.714	0.929	0.769
B	0.050	0.130	0.146	0.087	0.286	0.071	0.231
He (ss)	0.097	0.232	0.254	0.162	0.416	0.136	0.362
Ho	0.100	0.261	0.292	0.174	0.571	0.143	0.462
D	0.026	0.125	0.146	0.071	0.375	0.051	0.275
( $\chi^2$ ) gl	(0.027) 1	(0.423) 1	(0.589) 1	(0.153) 1	(4.154) 1	(0.081) 1	(2.115) 1
					*		
Ho	0.064	0.130	0.146	0.087	0.436	0.071	0.342
e.s.	(0.036)	(0.130)	(0.146)	(0.087)	(0.136)	(0.071)	(0.120)
He (H-W)	0.063	0.116	0.127	0.198	0.342	0.068	0.364
e.s.	(0.035)	(0.116)	(0.127)	(0.036)	(0.074)	(0.068)	(0.002)

\*  $P = 0.95$ ; \*\*  $P = 0.99$ ; \*\*\*  $P = 0.999$ .

tratamientos. En otras palabras, existe un efecto de la temperatura en la variación alélica entre las subpoblaciones. En el resto de las comparaciones de Lap-2 se acepta la independencia. En Pgm (tabla 3) se rechaza la hipótesis nula en las subpoblaciones 1-5, 1-7, 4-5 y 5-6, y por lo

acclimated at 20 and 33°C, it is 1.000. The frequency of the same genotype in Lap-2 for those exposed to the initial and final CTMax at 20°C is 0.875 and 0.700, respectively. The values for the initial and final CTMax of those acclimated at 33°C were 1.000 and 0.666, respectively

**Tabla 2.** Matriz de probabilidades de la hipótesis nula ( $H_0$  = independencia entre la variación del locus Lap-2 y los tratamientos;  $\alpha \geq 0.05$ , se acepta  $H_0$ ;  $\alpha < 0.05$ , se rechaza  $H_0$ ), mediante la prueba exacta de Fisher en tablas de contingencia usando el método de Markov. 1 = población natural; 2 = organismos aclimatados a 20°C por 30 días; 3 = organismos aclimatados por 30 días a 33°C; 4 = organismos TCMax inicial (0.0 h) aclimatados a 20°C; 5 = organismos TCMax final (24 h) aclimatados a 20°C; 6 = organismos TCMax inicial (0.0 h) aclimatados a 33°C; 7 = organismos TCMax final (24 h) aclimatados a 33°C; \* = uno de los pares de poblaciones con frecuencias alélicas iguales a 1.000.

**Table 2.** Probability matrix of the null hypothesis ( $H_0$  = independence between the variation of the locus Lap-2 and the treatments;  $\alpha \geq 0.05$ ,  $H_0$  is accepted;  $\alpha < 0.05$ ,  $H_0$  is rejected) with Fisher's exact test, in contingency tables using Markov's chain method. 1 = natural population; 2 = organisms acclimated at 20°C for 30 days; 3 = organisms acclimated at 33°C for 30 days; 4 = initial CTMax organisms (0.0 h) acclimated at 20°C; 5 = final CTMax organisms (24 h) acclimated at 20°C; 6 = initial CTMax organisms (0.0 h) acclimated at 33°C; 7 = final CTMax organisms (24 h) acclimated at 33°C; \* = one of the pairs of populations with allelic frequencies equal to 1.000.

	2	3	4	5	6	7
1	0.4881	0.4904	0.0836	0.0313	1	0.0052
2		*	0.0319	0.0083	*	0.0009
3			0.0299	0.0093	*	0.0012
4				1	0.4914	0.6607
5					0.2717	0.6861
6						0.1345

tanto, existe una diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) en la variación alélica de las diferentes subpoblaciones.

En relación con las frecuencias genotípicas, en Lap-2 para la población natural la frecuencia del genotipo AA es 0.972 y para los organismos aclimatados a 20 y 33°C es 1.000. La frecuencia de este mismo genotipo en Lap-2 para los animales expuestos a la TCMax inicial y final de 20°C es 0.875 y 0.700, respectivamente. Los valores para la TCMax inicial y final de los acociles aclimatados a 33°C fueron 1.000 y 0.666, respectivamente (tabla 4). Por otro lado, para la TCMax inicial y final de 20°C e inicial y final de 33°C, el genotipo AB es 0.000, 0.300, 0.000 y 0.222, respectivamente. El genotipo BB en los individuos aclimatados a 20 y 33°C que se expusieron a la TCMax repetidamente, tuvo una frecuencia inicial de 0.125 y final de 0.111, respectivamente (tabla 4).

Para los organismos del campo, la frecuencia del genotipo AA de Pgm es 0.900; para los aclimatados por 30 días a 20 y 33°C, los valores

(table 4). On the other hand, for the initial and final CTMax at 20°C, and the initial and final CTMax at 33°C, genotype AB is 0.000, 0.300, 0.000 and 0.222, respectively. Genotype BB in the individuals acclimated at 20 and 33°C and repeatedly exposed to the CTMax had an initial frequency of 0.125 and a final of 0.111, respectively (table 4).

For the field organisms, the frequency of genotype AA of Pgm is 0.900; for those acclimated during 30 days at 20 and 33°C, the values are 0.739 and 0.708, respectively (table 4). For those exposed to the initial and final CTMax at 20°C, the frequency of genotype AA is 0.826 and 0.428, respectively. This pattern is repeated for the organisms exposed to the initial and final CTMax at 33°C, with values of 0.857 and 0.538, respectively. The frequency of the heterozygote genotype AB is high for the prawns acclimated at 20 and 33°C, with respect to the field population. The frequency of genotype AB is 0.260 for the organisms acclimated at 20°C and 0.291 for those acclimated at 33°C.

**Tabla 3.** Matriz de probabilidades de la hipótesis nula ( $H_0$  = independencia entre la variación del locus Pgm y los tratamientos;  $\alpha \geq 0.05$ , se acepta  $H_0$ ;  $\alpha < 0.05$ , se rechaza  $H_0$ ).

**Table 3.** Probability matrix of the null hypothesis ( $H_0$  = independence between the variation of the locus Pgm and the treatments;  $\alpha \geq 0.05$ ,  $H_0$  is accepted;  $\alpha < 0.05$ ,  $H_0$  is rejected).

	2	3	4	5	6	7
1	0.2797	0.1714	0.6801	0.0039	1	0.0180
2		1	0.7401	0.0845	0.489	0.2969
3			0.5207	0.0976	0.3244	0.3117
4				0.0106	1	0.0591
5					0.0097	0.6612
6						0.0507

son 0.739 y 0.708, respectivamente (tabla 4). Para aquellos sometidos a la TCMax inicial y final de 20°C, la frecuencia del genotipo AA es de 0.826 y 0.428, respectivamente. Se repite este patrón para los organismos expuestos a la TCMax inicial y final de 33°C, con valores de 0.857 y 0.538, respectivamente. La frecuencia del genotipo heterocigoto AB es alta para los acociles aclimatados a 20 y 33°C respecto a la población proveniente del campo. La frecuencia del genotipo AB es de 0.260 para los organismos aclimatados a 20°C y de 0.291 para los aclimatados a 33°C. Para los animales sometidos a la TCMax inicial y final de 20°C, la frecuencia del genotipo AB es de 0.173 y 0.571, respectivamente. Se repite este mismo patrón, donde se incrementa sustancialmente la frecuencia de este genotipo en los organismos expuestos a la TCMax inicial y final de 33°C de 0.142 y 0.461, respectivamente (tabla 4).

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En *P. clarkii* expuesto continuamente a la TCMax no ocurrió la respuesta de endurecimiento térmico que se ha descrito para otros organismos (Hutchison y Maness, 1979), debido a que en los acociles aclimatados a 20 y 33°C, posiblemente se alcanzó la máxima TCMax (38.2–39.0 y 41.4–42.2, respectivamente), de acuerdo con lo mencionado por Maness y Hutchison (1980). Sin embargo, a nivel genético existen variaciones significativas

For the organisms exposed to the initial and final CTMax at 20°C, the frequency of genotype AB is 0.173 and 0.571, respectively. This same pattern is repeated, where the frequency of this genotype increases substantially in the organisms exposed to the initial and final CTMax at 33°C, of 0.142 and 0.461, respectively (table 4).

### DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The thermic hardening described for other organisms (Hutchison and Maness, 1979) did not occur in *P. clarkii* repeatedly exposed to the CTMax, possibly because the maximum CTMax (38.2–39.0 and 41.4–42.2) was reached in the prawns acclimated at 20 and 33°C, respectively, according to that mentioned by Maness and Hutchison (1980). However, there are significant variations at the genetic level, which reflect a probable positive selection of heterozygote genotypes with respect to the thermic tolerance.

A relationship is observed between the different thermic conditions to which *P. clarkii* was subjected and the quantification of the allelic and genotypic frequencies.

In the natural population and the animals acclimated at 20 and 33°C, the modifications in the genotypic frequencies in Lap-2 and Pgm are minimum; however, when the organisms are subjected to the CTMax, the values of the genotypic frequencies of AB for both loci are



**Tabla 4.** Frecuencias genotípicas de Lap-2 y Pgm de *Procambarus clarkii*. TCMax = temperatura crítica máxima.**Table 4.** Genotypic frequencies of Lap-2 and Pgm of *Procambarus clarkii*. CTMax = critical thermal maximum.

Locus	Población de campo	Organismos aclimatados durante 30 días		TCMax aclimatado a 20°C		TCMax aclimatado a 33°C	
		20°C	33°C	Inicial	Final	Inicial	Final
				0.0 h	24 h	0.0 h	24 h
<b>Lap-2</b>							
AA	0.9722	1.0000	1.0000	0.8750	0.7000	1.0000	0.6666
AB	0.0277	0.0000	0.0000	0.0000	0.3000	0.0000	0.2222
BB	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000	0.0000	0.1111
<b>Pgm</b>							
AA	0.9000	0.7391	0.7083	0.8260	0.4285	0.8571	0.5384
AB	0.1000	0.2608	0.2916	0.1739	0.5714	0.1428	0.4615
BB	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

que reflejan una probable selección positiva de genotipos heterocigotos con respecto a la tolerancia térmica.

Se observa una relación entre las diferentes condiciones térmicas a las cuales se sometió *P. clarkii* y la cuantificación de las frecuencias alélicas y genotípicas.

En la población natural y en los animales aclimatados a 20 y 33°C, las modificaciones de las frecuencias genotípicas en Lap-2 y Pgm son mínimas; sin embargo, cuando los organismos se someten a la TCMax, los valores de las frecuencias genotípicas de AB para ambos loci son altos y la frecuencia del genotipo homocigoto BB es muy baja.

La frecuencia genotípica de Lap-2 y Pgm demuestra una selección positiva, con una consecuente supervivencia del genotipo heterocigoto AB y una frecuencia baja del genotipo homocigoto BB. En este caso, los valores de heterocigosis son altos para estos dos loci cuando se incrementó la temperatura de aclimatación de 20 a 33°C, y para ambas temperaturas en la TCMax final.

Para las diferentes frecuencias alélicas y genotípicas y los distintos grados de exceso y deficiencia de heterocigotos registrados en

higher and the frequency of the homozygote BB is very low.

The genotypic frequency of Lap-2 and Pgm proves a positive selection with a consequent survival of the heterozygote genotype AB and a low frequency in the homozygote genotype BB. In this case, the values of heterozygosity are high for these two loci when the acclimation temperature is increased from 20 to 33°C, and for both temperatures in the final CTMax.

There are two possible explanations for the different allelic and genotypic frequencies and the different degrees of excess and deficiency of the heterozygotes recorded in Lap-2 and Pgm. In the first, it is probable that they are a product of selective survival in the different thermic conditions to which they were subjected. The second is that the results obtained may be due to a random effect and, due to the number of organisms analyzed for each loci and thermic condition, this condition is the least probable. The above can be confirmed by the fact that this same phenomenon has been observed in many organisms of *Artemia franciscana* from the Great Salt Lake (Utah, USA), San José (Baja California, Mexico) and Punta Araya (Venezuela) in Pgi, Pgm and Got

Lap-2 y Pgm, existen dos posibles explicaciones. En la primera explicación, es probable que sea el producto de la supervivencia selectiva en las distintas condiciones térmicas a las que fueron sometidas. Una segunda explicación es que los resultados encontrados son debidos a un efecto del azar y, debido al número de organismos analizados para cada loci y condición térmica, esta condición es menos probable. Se puede afirmar lo anterior porque se ha encontrado este mismo fenómeno en un número mayor de organismos de *Artemia franciscana* provenientes del Gran Lago Salado (Utah, EE.UU.), de San José (Baja California, México) y de Punta Araya (Venezuela) en Pgi, Pgm y Got (Correa *et al.*, en preparación). Por otro lado, con base en estos mismos estudios, se descarta la posibilidad de que el efecto de la temperatura se produzca sobre genes estrechamente ligados a Lap-2 y Pgm y en desequilibrio de ligamiento. La razón de lo anterior obedece a que la temperatura no tiene efecto alguno en aquellos loci monomórficos como Me-1, Sod-1, Sod-3 y Mpi; por otro lado, ocurre directamente en algunos loci polimórficos como Pgm. Existen otros loci polimórficos, tales como Pgi y Got-1, en los cuales no existe la evidencia suficiente de un efecto producido por la temperatura ni la salinidad.

Para sustentar la primera explicación es necesario agregar que el efecto de la temperatura en los diversos procesos y estructuras de los sistemas vivos es muy amplio. En particular, existen dos categorías en las cuales descansan la mayoría de las relaciones térmicas de los organismos. En la primera están las tasas de reacción y, en la segunda, el balance de estas reacciones. En la primera categoría se denota que un incremento en la temperatura acelera las velocidades de reacción en las cuales ocurren las transformaciones químicas. En la segunda, la temperatura tiene un efecto agudo en las constantes de las velocidades de reacción.

Gran parte de la bibliografía en el campo de la temperatura y la expresión de los genes proviene de estudios realizados en *Drosophila* (Gibson, 1970; Day y Needham, 1974; Day *et al.*, 1974a, b; Cossins y Bowler, 1987). Sin embargo, algunos autores (Cossins y Bowler, 1987) señalan que la temperatura ejerce una

(Correa *et al.*, in preparation). Based on these same studies, however, the possibility that temperature affects genes directly linked to Lap-2 and Pgm and the linkage imbalance is ruled out. The reason is that temperature does not affect monomorphic loci, such as Me-1, Sod-1, Sod-3 and Mpi. However, it does directly affect some polymorphic loci, such as Pgm. There are other polymorphic loci, like Pgi and Got-1, for which there is not sufficient evidence of an effect produced by temperature or salinity.

To sustain the first explanation, it is necessary to add that the effect of temperature on the diverse processes and structures of living systems is broad. In particular, most thermic relationships of the organisms fall into two categories. In the first one, the reaction rates are present, and in the second, there is a balance of these reactions. It is indicated in the first category that an increase in temperature accelerates the reaction velocities at which the chemical transformations occur. In the second one, temperature has an acute effect on the constants of the reaction velocities.

Much of the bibliography in the field of temperature and the expression of the genes comes from studies done on *Drosophila* (Gibson, 1970; Day and Needham, 1974; Day *et al.*, 1974a, b; Cossins and Bowler, 1987). However, some authors (Cossins and Bowler, 1987) indicate that temperature has an influence over the processes common to all organisms and, therefore, it is very probable that the results described for *Drosophila* may also be applied to other ectotherm organisms. For example, it has been reported that thermic shock causes physiological and neurological modifications with the consequent loss of corporal stability; on the other hand, the normal synthesis of proteins stops. They also indicate that the thermic impact causes a blockage in the transcription and, therefore, a failure in the genetic activity (Cossins and Bowler, 1987).

With regard to the differences in the allelic and genotypic frequencies reported in this study for *P. clarkii*, it is probable that the surviving organisms, which are heterozygotes, have enzymatic products of Lap and Pgm with appropriate kinetic properties for the temperature to which the organisms were subjected. The above

influencia sobre los procesos que son comunes a todos los organismos y, por tanto, es muy probable que los resultados que se han descrito para *Drosophila* puedan ser aplicados similarmente a otros organismos ectotermos. Por ejemplo, se ha registrado que el choque térmico causa alteraciones fisiológicas y neurológicas con la consecuente pérdida de estabilidad corporal; por otro lado, se detiene la síntesis normal de proteínas. Señalan que el impacto térmico causa un bloqueo en la transcripción y, por lo tanto, una falla en la actividad génica (Cossins y Bowler, 1987).

En cuanto a las diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas registradas en este estudio para *P. clarkii*, es probable que los organismos sobrevivientes, que son heterocigotos, tienen productos enzimáticos de Lap y Pgm con propiedades cinéticas apropiadas para las temperaturas a las cuales los organismos estuvieron sometidos. Lo anterior puede explicar, además, la razón de que se encontraran variaciones (Busack, 1988), posiblemente clinales, en las frecuencias alélicas en estos loci en diferentes poblaciones geográficas de *P. clarkii*.

En este contexto, es necesario continuar el análisis y confirmar para esta especie que estos productos enzimáticos, bajo este diseño experimental, poseen propiedades cinéticas diferentes.

Se puede concluir que estos resultados demuestran una variación en la selección alozimática y genotípica que influye, probablemente, en *P. clarkii* de Baja California, para sobrevivir a temperaturas extremas. Con estos resultados es necesario explorar y analizar la dinámica de los efectos en la tolerancia térmica, los productos enzimáticos específicos y sus constantes de reacción ( $K_m$ ) relacionados con estos dos loci y el mantenimiento de la homeóstasis en estos organismos.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Jorge de la Rosa-Vélez, del Laboratorio de Genética de la Universidad Autónoma de Baja California, y a Doménico Voltolina, del CIBNOR, la revisión crítica del manuscrito; así como a los revisores anónimos y a todos las personas que de una forma u otra mejoraron sustancialmente este artículo.

can also explain the reason why variations were found (Busack, 1988), possibly clinal, in the allelic frequencies of these loci in different geographical populations of *P. clarkii*.

In this context, it is necessary to continue the analysis and verify that enzymatic products, under this experimental design, have different kinetic properties for this species.

The results obtained in this study indicate a variation in the allozymic and genotypic selection that probably induces *P. clarkii* from Baja California to survive at extreme temperatures. With these results, it is necessary to explore and analyze the dynamics of the effects on thermic tolerance in the specific enzymatic products and their reaction constants ( $K_m$ ), related to these two loci and the maintenance of the homeostasis in these organisms.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Our thanks to Jorge de la Rosa-Vélez, of the Genetics Laboratory of the Universidad Autónoma de Baja California, and Doménico Voltolina, of CIBNOR, for their critical review of the paper; and to all the people who in one way or another helped to improve this manuscript. This study was financed by CONACYT (project 205-N9203).

English translation by the authors.

---

Este estudio fue financiado por el CONACYT (proyecto 205-N9203).

#### REFERENCIAS

- Abreu-Grobois, F.A. (1983). Population genetics of *Artemia*. Ph.D. thesis, Univ. Coll. Swansea, UK, 438 pp.
- Barón, S.B., Díaz, H.F. and Bückle, R.L.F. (1994). Energy budget for the red swamp crawfish *Procambarus clarkii* (Crustacea, Cambaridae). Riv. Ital. Acquacoltura, 29: 103-107.
- Bradley, B.P. (1978). Genetic and physiological flexibility of a calanoid copepod in thermal stress. In: J.H. Thorp and J.W. Gibbons (eds.), Energy and Environmental Stress in Aquatic Systems. Technical Information Center, US Dept. of Energy, pp. 452-469.

- Brown, K. (1981). Low genetic variability and high similarities in the crayfish genera *Cambarus* and *Procambarus*. *Am. Midland Naturalist*, 105: 225-232.
- Bückle, R.L.F., Díaz, H.F., Correa, S.F., Barón, S.B. and Hernández, H.M. (1994). Diel thermoregulation of the crawfishes *Procambarus clarkii* (Crustacea, Cambaridae). *J. Therm. Biol.*, 19: 419-422.
- Bückle, R.L.F., Díaz, H.F. and Espina, S. (1995). Thermoregulatory behavior applied to the culture of *Procambarus clarkii* (Decapoda: Cambaridae). *Rev. Biol. Trop.*, 44: 123-126.
- Busack, C.A. (1988). Electrophoretic variation in the red swamp (*Procambarus clarkii*) and white river crayfish (*P. acutus*) (Decapoda: Cambaridae). *Aquaculture*, 69: 211-226.
- Correa, F. and de la Rosa, J. (1996). Allozymatic variation in three populations of *Artemia franciscana* from Mexico. In: G. Gajardo and P. Coutteau (eds.), *Improvement of the Commercial Production of Marine Aquaculture Species. Proc. of a Workshop on Fish and Mollusc Larviculture*, Chile, 1996, pp. 165-171.
- Cossins, A.R. and Bowler, K. (1987). *Temperature Biology of Animals*. Chapman and Hall, London, 339 pp.
- Day, T. and Needham, L. (1974). Properties of alcohol dehydrogenase isozymes in a strain of *Drosophila melanogaster* homozygous for the Adh-slow allele. *Biochem. Genet.*, 11: 167-175.
- Day, T., Hillier, P.C. and Clarke, B. (1974a). Properties of genetically polymorphic isozymes of alcohol dehydrogenase isozymes in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, 11: 141-153.
- Day, T., Hillier, P.C. and Clarke, B. (1974b). The relative quantities and catalytic activities of enzymes produced by alleles at the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, 11: 155-165.
- Díaz, H.F., Espina, S. and Bückle, R.L.F. (1994). Thermal stress responses of *Procambarus clarkii*. *Riv. Ital. Acquacoltura*, 29: 149-159.
- Espina, S., Díaz, H.F. and Bückle, R.L.F. (1993). Preferred and avoided temperatures in the crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda, Cambaridae). *J. Therm. Biol.*, 18: 35-39.
- Espina S., Bückle, R.L.F. and Díaz, H.F. (1995). Stress induced by hypoxia and hyperthermia in *Procambarus clarkii* (Crustacea, Cambaridae). *Riv. Ital. Acquacoltura*, 30: 111-115.
- Gibson, J. (1970). Enzyme flexibility in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 227: 959-960.
- Hilbish, T.J. and Koehn, R.K. (1985). Genetic variation in nitrogen metabolism in *Mytilus edulis*: contribution of the Lap locus. In: P.E. Gibbs (ed.), *Proc. 19th European Marine Biology Symp.*, Plymouth, Devon, UK, 16-21 September 1984. Cambridge, pp. 497-504.
- Hoffmann, R.J. (1985). Thermal adaptation and the properties of phosphoglucose isomerase allozymes from a sea anemone. In: P.E. Gibbs (ed.), *Proc. 19th European Marine Biology Symp.*, Plymouth, Devon, UK, 16-21 September 1984. Cambridge, pp. 505-514.
- Hutchison, V.H. and Maness, J.D. (1979). The role of behavior in temperature acclimation and tolerance in ectotherms. *Am. Zool.*, 19: 367-384.
- Johnson, M.S. (1977). Association of allozymes and temperature in the crested blenny *Anoplarchus purpurescens*. *Mar. Biol.*, 41: 147-152.
- Maness, J.D. and Hutchison, V.H. (1980). Acute adjustment of thermal tolerance in vertebrate ectotherms following exposure to critical thermal maximum. *J. Therm. Biol.*, 5: 225-233.
- Raymond, M. and Rousset, F. (1994). GENEPOP. Lab. de Génétique et Environnement, Inst. des Sciences de l'Evolution, Montpellier, France.
- Sierra, U.E., Díaz, H.F. and Bückle, R.L.F. (1997). Effect of unilateral eyestalk ablation on the physiological energetics of *Procambarus clarkii* (Decapoda, Cambaridae). *Riv. Ital. Acquacoltura*, 32: 105-113.
- Swofford, D. and Selander, R. (1989). BIOSYS-1: A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Univ. of Illinois.
- Zouros, E. and Mallet, A.L. (1989). Genetic explanations of the growth/heterozygosity correlation in marine mollusks. In: J.S. Ryland and P.A. Tyler (eds.), *Reproduction, Genetics and Distributions of Marine Organisms. Proc. 23rd European Marine Biology Symp.*, Swansea, Wales, 5-9 September 1988. Olsen and Olsen, Denmark, pp. 317-324.