



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

“Desarrollo de Marcadores Genéticos tipo microsatélites e intrones para mapeo genético en *Litopenaeus vannamei*”

Tesis de Grado
Previa a la obtención del título de:

MAGISTER EN CIENCIAS

Presentada por:
Juan Cristóbal Ortiz Tirado

Guayaquil – Ecuador

2004

TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:



FUNDACIÓN CENAIM-ESPOL



COOPERACIÓN TÉCNICA BELGA



**UNIVERSIDAD DE GANTE
BÉLGICA**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE LOVAINA – BÉLGICA**

VITA

Juan Cristóbal Ortiz Tirado, hijo de Marcos Ortiz y Alicia Tirado, nació el 3 de septiembre de 1969 en Quito, Ecuador. Recibió el Título de Ictiólogo – Acuicultor, Master en Ciencias Biológicas en la Universidad Pesquera de Astrakhán - Rusia en el año 1994. De 1994 a 1996 dirigió varios criaderos de trucha y tilapia, y se desempeñó como consultor de organismos gubernamentales y no gubernamentales; entre las principales: Fundación Natura, RICHTISARM Cia. Ltda., ECORAE, MICIP, Municipio de Quito. En 1998 es contratado por la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE) como profesor titular y coordinador del proyecto de producción de trucha arco iris en la hacienda “El Prado”. En 2002 es aceptado por la Cooperación Técnica Belga (CTB) y la Fundación CENAIM-ESPOL para realizar una Maestría en Ciencias con especialidad en Acuicultura Marina en la Escuela Superior Politécnica del Litoral en Ecuador.

DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL.”

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

Juan Cristóbal Ortiz Tirado.

TRIBUNAL DE TESIS

Eduardo Cervantes, Ing.
Presidente del Tribunal

Filip Volckaert, Ph.D.
Director de Tesis

Franklin Pérez, Ph.Dc.
Codirector Tesis

Jorge Calderón, Ph.D.
Miembro del Tribunal

José Luis Santos, Ph.D.
Miembro de Tribunal

Julie Nieto, Ph.D.
Miembro del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios y la Santísima Virgen María por brindarme la vida, protección y circunstancias que permitieron conocer mi actitud sobre la oportunidad brindada.

A mis dos queridas hijas Anita Belén y Alicia Margarita que con su paciencia, ternura, alegría y en algunos momentos tristeza supieron asimilar estos dos años de ausencia.

A Wali y mi querida Lili, con su ánimo, cariño y firmeza, en los momentos apropiados me brindaron el apoyo necesario.

A mi querida Madre y hermanos que siempre han estado conmigo, en todo momento.

A la Fundación CENAIM – ESPOL, ESCUELA POLITECNICA DEL LITORAL y la COOPERACIÓN TÉCNICA BELGA, en especial a la Dra. Laurence Massaut, por la oportunidad brindada.

A la ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO por su auspicio y apoyo.

Al Dr. Franklin Pérez por la idea, guía, y empeño por cumplir con el presente proyecto.

Al Laboratorio de Genética por el apoyo incondicional en todo el proceso de desarrollo, gracias Mariuxi, César y Maritza.

A mis compañeros, Ricardo, Sarita, María Elena y Edgar que permitieron que el objetivo planteado el 3 de Septiembre del 2002 se haga realidad.

A los Señores Investigadores por su conocimiento, respeto y amabilidad.

A todo el personal del CENAIM, Ing. Andrés Pedrazzoli, Vanesa, Yelita, Ricardo, Irma, Fanny, Fabricio, Mariuxi, Julio, Miguel Angel, Rosita, Doña Mari, Doña Ceci, Alejandra, Nancy, operarios y guardias por el apoyo y ánimo brindado.

DEDICATORIA

*A mis dos adorables angelitos, Anita Belén y Alicia Margarita
Para Walito y mi Gordita Bella.....*

INDICE

LISTA DE TABLAS.....	1
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ANEXOS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS	XV
RESUMEN	XVI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 MARCADORES MOLECULARES	5
2.2 MICROSATELITES.....	5
2.3 SECUENCIAS EST.....	7
2.4 INTRONES Y EXONES	8
2.5 SSCP (SINGLE STRAND CONFORMATIONAL POLYMORPHISM)	9
2.6 MAPA GENETICO	10
2.7 MARCADORES SSR, SSR-ESTS E INTRONES EN ACUICULTURA.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 EVALUACIÓN DE SECUENCIAS Y DISEÑO DE PRIMERS	18
3.2. EVALUACIÓN DE PRIMERS.....	19
3.2.1 Material Biológico.....	19
3.2.2 Extracción de DNA	19
3.2.3 Amplificación de Microsatélites e Intrones por PCR.....	20
3.2.4 Electroforesis	21
3.2.5 Tinción De Plata.....	22
3.2.6 Fotografía Y Determinacion De Tamaños De Las Bandas	24
3.3. ANALISIS GENÉTICO DE LA INFORMACION	24
3.3.1 Amplificación inicial.....	24
3.3.2 Análisis de la diversidad genética y segregación mendeliana.....	25

3.3.2.1.	Heterocigocidad observada o H_o	25
3.3.2.2.	Heterocigocidad esperada o H_e	26
3.3.2.3.	Equilibrio Hardy-Weinberg ó H-W.....	26
3.3.2.4.	Evaluación para Segregación Mendeliana	27
3.3.3	Single–Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	27
3.3.4	Análisis de homologación de marcadores amplificados. (BLAST).....	28
4.	RESULTADOS	29
4.1.	SSR EN SECUENCIAS EST	29
4.1.1	Minado De Datos	29
4.1.2	Barrido Inicial De Primers.....	30
4.1.3	Diversidad Genética Y Segregación Mendeliana	33
4.1.4	Análisis De SSCP.....	36
4.1.5	Identificación y homologación de secuencias.....	36
4.2.	MARCADORES BASADOS EN SECUENCIAS INTRÓNICAS.....	36
4.2.1	Barrido Inicial De Primers.....	37
4.2.2	Segregación Mendeliana.....	40
4.2.3	Análisis SSCP	41
4.2.4	Identificación de secuencias.	42
5.	DISCUSION.....	43
5.1.	SSR EN SECUENCIAS EST	43
5.2.	MARCADORES INTRÓNICOS	51
5.3	INTEGRACION DE RESULTADOS	54
6.	CONCLUSIONES.....	57
7.	RECOMENDACIONES.....	59
8.	BIBLIOGRAFIA.....	60
9.	ANEXOS	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Pasos para la tinción con nitrato de plata (Dinesh <i>et al.</i> , 1995)	23
Tabla 2. Pasos para geles delgados 0,4 mm (Beidler <i>et al.</i> , 1982)	23
Tabla 3. Patrones de SSR – ESTs encontrados por exploración de datos en <i>Litopenaeus vannamei</i>	30
Tabla 4. Marcadores EST-SSR desarrollados en <i>Litopenaeus vannamei</i> mostrando productos de tallas no esperadas (30 o más pares de bases esperadas) en tres especies de camarón.	32
Tabla 5. Polimorfismo de primers EST – SSR y equilibrio Hardy-Weinberg de <i>Litopenaeus vannamei</i> en un panel de prueba con individuos silvestres. Número de individuos amplificados, número de alelos. Talla mínima y máxima del alelo. Heterocigocidad esperada y observada. Valor P y Error Estándar de la prueba exacta para el equilibrio Hardy-Weinberg.	34
Tabla 6. Modelo de segregación mendeliana y probabilidad en pruebas de Chi cuadrado (χ^2) para un conjunto de marcadores, evaluados en un panel de segregación de <i>Litopenaeus vannamei</i>	35
Tabla 7. Marcadores intrónicos desarrollados en <i>Litopenaeus vannamei</i> mostrando productos de tallas no esperadas (30 o más pares de bases esperadas) en cinco especies de camarón. 39	
Tabla 8. Modelo De Segregación Mendeliana Y Probabilidad En Pruebas De Chi Cuadrado (χ^2) Para Un Conjunto De Marcadores En Secuencias Intrónicas, Evaluados En Un Panel De Segregación De <i>Litopenaeus Vannamei</i>	41

LISTA DE FIGURAS

- Fig 1. Equipos de electroforesis S2 (Life Technologies GIBCO BRL®) S3S (OWL Separation System®) y Sequi-Gene® -GT (BIORAD)22
- Fig 2. Primer CNM-MG-639. a. Amplificación por PCR en un panel con animales silvestres de diferentes especies de camarón. b. Segregación Mendeliana en una progenie con 14 individuos de *L. vannamei*38
- Fig 3. Frecuencia alélicas versus tamaño de alelos (pares de bases) para los locus en secuencias intrónicas de tres especies de camarón : *L. vannamei* (set de mapeo), *L. vannamei* silvestre y *L. stylirostris*.38
- Fig 4. Primer CNM-MG 712. a. Amplificación por PCR en un panel con camarón silvestre de diferentes especies.42

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Marcadores EST-SSR e información de polimorfismo en <i>Litopenaeus vannamei</i> en un pequeño panel multiespecies constituido por <i>L. vannamei</i> , <i>L. stylirostris</i> y <i>T. birdy</i> . En cada especie se presenta el tamaño de bandas y número de alelos.	70
Anexo 2. Marcadores EST-SSR e información de polimorfismo en <i>Litopenaeus vannamei</i> en un panel multiespecies constituido por: <i>L. vannamei</i> , <i>L. stylirostris</i> , <i>F. californiensis</i> , <i>F. duorarum</i> y <i>T. birdy</i> . En cada especie se presenta el tamaño de bandas y número de alelos	78
Anexo 3. Homologación de marcadores SSR – ESTs de <i>L. vannamei</i> con proteínas conocidas.	80
Anexo 4. Marcadores intrónicos e información de polimorfismo en <i>Litopenaeus vannamei</i> en un panel de prueba constituido por <i>L. vannamei</i> de un set de mapeo y animales silvestres: <i>L. vannamei</i> , <i>L. stylirostris</i> , <i>F. californiensis</i> , <i>F. duorarum</i> y <i>T. birdy</i> . Se presenta el tamaño de banda y número de alelos observados.	81
Anexo 5. Homologación de marcadores intrónicos de <i>L. vannamei</i> con proteínas conocidas.	86

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
C	Citosina
cDNA	DNA complementario
cM	Centi Morgans
DAF	DNA – amplification fingerprinting
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxi-nucleótidos trifosfatados
EF1 α	<i>Factor de elongación 1α</i>
EPIC – PCR	Exon primed intron crossing
EST	Expressed sequence tags
g	Gramos
G	Guanina
<i>H.W</i>	Hardy Weinberg
<i>H_E</i>	Heterocigocidad esperada
<i>H_O</i>	Heterocigocidad observada
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
kb	Kilobase
P	Valor de probabilidad
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>P_i</i>	Frecuencia alélica
<i>P_o</i>	Polimorfismo
QTL	Loci de caracteres cuantitativos
RAPD	Random Amplified Polimorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
T	Timina
TFPGA	Tools for Population Genetics Analysis
UTR	Untranslated region the part of the mRNA
WSSV	White Spot Syndrome Virus

RESUMEN

Mediante el minado de datos (Data Mining), se analizaron secuencias EST públicamente disponibles para *L. vannamei*. La identificación de SSR en ESTs así como la homologación de ESTs contra el genomio completo de *D. melanogaster* generaron un total de 459 pares de primers. Su evaluación con varias especies de camarón (*L.vannamei*, *L stylirostris*, *F. californiensis*, *F.duorarum* y *T byrdi*), permitió obtener marcadores polimórficos útiles para mapeo genético en *L. vannamei* Se encontró que 3,8% de los ESTs evaluados contenían repeats tipo microsatélite con una frecuencia de 1 repetición cada 7,8 kb. Doscientos ochenta y seis primers fueron diseñados para SSR – ESTs y 173 primers para intrones previa homologación con 7.439 secuencias de ESTs y cDNA contra el genomio de *D. melanogaster*. Se obtuvieron productos amplificados para 129 loci con SSR – ESTs y 53 loci con intrones . Un alto porcentaje (56%) de EST – SSRs y (38%) intrones fueron transferibles dentro del genero *Litopenaeus*. Más de la mitad de los productos amplificados fueron polimórficos en un pequeño panel de prueba de *L. vannamei*. Evaluación de SSR- ESTs en un panel de prueba compuesto por animales silvestres mostró que el 72% de los marcadores cumplen con el equilibrio Hardy-Weinberg, indicando su utilidad en análisis de genética de poblaciones. El número de alelos fue de 2 – 24 con un promedio de 6,2. Adicionalmente un set de 28 SSR-ESTs y 17 intrones fueron evaluados por Segregación Mendeliana. Evidencia de alelos nulos se encontró en 5 de ellos. Un alto porcentaje de marcadores SSR- ESTs monomórficos (44%) y moderado en intrones(25%), mostraron ser polimórficos en un análisis de SSCP. Microsatélites e intrones polimórficos obtenidos en ésta investigación podrán ser usados en mapeo genético y estudios de poblaciones tanto en *L. vannamei* como en otras especies de camarón. El minado de datos en base de datos públicos son

una alternativa tecnológica que permite la generación de marcadores codominantes a bajo costo y en cantidades superiores a los obtenidos con técnicas tradicionales.

ABSTRACT

Public EST Sequences available were analyzed for *L. vannamei* by data mining. The identification of SSR in ESTs and intron sequences generated 459 primers which were evaluated against *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* and *T. byrdi*. These markers are useful for genetic map in *L. vannamei*. *F. californiensis*, *F. duorarum*. Repeat motifs were found in 3.8% of the evaluated ESTs at a frequency of one repeat every 7.8 for SSR. Two hundred eighty-six primers were designed for SSR – ESTs and 173 primers for introns. A total of 125 loci with SSR – ESTs and 53 loci with introns amplified. A high percentage (56%) of EST – SSRs and (38%) introns were transferable within the genus *Litopenaeus*. More than half of the amplified products were polymorphic in a small testing panel of *L. vannamei*. Evaluation of those primers in a larger testing panel showed that 72% of the markers fit the Hardy-Weinberg equilibrium, which shows their utility for populations genetics analysis. The number of alleles ranged from 2 to 24 with an average of 6.2. Additionally a set of 28 SSR-ESTS and 17 introns were evaluated for Mendelian Segregation. Evidence for null alleles was found for 5 of them. A high percentage of SSR- ESTs monomorphic markers (44%) and moderate in introns (25%) showed to be polymorphic by single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. Due to high number of ESTs available in public databases, the research and development of molecular markers in shrimp species could be a biotechnological alternative of high performance and low cost.

1. INTRODUCCIÓN

Litopenaeus vannamei es la principal especie de cultivo en la Industria Acuícola del Ecuador. Entre enero y octubre del 2003 se produjeron 103,14 millones de libras, lo que equivale a exportaciones por 253,41 millones de dólares (Cámara Nacional de Acuicultura, 2003). La importancia de la actividad camaronera avala la búsqueda de tecnologías alternativas para el incremento productivo, eficiencia, sanidad, calidad de producto y la viabilidad económica de empresas acuícolas.

Los programas de selección y mejoramiento genético son procesos redituables tanto para actividades agrícolas como pecuarias (Pérez, 2001). En Ecuador se han implementando programas de selección en crecimiento y supervivencia mediante esquemas basados en selección masal o familiar (Calderón, 2001).

Argue y Alcívar (2000) indican que hay falta de información sobre genes responsables de caracteres económicos como crecimiento y tolerancia y/o resistencia a virus. Esta información permitirá el entendimiento de la ubicación de loci de caracteres cuantitativos (QTL) en mapas genéticos lo cual puede ser utilizado para selección asistida con marcadores moleculares y la clonación de genes responsables de dichos rasgos (Alcívar-Warren, 2001).

Los caracteres de interés comercial son controlados por QTLs, es decir muchos genes con pequeños efectos aditivos (Falcomer, 1989; Moore, 1999). Estudios comparativos realizados en diferentes especies muestran que los efectos genéticos pueden ser

identificados y localizados en regiones particulares del genoma. Estos efectos pueden ser detectados mediante el análisis de fenotipos con marcadores moleculares en un mapa genético. (Davis y Hetzel, 2000).

Los marcadores moleculares son usados en una amplia gama de estudios genéticos. A niveles básicos con técnicas de genotipado, es posible la identificación de germoplasma, la determinación de pureza de líneas y el análisis de diversidad genética. Estudios más profundos que involucran la selección asistida por marcadores moleculares para selección de líneas con rápido crecimiento, resistencia a enfermedades, calidad proteica de cereales, etc, involucran la identificación de esos genes en mapas de ligamiento. La información de mapas genéticos puede llevar en último lugar a la clonación de genes de interés y su uso en transgénesis (www.inia.cl/biotecnologia/areas/mmolec).

Los marcadores moleculares están clasificados en dos tipos: marcadores de tipo I con identidades funcionales conocidas (ESTs, intrones, microsatélites-ESTs), y marcadores tipo II con funciones desconocidas (Microsatélites, RAPDs, AP-PCR, DAF, AFLP, Isoenzimas, RFLPS) (O'Brien, 1991; Lessa, 1992).

Los marcadores tipo II como los microsatélites, se han desarrollado exitosamente en programas acuícolas (Tassanakajon *et al.*, 1998; Bierne *et al.*, 2000; Davis y Hetzel, 2000; Alcívar-Warren *et al.*, 2001; Espinoza *et al.*, 2001; De la Cruz *et al.*, 2002; Meehan *et al.*, 2003), sin embargo hay dificultades en el aislamiento, secuenciación, manejo de protocolos, rendimiento, así como un alto costo para obtener gran número de

microsatélites útiles para mapeo en peneidos (Tassanakajon *et al.*, 1998 ; Moore, 1999; Liu *et al.*, 1999; Scott,2001; Hare *et al.*, 2003; Touriya *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003).

Los marcadores Tipo I, que corresponden a genes de función conocida, sirven como puntos de anclaje que permiten la transferencia de información genética entre diferentes cruces o familias y son responsables de caracteres de interés productivo como crecimiento o resistencia a enfermedades (Li *et al.*, 2004). Marcadores Tipo I como los microsatélites e intrones en secuencias ESTs (Expressed sequence tags – etiquetas de secuencias expresadas) son importantes y se utilizan en proyectos para mapeo genético como en el caso del bagre de canal (Liu *et al.*, 1999; Serapion *et al.*, 2004); carpa común, carpa silvestre (Yue *et al.*, 2004); seguimiento de poblaciones tanto en teleostos como mamíferos (Hare *et al.*, 2003; Touriya *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003) . Estudios utilizando marcadores ESTs e intrones en *peneidos* han demostrado su utilidad (Duda *et al.*, 1999; France *et al.*, 1999; Bierne *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2001; Rojtinnakorn *et al.*, 2002). Es importante mencionar que para el caso de peneidos existe una extensa base de datos de secuencias ESTs de libre acceso y a bajo costo depositado en bancos de secuencias de DNA. (Scott, 2001; Liu *et al.*, 1999; Liu, 2003).

En este contexto, el desarrollo de marcadores moleculares codominantes (que permiten visualizar la segregación de los genes aportados por el padre y la madre) con técnicas confiables, de alto rendimiento y bajo costo tienen una enorme importancia en la investigación genética del camarón. Este proyecto de investigación pudo desarrollarse bajo el auspicio económico de la Cooperación Técnica Belga (CTB) y el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas “Edgar Arellano” .

El objetivo general de nuestro estudio se enmarcó en desarrollar marcadores moleculares para *L. vannamei* con el uso de secuencias tipo EST disponibles públicamente. Esta aproximación incluyó el minado de datos y manejo de recursos bioinformáticos.

Como objetivos específicos nos propusimos lo siguiente:

- Determinar frecuencia de SSR-ESTs en el minado de datos.
- Determinar polimorfismo de marcadores SSR- ESTs, diseñado bajo los métodos propuestos.
- Determinar polimorfismo a nivel de secuencias intrónicas en *L. vannamei*.
- Demostrar la utilidad de marcadores obtenidos para mapeo en *L. vannamei*.

2. ANTECEDENTES

2.1 MARCADORES MOLECULARES

Marcador molecular es cualquier fenotipo molecular producto de la expresión de un gen o de segmentos específicos de DNA, que pueden ser detectados y su herencia monitoreada. Un marcador molecular recibe el nombre de marcador genético cuando su comportamiento se rige a las leyes básicas de la herencia mendeliana (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los marcadores moleculares están incorporados en dos categorías: marcadores con funciones conocidas cuyas secuencias de nucleótidos se encuentran dentro de los genes (ESTs, intrones, Microsatélites-ESTs), y marcadores con funciones desconocidas es decir secuencias fuera de los genes (Microsatélites, RAPDs, AP-PCR, DAF, AFLP, Isoenzimas, RFLPS) (O'Brien, 1991; Palumbi *et al.*, 1994; Liu, 2003; Li *et al.*, 2004).

2.2 MICROSATELITES

Los microsatélites, conocidos también como STR polymorphism (Short Tandem Repeat Polymorphism por sus siglas en Inglés) o SSR (Simple Sequence Repeats) son secuencias repetidas en tandem de DNA. Los patrones de repetición corresponden a bases nucleicas que pueden ser mono-, di-, tri – tetra o pentanucleótidos. Un ejemplo de patrón trinucleótido puede ser ATC repetido en un mínimo de 4 veces. Los microsatélites son altamente variables, heredados de los padres, abundantes y se distribuyen en todo el genoma. Los alelos múltiples en un microsatélite son producto de la variación en el número de repeticiones. La gran ventaja de los microsatélites es su

alta variación o alto número de alelos, por lo cual son considerados como marcadores muy polimórficos (Van der Werf *et al.*, 1989). El análisis de microsatélites se realiza mediante la amplificación por PCR y la separación de bandas en geles de poliacrilamida. Por su naturaleza técnica estos marcadores generan información de forma fácil, rápida, y a bajo costo una vez que la técnica está establecida (Bello, 2001; Touriya *et al.*, 2003).

Sin embargo el desarrollo de microsatélites en forma tradicional requiere de la generación de una librería de DNA genómico la cual es tamizada para aislar clones que contengan repeticiones tipo microsatélite. Los clones positivos son entonces secuenciados y esa información es utilizada para diseñar iniciadores de PCR para loci específicos. El esfuerzo de construcción de librerías y la secuenciación es un problema que encarece el desarrollo de estos marcadores (Liu *et al.*, 1999; Scott, 2001; Touriya *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003).

Los microsatélites están distribuidos a lo largo del genoma en eucariotas, a baja frecuencia en regiones codificantes y quizá telómeros, y su presencia en regiones codificantes se han asociado a enfermedades (Bello, 2001). Se desconoce el significado funcional de éstas secuencias, aunque la hipótesis más aceptada apunta a que están relacionadas con el empaquetamiento y condensación del DNA en los cromosomas de eucariotes (Comeron *et al.*, 1999; Hare *et al.*, 2003).

2.3 SECUENCIAS EST

ESTs (Expressed sequence tags – etiquetas de secuencias expresadas-), son secuencias incompletas de cDNA. La amplificación de estas secuencias mediante la técnica de PCR permite probar la presencia de este fragmento marcado. La mayoría de los ESTs son generados en la región del 3' UTRs (3'untranslated region the part of the mRNA). ESTs corresponden a marcadores tipo I cuando se conoce la función del cDNA del cual son parte (www.ucl.ac.uk). El DNA complementario o cDNA corresponde a la copia del mRNA (mensajero) con la intervención de la enzima reversa transcriptasa. Como el mRNA es la copia fiel de la parte codificante de un gen, un EST es un fragmento del gen. El mRNA (mensajero) migra del núcleo celular conteniendo la información codificada y por traducción, dirigirá la síntesis de polipéptidos (Russell, 1992).

Las secuencias EST son fáciles de obtener y altamente transferibles entre especies cercanas (Liu *et al.*, 1999; Scott, 2001). Microsatélites derivados de secuencias EST de fuentes como EMBL y GenBank, son identificados a través de una búsqueda electrónica y su función putativa puede ser asignada mediante comparación con bases de proteínas. Para la amplificación de ESTs se requiere del diseño de primers. Con esta técnica se puede obtener microsatélites a bajo costo, alto rendimiento e identificación de genes útiles para aplicaciones particulares (Rojtinnakorn *et al.*, 2002; Liu, 2003). Por ejemplo, en uvas, microsatélites derivados de EST tuvieron características de mononucleótidos de diez o más repeticiones, dinucleótidos de siete o más repeticiones y trinucleótidos de cinco o más repeticiones. Estos microsatélites constituyeron el 2.5% de una base de datos de ESTs. El 2.5% incluye 46 dinucleótidos no redundantes y 78 trinucleótidos con

repeticiones no redundantes, de un total inicial de 5000 secuencias. Esto claramente ilustra una gran cantidad de microsatélites en una base de datos de secuencias EST (Scott, 2001).

2.4 INTRONES Y EXONES

La información de una proteína en el DNA nuclear está formada por dos grupos de secuencias: intrones y exones. Los intrones son secciones de secuencias nucleotídicas no codificantes que no se traducen en proteína. Los intrones deben eliminarse del pre-mRNA para que el transcrito pueda convertirse en mRNA maduro. La parte de los genes que corresponde al RNA maduro y que tiene secuencias de nucleótidos codificantes se llaman exones (Russell, 1992).

El pre-mRNA que tiene tanto exones como intrones se encuentra solamente en el núcleo; debido a los eventos de procesamiento, se remueven los intrones y los exones se unen (splicing), produciendo el rRNA maduro el cuál es trasladado al citoplasma para su traducción. Por tanto si se definen los genes solamente como regiones del DNA codificantes de aminoácidos, la presencia de intrones claramente indica que los genes en eucariotas son piezas. Si por el otro lado se define al gen como la región del DNA correspondiente al transcrito primario del RNA, entonces toda la cadena de secuencias codificantes o no (exones e intrones) conforman el gen. (Russell, 1992).

Marcadores nucleares para estudios intraspecíficos muestra niveles relativamente altos de variación neutral (Lessa,1992; Bradley y Hills, 1997). El enfoque para encontrar tales marcadores se concentran en los intrones, en genes nucleares altamente conservados. Un

beneficio de estos marcadores intrónicos es el diseño de primers "universales" que reconocerá a regiones de exones sumamente conservados y que flanquea con regiones no codificantes de los intrones (France *et al.*, 1999; Bierne *et al.*, 2000).

Para amplificar intrones, se utilizan primers diseñados en base al flanqueo de exones en PCR. Este enfoque es conocido como EPIC- PCR (exon primed intron crossing) (Palumbi, 1994, Duda *et al.*, 1999, Bierne *et al.*, 2000). Utilizando ésta técnica, France *et al.* (1999) realizó un estudio de la variación de intrones en la región nuclear, en poblaciones de *L.vannamei*. Los mismos autores encontraron secuencias intrónicas del factor de elongación 1α ($EFl\alpha$) determinando alta variabilidad entre especies dentro de una población.

2.5 SSCP (SINGLE STRAND CONFORMATIONAL POLYMORPHISM)

SSCP es una técnica de alta definición para separación de fragmentos de DNA. Los fragmentos a analizar son desnaturalizados por calor en presencia de un agente desnaturalizante (formamida o urea). Los fragmentos son separados por migración electroforética (Silva y Russo, 2000). Esta técnica es aplicable para estudios de mapeo genético y genética poblacional en camarones Peneidos (Tong *et al.*, 2002).

Los SSCPs son utilizados para el análisis de intrones y exones con lo que se puede identificar variabilidad genética en una cadena simple de DNA, típicamente entre 150 y 250 nucleótidos en longitud. (Humphries *et al.*, 1997). Análisis por SSCP es capaz de diferenciar el cambio de una base en una secuencia del tamaño indicado.

Adicionalmente entre 80 y 85% de mutaciones de punto pueden ser identificadas por este método. En geles no denaturalizantes –sin adición de urea- una cadena de DNA adoptará una conformación que es exclusiva y dependiente de la composición de dicha secuencia. La conformación tridimensional del fragmento de DNA dependerá del apareamiento interno entre las diferentes bases que lo conforman mediante plegamientos sobre sí mismo (Humphries *et al.*, 1997). Según el mismo autor el grado de sensibilidad cambiará si en la secuencia una de las bases de la cadena es removida. En especies marinas análisis de SSCPs han sido utilizados para estudios de genética de poblaciones marinas (Small and Gosling, 2000).

El uso de la técnica SSCP fue implementada para el desarrollo del genoma completo de zebrafish. Más de 100 pares de primers derivados de regiones no codificantes de genes conocidos y parcialmente caracterizados en secuencias de cDNA fueron analizados y un polimorfismo aproximado del 50% fue detectado. (Fornzler *et al.*, 1998). Por tanto la combinación de ESTs con la técnica de SSCP ha demostrado su utilidad para la generación de alto número de marcadores.

2.6 MAPA GENETICO

Un mapa genético permite establecer la ubicación y distancia entre genes (loci) o marcadores genéticos presentes en los cromosomas. La distancia en un mapa genético está determinada por la fracción de recombinación entre dos loci . La unidad de medida son los Centi Morgans (cM) que representa la frecuencia de recombinación entre las dos locaciones y determina la frecuencia en la cuál estos genes son esperados para la

recombinación (Van der Werf *et al.*, 1989). Mediante la ubicación de genes es posible homologar regiones entre especies (Davis y Hetzel, 2000).

Un mapa genético bien surtido de marcadores es una herramienta muy útil para identificar genes responsables de caracteres de interés. Se trata de buscar la asociación entre varios alelos, en cualquiera de los marcadores, segregando en poblaciones que presenten el carácter de interés, para identificar regiones del genoma donde es más probable que se encuentre el gen responsable de ese carácter (Cheng *et al.*, 1995). De esta manera, mapeo genético es el uso de cruces genéticos para localizar genes relacionados uno con otro en los cromosomas mediante la utilización de marcadores moleculares (Russell, 1992).

2.7 MARCADORES SSR, SSR-ESTS E INTRONES EN ACUICULTURA

Meehan *et al.* (2003) reportan que 11,7 % de 1479 clones obtenidos de *L.vannamei* contienen microsatélites genómicos positivos con pruebas de hibridación y secuenciación. De estos 173 clones (11,7%), con un proceso de optimización en los protocolos y manejo en el proceso de amplificación 136 tuvieron suficientes secuencias en los flancos para permitir el diseño de primers de los cuales el 68 % amplificaron satisfactoriamente y fueron polimórficos. El tamaño de los microsatélites amplificados varió desde 98 bp a 470 bp y un PIC (Polymorphic information content) desde 0,195 a 0,871. En los 93 clones amplificados (68%), 51 contienen simples o múltiples alelos estándares, menores a 6 repeticiones. Es conocido que la información de marcadores de microsatélites se incrementa con el número de repeticiones del

microsatélite (Weber, 1990). Sin embargo no hay una razón para excluir microsatélites con un número de repeticiones pequeñas ya que estos muestran polimorfismo y un grado de heterocigocidad de entre 10 y 100%. (Meehan *et al.*, 2003).

Otro trabajo realizado por De la Cruz *et al.*, (2002) permitió aislar cinco microsatélites polimórficos que han sido caracterizados para *L.vannamei*. Dos de los microsatélites encontrados tienen más de 10 alelos que serían útiles para programas de selección genética, mientras los otros serían un aporte para el seguimiento genético de poblaciones.

Los microsatélites han demostrado un alto poder discriminatorio y sensibilidad para el estudio de variación genética en la comparación de muestras salvajes con poblaciones cultivadas (Espinoza *et al.*, 2001). La heredabilidad y las correlaciones genéticas son los parámetros que definen la extensión de la variación genética entre los rasgos dentro de una población y la estimación de estos rasgos es comercialmente importante para el desarrollo y éxito en los programas de mejoramiento genético (Davis y Hetzel, 2000).

Giovambattista (2001) indica que el uso de una batería de marcadores moleculares altamente polimórficos, con herencia mendeliana simple y alelos de tipo codominante (microsatélites) puede resolver casos de paternidad discutida. Análisis estadísticos de microsatélites con una probabilidad cercana a la unidad demuestran que el análisis de polimorfismo del DNA es una herramienta de utilidad para resolver identificación individual. Esta técnica es útil en el seguimiento de programas de mejoramiento basados en selección familiar para comprobar el manejo adecuado de cruces.

Individuos relacionados familiarmente comparten los mismos alelos de microsatélites. Si se realizan cruces entre parientes es posible detectarlos mediante marcadores codominantes. Un estudio realizado por Bierne *et al.*, (2000) con microsatélites pudo encontrar un efecto de heterosis (alelos diferentes no consanguíneos) asociado a crecimiento en líneas domesticadas de *L. stylirostris*. La carga residual de consanguinidad en las tasas de crecimiento demostró que la consanguinidad es negativa en el caso del camarón.

Utilizando información de una serie de ESTs secuenciados, varios primers fueron diseñados para *P. monodon*. (Tong *et al.*, 2002). El 30% de los primers evaluados exhibieron polimorfismo utilizando la técnica de separación de DNA de cadena simple (SSCP). Algunos ESTs fueron amplificados satisfactoriamente en otras especies de *Penaeus* (*P. chinensis*, *M. japonicus* y *L.vannamei*), indicando que estos marcadores son aplicables en la comparación interespecífica en camarón (Tong *et al.*, 2002).

La expresión de genes en hemocitos en *M. japonicus*, fue investigado usando secuencias en EST. De 635 clones obtenidos de una librería de cDNA, 44,7% mostraron homologías significativas con proteínas ya caracterizadas (Rojtinnakorn *et al.*, 2002). En una librería de cDNA desarrollada a partir de animales infectados de *M. japonicus* con WSSV, de 370 clones 47% dieron secuencias significativas para una base de datos. Ciento cincuenta y dos nuevas proteínas fueron identificadas y de éstas 28 están incluidas en mecanismos de biodefensa. De una librería derivada de animales no infectados el rendimiento para proteínas de defensa es de 2 al 7 %, mientras que una

librería infectada con WSSV, el porcentaje de proteínas de defensa va del 7 al 15% (Rojtinnakorn *et al.*, 2002).

El uso de ESTs para desarrollo de marcadores tipo microsatélite ha sido demostrado previamente. Yue *et al.*, (2004) identifica 36 nuevos microsatélites para la carpa común (*Cyprinus carpio*) obtenidos en genes depositados en GenBank, en secuencias EST desarrolladas de librerías de cDNA y librerías genómicas enriquecidas con repeticiones de CA. El mismo autor menciona que todos, excepto dos, fueron polimórficos con un número promedio de 7.3 alelos /locus. Microsatélites localizados en genes y en ESTs muestran alto número de alelos comparados con aquellos aislados de una librería genómica de DNA (7.7/locus vs 4.9/locus). Se demuestra que existe una tasa de transferencias del 41.7% inter - especie, con la carpa silvestre (*Carassius auratus gibelio*).

Para mapear el siluro de canal (*Ictalurus punctatus*) se escogió y secuenció aleatoriamente 100 cDNA de una biblioteca de pituitaria de la misma especie. Las secuencias EST se utilizaron para diseñar primers y amplificar los DNA genómicos de: siluro de canal y siluro azul (*I. furcatus*). Los productos de PCR de ESTs se analizaron para determinar polimorfismo. Once marcadores polimórficos de EST se identificaron. Cinco de los 11 marcadores de EST eran de genes conocidos y los otros seis eran de ESTs no identificados. Siete ESTs se asociaron a secuencias de microsatélites. El análisis de secuencias de genes del siluro de canal indica alta influencia en secuencias codantes (exones), demostrando su expresión en proteína ribosomal y hormonas (Liu *et al.*, 1999).

Los microsatélites genómicos son ampliamente utilizados y proveen una alta calidad en los datos, pero generalmente la alta especificidad de primers no pueden ser utilizados a nivel taxa, con otras especies. En cambio los marcadores basados en ESTs o intrones pueden proveer amplia información sobre polimorfismo nuclear usando “primers universales”, altamente transferibles entre especies cercanas. Generalmente son polimórficos, algunas veces hipervariables, de naturaleza codominantes y en el caso de intrones se presume selectividad neutral. Al igual que los microsatélites genómicos, los EST-SSRs y los EPICs, son fácilmente amplificables por PCR, se visualizan en geles de poliacrilamida, y en gran número pueden ser obtenidos a bajo costo cuando existe información previa depositada en los bancos de secuencias genéticas (Palumbi y Baker, 1994; Bierne *et al.*, 2000; Touriya *et al.*, 2003).

France *et al.* (1999) evaluaron diferentes loci nucleares y determina que las secuencias intrónicas del factor de elongación *EF 1 α* son altamente variables entre individuos de una misma población en *L. vannamei*. La Secuenciación de los fragmentos de PCR generados en esta región, con primers *EF 1 α* ; *EF 0* y *EF 2* reveló un intrón simple en *L. vannamei*. Esas secuencias fueron identificados por alineamiento con otras secuencias, en el Banco Génico y caracterizado por patrones de secuencias intrónicas en 5' (GT) y 3' (AG). Estos primers amplificaron fragmentos de aproximadamente 260 bp, encontrándose una longitud promedio para intrones entre 191 y 200 bp. Se identificó 13 alelos, entre 44 individuos cultivados. Eso mostró la alta heterocigocidad en muestras de diferentes poblaciones de *L. vannamei* y la relación cercana de esta especie con *L. stylirostris* (7.6% máxima diferencia). Por otro lado la distancia entre *L. vannamei* y *P. monodon* fue mayor (14,2-22,3%) (France *et al.*, 1999).

Bierne, (2000) reporta amplificación de nueve intrones en un estudio utilizando material genético de *P. monodon* y *L.vannamei*. De los nueve marcadores desarrollados, cuatro amplificaron en ambas especies. Esos autores indican que el tamaño, posición y secuencia de los marcadores observados no sigue una regla específica. El número de alelos obtenidos fue de dos a seis mostrando alta heterocigocidad.

En Duda y Palumbi, (1999) el tamaño de los productos amplificados confirma la presencia de un intrón de aproximadamente 200 bp dentro del gen *EF 1 α* en *P. monodon*. Se obtuvieron 69 diferentes secuencias alélicas de 112 fragmentos. La longitud estuvo entre 183 – 213 nucleótidos de los cuales 23 nucleótidos fueron secuencias codantes y 159 invariantes.

En el trabajo de Touriya *et al.* (2003), cinco pares de primers fueron diseñados en regiones conservadas de exónes flanqueando intrones de interés. Se probaron en 16 especies marinas y peces de agua dulce, reptiles y mamíferos (humanos y camellos). El objetivo de este estudio fue demostrar el grado de universalidad de primers intrónicos. Para peces, la tasa de éxito en la amplificación fue del 93%, además, se compararon muy bien con marcadores moleculares desarrollados para otras especies, especialmente polimorfismo. La mayoría de fragmentos tuvieron longitudes entre 100 y 1000 bp. Las amplificaciones mostraron perfiles capaces de discriminar especies y para estudios intra-específicos. Otro estudio en peces, Hasson, (2002) demostró que de 17 intrones, 14 (82%) son polimórficos, con un tamaño de 2 a 14 alelos. Liu, (2003) determina que las secuencias intrónicas en *Ictalurus punctatus*, son altamente variables y contienen microsatélites. En ese trabajo de 50 secuencias evaluadas 42 (84%) productos

amplificaron, y 19% incluye secuencias con microsátélites. Estudios en maíz y avena demuestran que el 46 y 58% de marcadores intrónicos son polimórficos para cada especie (Holland *et al.*, 2001).

Las referencias citadas visualizan un conjunto de técnicas para la obtención de marcadores moleculares en la genética de especies acuáticas. Estos trabajos permiten puntualizar nuestra investigación en *L. vannamei*, con nuevas alternativas tecnológicas, fáciles de utilizar y a bajo costo, como es el minado de datos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 EVALUACIÓN DE SECUENCIAS Y DISEÑO DE PRIMERS

Para el desarrollo de marcadores tipo microsatélite e intrones para mapeo genético en *L.vannamei* se utilizaron secuencias EST, previamente publicadas en Marine Genomics (<http://www.marinegenomics.org>) y NCBI (National Center for Biotechnology Information)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Esas secuencias fueron descargados y almacenados en una base de datos local en formato FASTA (<https://s03.muh.musc.edu/blast/docs/fasta.html>).

Todas las secuencias fueron evaluadas con el software Tandem Repeat Finder (Benson, 1999). Las secuencias seleccionadas para microsatélites fueron usadas para el diseño de primers con longitudes entre 16 y 22 bp utilizando el software Primer Premier (<http://www.PremierBiosoft.com/primerdesign/index.html>).

Secuencias tipo ESTs de *L.vannamei* que no contenían microsatélites fueron comparadas contra el genómio completo anotado de *Drosophila melanogaster* para determinar genes homólogos y posición de intrones. Las secuencias con alta similaridad a genes de *Drosophila melanogaster* sirvieron para el diseño de primers en áreas de intrones anotados para la mosca de la fruta (<http://www.ensembl.org>). Primers fueron diseñados con el software Primer Premier.

Se obtuvieron 224 juegos de primers correspondientes a EST-SSRs los cuales fueron fabricados en Estados Unidos (Texas Midland Reagents, Tx.). Adicionalmente 62

juegos de primers también dirigidos a SSR-ESTs y 173 juegos correspondientes a secuencias intrónicas putativas, producto de la comparación con el genomio de *D. melanogaster*, fueron elaborados en Taiwán (Bioneer Corporation Inc).

3.2. EVALUACIÓN DE PRIMERS

3.2.1 Material Biológico

La colección de 100 ejemplares adultos silvestres de *L.vannamei* se realizó durante el año 2003 en las regiones de Atacames y Pedernales, (00° 05' N; 80° 06' W) en la República del Ecuador y preservados en etanol al 100%. Una nueva colección de individuos salvajes de *L.vannamei*, *L. stylitrostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *Trachypenaeus byrdi* se realizó en enero del 2004, en las regiones de Machala, Posorja, Playas y Puerto Cayo en la República del Ecuador. Todas las muestras con pesos promedios de 40 ± 0.5 gramos se conservaron en etanol al 100 % y se transportaron al Centro Nacional de Acuicultura Marina del Ecuador (CENAIME) para la extracción de DNA.

3.2.2 Extracción de DNA

Se aisló DNA a partir de tejido branquial tanto en animales salvajes como individuos del set de mapeo de *L.vannamei* levantados por el Laboratorio de Genética del CENAIME. Para los animales del set inicial de pruebas (set multiespecies) se utilizó extracción con CTAB (Karp *et al.*, 1998). Esta técnica consiste en añadir CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) y proteinasa K en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con muestra de tejido, incubación a 60° C por 45 minutos. Posteriormente, la muestra se

macera y se incuba en baño maría por 8 horas, se añade fenol-cloroformo y se centrifuga a 14.000 rpm por cinco minutos, se recupera el sobrenadante, se adiciona cloroformo y se centrifuga nuevamente a 14.000 r.p.m. al sobrenadante recuperado se le adiciona 500 µl de isopropylalcohol y se lo coloca a -20° C durante tres horas. Para recuperar el DNA se centrifuga a 14.000 rpm, para obtener un pellet, el cual es lavado con alcohol al 70%. La muestra se somete a secado a temperatura ambiente por 1 hora y para la preservación se añade TE 1X (Buffer Tris EDTA). El almacenamiento de la muestra se realiza a -20°C. Las lecturas de concentración se realizó en el espectrofotómetro (Gene Quant, PHARMACIA) para establecer concentraciones de 50 ng/µl. Este material se lo conservó a -20° C para utilizarlo en posteriores amplificaciones.

3.2.3 Amplificación de Microsatélites e Intrones por PCR

Se usaron 286 pares de iniciadores (SSR-ESTs) y 173 pares de iniciadores (secuencias intrónicas) para *L.vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum*, y *T. byrdi*.

La amplificación para cada primer se condujo bajo las siguientes condiciones: Cloruro de magnesio 2 mM, 1xPCR buffer (PROMEGA), 200 mM de cada dNTP. 0,008 µl de TAQ polymerase por microlitro de reacción (5 U/ µl, PROMEGA) y 0.4 µM de primer forward y reverse. Cada reacción se llevó a cabo en 6 µl de la mezcla madre descrita anteriormente con 0,75 µl de muestra de DNA. El set total de primers fueron evaluados en un screening inicial en el set multiespecies descrito anteriormente bajo un protocolo de PCR tipo Towch Down.(Don *et al.*, 1991) en el termociclador: Delta Cycle I Ericom®. Los parámetros de temperatura y tiempo fueron los siguientes:

desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 12 ciclos de amplificación partiendo de 55° C por 30 segundos, bajando 1°C por ciclo hasta alcanzar los 43°C para el annealing, elongación de las cadenas por 1 minuto a 72°C y denaturación a 92 °C. Adicionalmente 18 ciclos de PCR fueron corridos usando el mismo programa con temperaturas de annealing a 43° C en condiciones de desnaturalización y extensión previamente mencionadas. La finalización del programa en la fase de extensión a 72° C por un minuto.

Primers que mostraron polimorfismo fueron evaluados en un set de mapeo (familia levantada en CENAIM) correspondiente a los dos progenitores y 14 progenies con el fin de determinar su utilidad para mapeo. Primers mostrando monomorfismo fueron a su vez evaluados con un protocolo de SSCP (producto amplificado de PCR más formamida corrido en geles no denaturantes a 4° C) con el fin de determinar existencia de polimorfismo a nivel de nucleótidos simples. Primers polimórficos con SSCP fueron igualmente evaluados en un set de mapeo bajo las condiciones anteriormente indicadas.

3.2.4 Electroforesis

Las muestras fueron separadas en geles no denaturantes de poliacrilamida-bisacrilamida al 6% [acrilamida:bisacrilamida 29:1, TBE (40 mM Tris Base, 20 mM de ácido bórico y 0,5 M de EDTA pH 8,0), persulfato de amonio (10%) y TEMED] (Sambrock *et al.*, 1989)]. Los geles fueron concentrados en placas de vidrio, con espaciadores de 1 mm, polimerizados por 1 hora y pre-corridos por 15 minutos. Los productos amplificados mediante PCR se adicionó 1.2 µl de tampón 6X [0,25% de Azul de Bromofenol, 0,25% de Xilenocianol y 40% (w/v) de sucrosa en agua destilada] y cargados en 2,4 µL de

muestra para cada locus. Para el cálculo de tamaño de bandas se cargó en el gel una escalera de talla de 25 bp (Promega®) en volumen de 1 μ L. Las muestras cargadas en los geles se corrieron en cámaras de electroforesis S2 (Life Technologies GIBCO BRL®) S3S (OWL Separation System®) y Sequi-Gene®-GT (BIORAD) con tampones de llenado TBE 1X y 0,5X durante 5- 6 horas a 30-35W (Figura 1.)



Figura 1. Equipos de electroforesis S2 (Life Technologies GIBCO BRL®) S3S (OWL Separation System®) y Sequi-Gene®-GT (BIORAD_) y fuentes de poder utilizadas en la presente investigación.

3.2.5 Tinción De Plata

Para visualización de las bandas se utilizaron dos metodologías. Para amplificación del set multiespecies se utilizó la metodología de Dinesh *et al.*, (1995) establecida en los siguientes pasos: fijación, impregnación, lavado y stop. (Tabla 1).

Tabla 1. Pasos para la tinción con nitrato de plata (Dinesh *et al.*, 1995)

Paso	Reactivos	Duración
Fijación (1,5 L de solución)	10 % Etanol.....150 mL 0,5 % Ácido Acético.7,5 mL ddH ₂ O	15 Minutos
Impregnación (1,5 L de solución)	0,011 M AgNO ₃2,8 g ddH ₂ O	25 Minutos
Enjuague (1,5 ddH ₂ O)	ddH ₂ O1.5 l	30 Segundos
Revelado (1,5 L de solución)	0,75 M NaOH.....45g 0,085 M Formaldehído 10.5 mL ddH ₂ O	+ / - 10 Minutos
Parada (1,5 L de solución)	0,07 M NaCO ₃11g ddH ₂ O	3 – 5 Minutos

Para pruebas de segregación se utilizaron geles delgados 6% (0,4mm), para lo cual se utilizó la metodología de Beidler *et al.*, (1982) para la tinción (tabla 2). Después de teñir los geles, se secó a temperatura ambiente para ser fotografiados y analizados.

Tabla 2. Pasos de tinción de plata para geles delgados 0,4 mm.

Paso	Reactivos	Duración
Fijación (1,5 L de solución)	10 % Etanol400 mL 1% Ácido Acético..... 40 mL dd H ₂ O	10 Minutos
Enjuague	H ₂ O desionizada.....1,5 l	1 Minuto
Enjuague	1,5% Acido Nítrico86 mL	3 Minutos
Ejuague	H ₂ O desionizada.....1,5 l	1 Minuto
Impregnación	(0,2 % AgNO ₃)9g /5l	20 Minutos
Enjuague	H ₂ O desionizada.....1,5 l	30 Segundos
Revelado	30 g/l CO ₃ Na ₂ 0,54 mL / l formaldehído 37% (810 µl/1,5l)	4-7 Minutos
Stop	5% Acido acético (200 mL)	5 Minutos

3.2.6 Fotografía Y Determinación De Tamaños De Las Bandas

La documentación de todos los geles se los hizo con una cámara digital (Olympus Camedia C-5000) en modo Tiff. Las fotografías fueron transformadas a una escala de coloración gris y modo 16 bit con el programa Adobe Photoshop 6,0.

El perfil molecular de bandas de DNA para cada individuo, se hizo mediante el análisis de imagen, con el software Gen Profiler 4.05 Scanalytics®. La información exportada en bp, fue codificada de acuerdo al formato requerido para cada software mediante Microsoft Excel® .

3.3. ANALISIS GENÉTICO DE LA INFORMACION

3.3.1 Amplificación inicial

Todos los primers inicialmente fueron evaluados en un panel con un test multiespecies conteniendo, 4 individuos de *L.vannamei* (dos parentales de un set de mapeo y 2 individuos salvajes). Las especies salvajes fueron colectadas a lo largo de la costa Ecuatoriana. La extracción de DNA se utilizó la metodología CTAB. (Shahjahan *et al.*, 1995). Además en la corrida inicial se ubicaron el panel de pruebas dos especie: *L. stylirostris* y *T. byrdi*, con cuatro muestras para cada una. En la segunda parte de nuestro trabajo, aumentamos el panel con dos especies más: *F. californiensis* y *F. duorarum*.

3.3.2 Análisis de la diversidad genética y segregación mendeliana.

La diversidad genética fue probada usando un set de 16 individuos silvestres de *L.vannamei* colectados en Pedernales (00° 05' N; 80° 06'W), Ecuador. Estos animales fueron parte de un estudio anterior de estructura poblacional. El DNA de las muestras fue extraído por un protocolo rápido: 400 µl de 5% Chelex (BIORAD®) más 2 µl de proteinasa K [(Promega®)(20mg/mL)], calentamiento a 65°C por 2 horas, ebullición por 3 minutos, centrifugación a 12000 rpm por 10 minutos y transferencias del supernadante a 96 nuevos frascos. El DNA fue almacenado a -20° C. Este set amplificó con 59 primers que mostraron polimorfismo en el barrido inicial.

3.3.2.1.Heterocigocidad observada o H_o

Equivale a la proporción de individuos que presenta un par de alelos diferentes, es decir que son heterocigotos, mediante conteo directo, para cada locus en una población. Se calcula por la siguiente fórmula:

$$H_o = \frac{H}{N_i}$$

Donde: H = Número de individuos heterocigotos por conteo directo.

N_i = Número total de individuos para el locus i

3.3.2.2. Heterocigocidad esperada o H_e

Es llamada también índice de diversidad de Weir y estima la proporción de individuos que se esperan sean heterocigotos para un locus en una población. Se define con la siguiente fórmula:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^8 p_i^2$$

Donde: p_i = es la i-esima frecuencia para un alelo

3.3.2.3. Equilibrio Hardy-Weinberg ó $H-W$.

El equilibrio de Hardy-Weinberg establece que las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen constante de generación en generación, si el tamaño de la población es grande, con cruces reproductivos aleatorios y libre de fuerzas evolutivas (Rusell, 1993). Por tanto, los genotipos de un grupo de individuos en equilibrio Hardy-Weinberg serán iguales a un valor p_i^2 para homocigotos y $2p_i p_j$ para los heterocigotos.

Una población que se ajusta a un modelo panmítico, no presentará variación significativa en la frecuencia alélica a través de rangos geográficos y sus integrantes se mantendrán en equilibrio $H-W$.

Heterociguidad observada y esperada y el equilibrio Hardy–Weinberg se probó estadísticamente por un test exacto (Simulación Monte Carlo, en 10 series y 1000 permutaciones por corrida) utilizando el programa TFPGA (Miller, 1997).

3.3.2.4. Evaluación para Segregación Mendeliana

La comprobación de la existencia de Segregación Mendeliana se lo realizó en un panel constituido por dos parentales y 14 hijos. La extracción de DNA de las diferentes muestras se la hizo con la metodología CTAB (Shahjahan *et al.*, 1995). Las pruebas de Chi cuadrado (χ^2) se utilizaron para evaluar la hipótesis de segregación, sugeridos para los genotipos parentales. Los modelos de segregación corresponderán a relaciones 1:1, 1:2:1 o 3:1. Los marcadores que demuestren segregación mendeliana de acuerdo a los genotipos parentales serán considerados a futuro para mapeo en el set familiar completo.

3.3.3 Single–Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Marcadores monomórficos obtenidos en la primera corrida por PCR, fueron probados en un panel con 14 individuos salvajes y dos parentales del set de mapeo. La extracción de DNA se lo realizó por el método CTAB (Shahjahan *et al.*, 1995). Los productos amplificados se mezclaron con 7 μ l de formamida (99,6% formamide, 20 mM EDTA, 0,1% btomophenol blue y 0,1% xylene cyanol). Seguido, una desnaturalización por 5 minutos a 94°C en termociclador, rápidamente colocado en hielo por 5 minutos y cargado en las cámaras de electroforesis utilizando 5 μ l por muestra, durante 12 horas a 30 W (Fukuoaka *et al.*, 2002). La separación del producto se llevó a cabo en geles no

denaturantes al 8% (29:1 acrylamide:bisacrylamide mix in 1x TBE buffer) a una temperatura de 10 – 15° C en un refrigerador. La visualización de bandas y documentación se realizó de acuerdo a las metodologías ya descritas.

3.3.4 Análisis de homologación de marcadores amplificados. (BLAST)

Todas las secuencias amplificadas de los diferentes marcadores fueron comparadas nuevamente contra los datos depositados en el GenBank correspondiente a base de datos de proteínas no redundantes presentes en la web utilizando el servicio HT BLAST (Wang y Mu, 2003) (<http://mammoth.bii.a-star.edu.sg/webservices/htblast/index.html>). Todos los hits positivos y con rangos mayores a 60 y e-valores menor que 1×10^{-10} fueron incluidos en nuestro reporte.

4. RESULTADOS

4.1. SSR EN SECUENCIAS EST

4.1.1 Minado De Datos

La primera etapa de investigación se trabajó con 5.832 secuencias EST, descargadas de la web, 475 mostraron secuencias repetidas de nucleótidos, tipo microsatélites. De éstas, 138 secuencias presentan repeticiones mononucleótidas que deben corresponder al fragmento poly A del cDNA, representando el inicio o finalización de una determinada secuencia. Cincuenta y tres secuencias adicionales se eliminaron del análisis, debido a la semejanza en repeticiones, tanto al inicio como en la finalización de secuencias, lo que impidió un diseño más amplio. En total, se aislaron 286 secuencias con 89 diferentes repeticiones (patrones) (Tabla 3). Mayor frecuencia de secuencias repetidas fueron trinucleótidos, seguidos por mononucleótidos y dinucleótidos respectivamente. Un pentanucleótido manejó un número mínimo de tres repeticiones, mientras que secuencias dinucleótidas tuvieron un máximo 143 repeticiones. Un total 2.227 kb en secuencias EST de *L. vannamei* fueron investigadas, para determinar la presencia de repeticiones (patrones), obteniendo una frecuencia de 1 SSR cada 7,8 kb.

Tabla 3. Patrones de SSR – ESTs encontrados por exploración de datos en *Litopenaeus vannamei*.

TIPO DE PATRON	NUMERO DE ESTs	NUMERO DIFERENTE DE PATRONES	TRES O MAS FRECUENCIAS DE PATRONES	NUMERO DE REPETICIONES	
				MIN	MAX
MONONUCLEOTIDES	69	3	T(66); A(1); C(2)	15	55
DINUCLEOTIDES	60	10	AT(14); GT(13); AG(12)	8	143
TRINUCLEOTIDES	74	30	ATT(10); GCT(8); CTT(7)	5	25
TETRANUCLEOTIDES	38	27	AAAG(4); ATTT(4); TACA(3)	4	30
PENTANUCLEOTIDES	43	19	AAAAT(6); AGGTT(5); GTTTT(4)	3	14
TOTAL PATRONES	284	89			

Resultados de la presente investigación. Elaborado por F. Pérez y J. Ortiz.

Se diseñaron doscientos ochenta y seis pares de primers conteniendo secuencias SSR. Estos resultados muestran que el 3,8% de secuencias EST descargadas, tienen repeticiones apropiadas para diseño de primers. No se realizó esfuerzo para eliminar secuencias redundantes de EST antes del diseño de primers, pero mediante un chequeo de resultados en tablas de Excel, se detectó secuencias similares, de las cuales, 8 % resultaron redundantes.

4.1.2 Barrido Inicial De Primers

El rendimiento obtenido en la corrida inicial, producto de PCR, fue del 45 %, es decir, 129 de 286 primers amplificaron satisfactoriamente. El nombre del locus, código de entrada a EST Marine Genomics, secuencia del primer, tipo de repetición, tamaño estimado y observado de los productos de PCR y número de alelos amplificados en el panel para *L. vannamei* se presentan en el Anexo 1 y Anexo 2. En estos anexos se reporta datos de locus únicos y no aquellos duplicados debido a su naturaleza redundante. La tasa de éxito en la amplificación por PCR fue elevada en *L. vannamei*

(amplificaron 118 pares de primers) seguidos por *L. stylirostris* (85 primers, con 8 múltiples bandas) y *Trachypenaeus byrdi* (32 primers, 12 muestran múltiples bandas).

En la corrida inicial, el número de marcadores polimórficos fue alto, a pesar del reducido número de muestras individuales en el panel de prueba. En *L. vannamei*, 56% de los productos amplificados (66 productos) presentaron entre 2 y 9 alelos mientras que en *L. stylirostris* 37 % (31 productos) dió entre 2 y 4 alelos. En *T.byrdi* el porcentaje de marcadores polimórficos fue bajo, 18,7 % (6 productos) con un máximo de 3 alelos.

En el panel inicial de prueba se incluyeron dos muestras de parentales de *L. vannamei* correspondientes a un set de mapeo, desarrollado en nuestro laboratorio. Veinte y ocho secuencias de EST – SSR fueron polimórficas, entre estos individuos. Todos estos marcadores se ensayaron en pruebas de segregación mendeliana , como se explica mas adelante.

La amplificación por PCR de marcadores moleculares, basados en secuencias EST, pueden conducir a la amplificación de productos con diferencia en tamaños, en referencia a valores esperados. La explicación para esta diferencia en tamaño es la presencia de intrones en el DNA genómico. Productos de PCR mostrando una diferencia de al menos 30 pares de bases entre el tamaño esperado y el observado se presenta en la Tabla 4. En *L. vannamei*, 20 de los 109 productos de PCR mostraron tallas observadas con 30 o más bases extra. En *L. stylirostris*, 37 de los 84 productos muestran tallas no esperadas. En *T. byrdi* 20 de los 32 amplificados, muestran diferencias en las tallas esperadas.

Tabla 4. Marcadores EST-SSR desarrollados en *Litopenaeus vannamei* mostrando productos de tallas no esperadas (30 o más pares de bases esperadas) en tres especies de camarón.

Locus	Esperado	Diferencias de tamaño Observado-Esperado		
		<i>L. vannamei</i>	<i>L. stylirostris</i>	<i>T. byrdi</i>
CNM-MG-332	196		23	
CNM-MG-348	298		281	166
CNM-MG-354	190		24	
CNM-MG-356	177	142		
CNM-MG-359	195		59	
CNM-MG-367	284		-28	
CNM-MG-378	199			92
CNM-MG-386	257			82
CNM-MG-401	208		60	
CNM-MG-405	251	47	69	
CNM-MG-406	256	62	77	
CNM-MG-417	205		89	
CNM-MG-425	249	39	37	
CNM-MG-426	205			47
CNM-MG-431	246		21	
CNM-MG-437	135		95	
CNM-MG-439	225	66	63	
CNM-MG-444	278		-35	
CNM-MG-450	213		31	
CNM-MG-451	169	144	137	173
CNM-MG-452	489	45	35	
CNM-MG-457	243		-21	
CNM-MG-460	134	104		
CNM-MG-462	157	35	35	
CNM-MG-465	256	44	52	
CNM-MG-470	252			44
CNM-MG-472	196	47	54	46
CNM-MG-477	366			-108
CNM-MG-485	296		258	155
CNM-MG-487	297		356	325
CNM-MG-494	289		36	
CNM-MG-496	203	176		
CNM-MG-498	297	422	263	156
CNM-MG-503	297		264	158
CNM-MG-505	272			119
CNM-MG-507	228	137		
CNM-MG-511	197			81
CNM-MG-512	240		181	
CNM-MG-516	148		153	

CNM-MG-522	143		127	
CNM-MG-523	224	184		
CNM-MG-528	158			225
CNM-MG-529	296	428	259	259
CNM-MG-531	206	522	277	203
CNM-MG-533	137			280
CNM-MG-535	280	54		322
CNM-MG-543	263	31	31	
CNM-MG-548	252	35	33	
CNM-MG-554	126		801	1294
CNM-MG-566	121		284	
CNM-MG-569	121		283	
CNM-MG-617	121		289	
TOTAL DE SUPUESTOS INTRONES		20	37	20

Resultados de la presente investigación. Elaborado por F. Pérez y J. Ortiz.

4.1.3 Diversidad Genética Y Segregación Mendeliana

Cuarenta siete (80%) de 59 primers que se evaluaron en la prueba de equilibrio Hardy – Weinberg, en la cual amplificaron 7 o más individuos, en un panel de prueba con camarón silvestre. Catorce primers, se excluyeron del análisis, debido a que estos mostraron menos de 7 amplificaciones. La heterocigocidad observada, esperada, y los valores de probabilidad de las pruebas de equilibrio Hardy–Weinberg se resumen en la Tabla 5. Trece loci mostraron desviaciones significativas del equilibrio con un valor P menor a 0.05. La número promedio de alelos por primer fue de 6,8 con un rango de entre 2 y 24 alelos respectivamente.

Tabla 5. Polimorfismo de primers EST – SSR y equilibrio Hardy-Weinberg de *Litopenaeus vannamei* en un panel de prueba con individuos silvestres. Número de individuos amplificados, número de alelos. Talla mínima y máxima del alelo. Heterocigocidad esperada y observada. Valor P y Error Estándar de la prueba exacta para el equilibrio Hardy-Weinberg.

PRIMER	# ind	# alelos	MIN	MAX	He	Ho	P	S.E.
CNM-MG-339	14	9	150	192	0.86	0.86	0.694	0.009
CNM-MG-347	11	8	300	344	0.67	0.55	0.204	0.012
CNM-MG-350	14	12	230	302	0.88	0.79	0.002	0.002
CNM-MG-351	16	15	212	238	0.92	0.88	0.167	0.013
CNM-MG-354	15	10	200	210	0.84	0.80	0.206	0.007
CNM-MG-355	15	4	274	280	0.62	0.47	0.066	0.007
CNM-MG-356	11	4	180	192	0.55	0.18	0.003	0.002
CNM-MG-357	16	4	308	319	0.41	0.13	0.000	0.000
CNM-MG-362	15	21	189	224	0.94	0.93	0.439	0.016
CNM-MG-364	13	7	166	186	0.75	0.85	0.374	0.017
CNM-MG-367	16	6	285	308	0.82	0.94	0.874	0.008
CNM-MG-369	15	7	251	260	0.78	0.80	0.025	0.005
CNM-MG-371	13	10	284	309	0.86	0.31	0.000	0.000
CNM-MG-372	14	7	261	307	0.66	0.57	0.263	0.014
CNM-MG-379	14	2	256	260	0.48	0.36	0.571	0.013
CNM-MG-380	11	7	236	266	0.76	0.55	0.161	0.007
CNM-MG-383	7	5	273	286	0.72	0.29	0.004	0.002
CNM-MG-384	13	9	226	257	0.87	0.77	0.219	0.012
CNM-MG-386	13	4	273	293	0.33	0.23	0.005	0.001
CNM-MG-387	14	4	217	230	0.70	0.29	0.004	0.002
CNM-MG-390	16	5	259	268	0.53	0.35	0.007	0.003
CNM-MG-402	12	2	188	194	0.41	0.25	0.196	0.008
CNM-MG-405	9	12	269	333	0.88	0.89	0.634	0.020
CNM-MG-406	16	24	286	403	0.94	0.88	0.189	0.012
CNM-MG-407	16	2	290	297	0.06	0.06	1.000	0.000
CNM-MG-412	16	5	243	256	0.50	0.31	0.008	0.002
CNM-MG-416	10	7	294	324	0.80	0.80	0.216	0.010
CNM-MG-418	13	2	287	292	0.39	0.23	0.161	0.012
CNM-MG-421	15	4	145	153	0.24	0.27	1.000	0.000
CNM-MG-430	16	13	194	227	0.89	0.82	0.264	0.014
CNM-MG-431	11	8	247	274	0.80	0.64	0.280	0.006
CNM-MG-436	14	11	309	335	0.88	1.00	0.201	0.015
CNM-MG-437	16	2	133	136	0.17	0.19	1.000	0.000
CNM-MG-444	16	3	278	284	0.55	0.31	0.064	0.008
CNM-MG-455	16	5	303	332	0.60	0.50	0.085	0.007
CNM-MG-474	16	7	189	201	0.58	0.38	0.095	0.008
CNM-MG-479	16	12	96	109	0.85	0.56	0.001	0.001
CNM-MG-483	16	3	296	299	0.17	0.13	0.094	0.010
CNM-MG-487	15	7	287	305	0.80	0.73	0.278	0.015
CNM-MG-489	16	2	237	247	0.22	0.25	1.000	0.000
CNM-MG-494	12	9	290	311	0.74	0.33	0.000	0.000
CNM-MG-496	15	5	380	392	0.68	0.60	0.228	0.015

CNM-MG-498	10	2	717	727	0.10	0.10	1.000	0.000
CNM-MG-507	15	4	360	370	0.54	0.33	0.033	0.006
CNM-MG-512	16	6	210	265	0.71	0.88	0.964	0.007
CNM-MG-527	13	3	199	205	0.42	0.54	1.000	0.000
CNM-MG-548	15	2	280	288	0.28	0.33	1.000	0.000

Resultados de la presente investigación. Elaborado por F. Pérez y J. Ortiz.

Veinte y ocho primers que mostraron polimorfismo en el barrido inicial con los padres del set de mapeo fueron evaluados para segregación mendeliana. Primers, modelo de segregación y valor P para prueba de Chi cuadrado (χ^2), en 23 marcadores se presentan en la Tabla 6. Se evidenció la presencia de alelos nulos, los cuales fueron encontrados en 5 primers (CNM-MG-362, 371, 383, 416 y 487).

Tabla 6. Modelo de segregación mendeliana y probabilidad en pruebas de Chi cuadrado (χ^2) para un conjunto de marcadores, evaluados en un panel de segregación de *Litopenaeus vannamei*.

PRIMER	MODELO DE SEGREGACION	VALOR P
CNM-MG-339	1:1:1:1	0.84
CNM-MG-347	1:1	1.00
CNM-MG-351	1:1	0.29
CNM-MG-355	1:2:1	0.30
CNM-MG-362	1:1:1:1	0.01
CNM-MG-379	1:2:1	0.28
CNM-MG-380	1:1:1:1	0.18
CNM-MG-384	1:1:1:1	0.84
CNM-MG-398	1:1:1:1	0.37
CNM-MG-402	1:1	0.29
CNM-MG-406	1:1:1:1	0.46
CNM-MG-418	1:1	0.11
CNM-MG-430	1:1:1:1	0.11
CNM-MG-431	1:1:1:1	0.09
CNM-MG-437	1:2:1	0.48
CNM-MG-439	1:1:1:1	0.46
CNM-MG-459	1:1	0.29
CNM-MG-479	1:1:1:1	0.02
CNM-MG-483	1:1	0.59
CNM-MG-494	1:1:1:1	0.46
CNM-MG-496	1:1	0.11
CNM-MG-557	1:1:1:1	0.84
CNM-MG-604	1:1:1:1	0.46

Resultados de la presente investigación. Elaborado por F. Pérez y J. Ortiz.

4.1.4 Análisis De SSCP

En el barrido inicial, se detectaron 51 marcadores monomórficos. Esos marcadores fueron evaluados con SSCPs en un set compuesto de 14 animales silvestres y los dos parentales del set de mapeo. Un número variable de productos polimórficos (2 a 8) fueron detectados en (23) marcadores (44%). Ocho de los marcadores fueron polimórficos en un set de mapeo con parentales.

4.1.5 Identificación y homologación de secuencias.

El doce por ciento de los marcadores EST-SSR desarrollados (n=13) muestran similitudes significativas con secuencias de proteínas conocidas (Anexo 3). Tres hits positivos correspondieron a proteínas ribosomales. Ocho hits positivos correspondieron a genes de artrópodos y dos hits positivos correspondieron a péptidos antimicrobianos de tipos precursor de peneidinas.

4.2. MARCADORES BASADOS EN SECUENCIAS INTRÓNICAS

En una segunda etapa de nuestro proyecto de investigación se procesaron 7439 secuencias intrónicas descargadas de la red pública de información Marine Genomics, se diseñó 173 juegos de primers los cuales fueron probados en un panel general con muestras de un set de mapeo de *L. vannamei* e individuos silvestres de las especies *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. byrdi*. En ésta exploración de datos, el 2.32% de secuencias intrónicas descargadas fueron apropiados para diseño de primers.

4.2.1 Barrido Inicial de Primers

Los resultados de la amplificación de intrones putativos se presenta en el Anexo 4 en donde se presentan los siguientes datos: Nombre del locus, código de entrada a Marine Genomics, secuencia del primer, tamaño estimado y observado de los productos de PCR y número de alelos amplificados en el panel para *L. vannamie* (parentales del set de mapeo), e individuos silvestres de: *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. birdy*. El rendimiento obtenido en animales del set de mapeo y silvestres en *L. vannamei* fue del 31 y 30% respectivamente, es decir 53 y 52 productos de 173 primers, amplificaron satisfactoriamente (Figura 2). La tasa de amplificación para el resto de especies fue más alta: 38, 41 y 42 % (es decir 66, 71, y 72 productos de 173 juegos de primers) para *L. stylirostris*, *F. californiensis* y *F. duorarum* respectivamente. En *T. byrdi* amplificaron 53 primers que representan el 31 %.

De los marcadores amplificados en *L. vannamei* se observó polimorfismo en 40% para animales silvestres y del 41,5% para los parentales. Se presentaron tallas con un mínimo 2 y un máximo de 4 alelos, en promedio 2,6 y 2,3 alelos. Marcadores polimórficos en el resto de especies fue alta: *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum*, *T. byrdi*, con el 50, 56, 57 y 53% . El rango de alelos polimórficos en estas especies se distribuyeron entre 2 y 4.

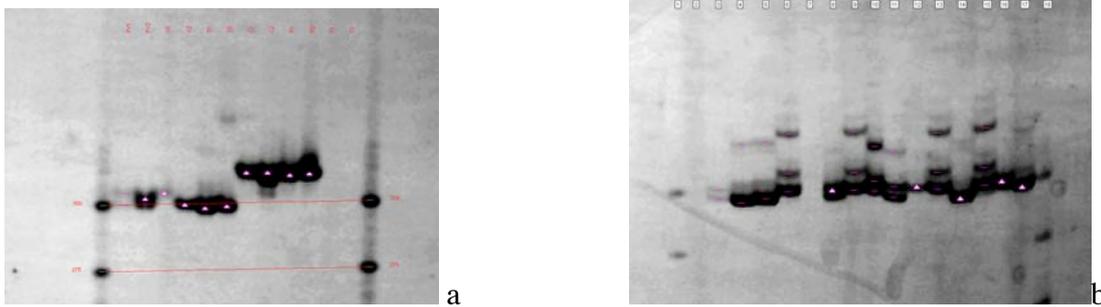


Figura 2. Primer CNM-MG-639. a. Amplificación por PCR en un panel con animales silvestres de diferentes especies de camarón. b. Segregación Mendeliana en una progenie con 14 individuos de *L. vannamei*. Resultados de la presente investigación. Elaborado por J. Ortiz.

La presencia de intrones en el DNA genómico, se lo estima por la diferencia de bandas amplificadas con su valores esperados. Estos productos amplificadas basados en secuencias intrónicas conducen a la amplificación de marcadores con diferentes tamaños en *L. vannamei* y observado claramente en nuestra investigación (Figura 3).

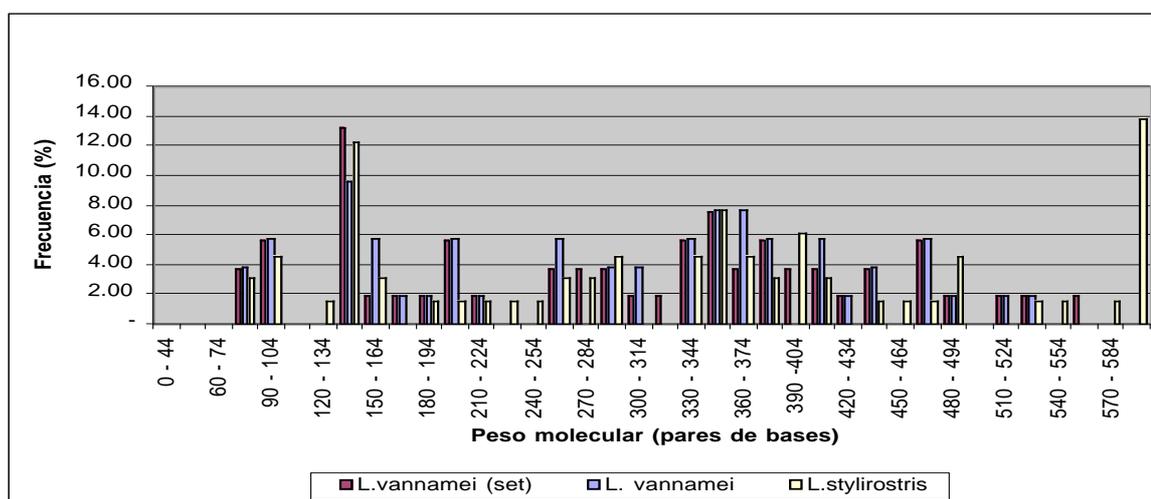


Figura 3. Frecuencia alélicas versus tamaño de alelos (pares de bases) para los locus en secuencias intrónicas de tres especies de camarón : *L. vannamei* (set de mapeo), *L. vannamei* silvestre y *L. stylirostris*. Resultados de la presente investigación. Elaborado por J. Ortiz.

Marcadores intrónicos, productos de PCR, que muestran una mínima diferencia de 30 pares de bases del producto esperado, se presentan en la Tabla 7. En *L. vannamei*, 33 de los 53 productos de PCR mostraron tallas observadas con 30 o más bases extras.

Tabla 7. Marcadores intrónicos desarrollados en *Litopenaeus vannamei* mostrando productos de tallas no esperadas (30 o más pares de bases esperadas) en cinco especies de camarón.

Locus	Diferencia de tamaños observado - esperado						
	Esperado	<i>L. vannamei</i> (s)	<i>L. vannamei</i>	<i>L. stylirostris</i>	<i>F. californiensis</i>	<i>F. duorarum</i>	<i>T. byrdi</i>
CNM-MG 626	267				296	276	
CNM-MG 630	269	136	135	141	139	129	
CNM-MG 633	203	273	275	283	262	287	
CNM-MG 639	187	113	113	111	125	124	
CNM-MG 644	91	184	178	192	186	176	
CNM-MG 652	206	268	268	278	265	263	
CNM-MG 656	158	131	131	128	109	109	
CNM-MG 657	212	137	137	132	112	111	
CNM-MG 658	155	116	145	132	129	119	
CNM-MG 662	112	249	249	245	249	241	
CNM-MG 664	188				489	462	
CNM-MG 667	192	198		178	192	191	204
CNM-MG 668	178	143	186	160	164	143	197
CNM-MG 669	202			478	469	399	
CNM-MG 674	230			369	442	431	
CNM-MG 675	287			313	202	232	
CNM-MG 677	196	139	139	153	156	155	236
CNM-MG 679	216	132	132	137	74	118	
CNM-MG 681	251				431	441	532
CNM-MG 682	342			333	333	350	
CNM-MG 689	133						41
CNM-MG 690	154	108	108	112	114	115	191
CNM-MG 695	176				517	490	231
CNM-MG 699	198	161	165	152	158	159	187
CNM-MG 700	154	321	320	306	196	196	142
CNM-MG 701	125	73	77	115	116	124	121
CNM-MG 704	151			337	341	314	331
CNM-MG 712	142	118	118	116	123	121	83
CNM-MG 716	265				281	262	180
CNM-MG 717	92	344	353	343			335

CNM-MG 723	383				343	330	92
CNM-MG 726	173	319	318		318	321	
CNM-MG 738	211	235	236	206	224	247	206
CNM-MG 742	198	156	158	159	166	143	143
CNM-MG 754	212						66
CNM-MG 760	152	378	377	380	387	385	331
CNM-MG 761	148	262	261	249	260	249	221
CNM-MG 762	125	259	259	241	255	250	250
CNM-MG 763	176	254	253	227	417	393	315
CNM-MG 764	115		36	32		33	
CNM-MG 766	195				502	442	208
CNM-MG 772	180	117	115	102	121	114	103
CNM-MG 778	100	230	230	280	240	253	166
CNM-MG 779	213			379		375	376
CNM-MG 780	123	391	387	356	394	382	361
CNM-MG 781	198	188	187	190	191	196	191
CNM-MG 782	209	159	161	158	168	166	288
CNM-MG 783	270			309	329		287
CNM-MG 784	264	298		285	300	282	181
CNM-MG 786	226			413	381	371	412
CNM-MG 787	175			487	479	484	484
CNM-MG 789	152			245	223	221	301
CNM-MG 790	205			388	444	438	23
CNM-MG 791	161	242	252	241	233	233	158
Total Intrones		33	32	44	49	50	37

Resultados de la presente investigación. Elaborado por F. Pérez y J. Ortiz.

4.2.2 Segregación Mendeliana

Las secuencias polimórficas en los parentales fueron evaluadas para segregación mendeliana en un set de 14 hijos con dos parentales. Adicionalmente y en un trabajo paralelo, esos marcadores fueron evaluados en un set completo de mapeo, por investigadores del Laboratorio de Genética en el Proyecto de “Mapa Genético de *L. vannamei*”. Los resultados de la evaluación de 17 marcadores en el set de evaluación para mapeo, modelo de segregación y P values para prueba de Chi cuadrado (χ^2), se presentan en la Tabla 8..

Tabla 8. Modelo de Segregación Mendeliana y probabilidad en pruebas de Chi Cuadrado (χ^2) para un conjunto de marcadores en secuencias intrónicas, evaluados en un panel de segregación de *Litopenaeus vannamei*.

PRIMER	MODELO DE SEGREGACION	VALOR P
CNM-MG-639	1:1:1:1	0.61
CNM-MG-644	1:1	0,78
CNM-MG-652	1:1	1
CNM-MG-656	1:1	0.78
CNM-MG-657	1:1	0.78
CNM-MG-658	1:1:1:1	0.70
CNM-MG-668	1:1:1:1	0,70
CNM-MG-679	1:1	0.78
CNM-MG-717	1:2:1	0.83
CNM-MG-742	1:1	0.39
CNM-MG-755	1:1:1:1	0,34
CNM-MG-763	1:2:1	1
CNM-MG-780	1:2:1	0,51
CNM-MG-781	1:1	0.26
CNM-MG-782	1:1:1:1	0,11
CNM-MG-784	1:1:1:1	0.76
CNM-MG-791	3:1	0.88

Resultados de la presente investigación. Elaborado por F. Pérez y J. Ortiz.

4.2.3 Análisis SSCP

En el corrido inicial, se detectaron 32 secuencias monomórficas, los cuales fueron evaluados bajo condiciones y siguiendo los protocolos SSCP. Siete marcadores de productos polimórficos fueron detectados (Figura. 4).

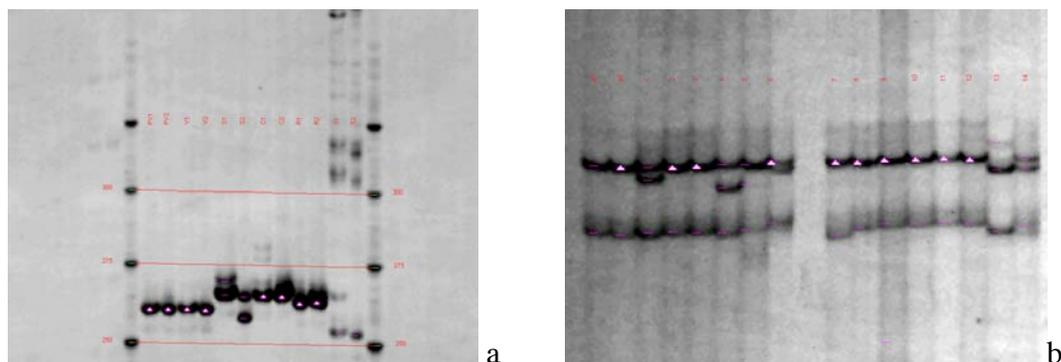


Figura 4. Primer CNM-MG 712. a. Amplificación por PCR en un panel con camarón silvestre de diferentes especies. nótese que *L. vannamei* (4 primeras columnas) tienen características monomórficas. b. Prueba SSCP en un panel con muestras de *L. vannamei* (individuos de un set de mapeo: parentales) vs. individuos silvestres de la misma especie. Resultados de la presente investigación. Elaborado por J. Ortiz.

4.2.4 Identificación de secuencias.

El noventa y seis por ciento de marcadores intrónicos (n=51) muestran similitudes significativas con secuencias de proteínas conocidas (Anexo 5). Veinte y dos hits positivos corresponden a proteínas ribosomales y dos hits corresponden al factor de elongación 1α .

5. DISCUSION

5.1. SSR EN SECUENCIAS EST

En esta investigación presentamos el desarrollo de marcadores moleculares EST – SSR utilizando información de secuencias EST públicamente disponibles, mediante el minado de datos. Un enfoque semejante ha sido utilizado en varias especies animales (Yue *et al.*, 2001; Rohrer *et al.*, 2002; Yue y Orban, 2002; Yue *et al.*, 2004) y plantas (Kantety *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2003; Woodhead *et al.*, 2003; y otros). El desarrollo de marcadores moleculares en base a minado de datos, tiene ventajas por su accesibilidad y bajo costo, en comparación con esfuerzos y procedimientos tradicionales como son las librerías genómicas para desarrollar marcadores tipo microsatélites. La exploración de datos y búsqueda de EST-SSR se realiza cuando disponemos de gran cantidad de secuencias con estas características. Sin embargo, su uso a nivel taxa, donde el número de secuencias EST es bajo o no está disponible, requiere de grandes esfuerzos que permiten aislar microsatélites en librerías genómicas enriquecidas, debido a la naturaleza redundante de cDNA.

En nuestra investigación inicial *in silico* encontramos una frecuencia de repetición cada 7,8 kb en una corrida de 2.227 kb de secuencias EST de *L. vannamei*. El minado de datos EST-SSR en trigo y cebada muestran valores semejantes cada 9,2 y 6,3 kb respectivamente (Gupta *et al.*, 2003; Thiel *et al.*, 2003). La frecuencia de SSR en librerías genómicas de *L. vannamei* varió de acuerdo al número de patrones, 1 cada 1,43 kb y 1 cada 206 kb (Meehan *et al.*, 2003). En *P. monodon*, la frecuencia de bases repetidas en dos librerías genómicas varió 1 cada 93 kb y 1 cada 164 kb (Tassanakajon

et al., 1998). La alta frecuencia de bases repetidas tipo microsatélites en secuencias EST encontradas en nuestro trabajo, al compararlas con librerías genómicas en *L. vannamei*, demuestran la viabilidad para desarrollar marcadores moleculares tipo microsatélites en secuencias EST a gran escala.

Las bases repetidas más frecuentes de ESTs en *L. vannamei* corresponden a trinucleótidos, seguidos por repeticiones mononucleótidas (Tabla 3). Nuestros resultados se contrastan con reportes de otras librerías genómicas y especies de camarón peneidos, donde las bases repetidas dominantes son de características dinucleótidas (Meehan *et al.*, 2003; Tassanakajon *et al.*, 1999; Wuthisuthimethavee *et al.*, 2003). Altas frecuencias de patrones trinucleótidos han sido encontradas por exploración de datos en ESTs en cebada, maíz, arroz, sorgo y trigo (Kantety *et al.*, 2002), cebada (Thiel *et al.*, 2003), algodón (Saha *et al.*, 2003) trigo de pan (Gupta *et al.*, 2003). A nivel de un genoma completo en *Arabidopsis thaliana*, secuencias mono-, di-, y trinucleótidos son frecuentes y uniformes en el DNA intergénico con el 30% para cada patrón. El resto corresponde a patrones tetra- y pentanucleótidos. Sin embargo en regiones codificantes, las bases repetidas trinucleótidas se encuentran en un (66%), que sobrepasa a dinucleótidos (24%) y mononucleótidos (10%) (Cardle *et al.*, 2000). Los datos en patrones perfectos de microsatélites demuestran que una gran variedad de genomas eucarióticos tienen frecuencias mono y dinucleótidas las cuales son semejantes (alrededor del 42%) y sobrepasa frecuencias de trinucleótidos en regiones intragénicas e intrones. Sin embargo, frecuencia de trinucleótidos en regiones exónicas (95%) superó frecuencias mono y dinucleótidos (Toth *et al.*, 2000). En nuestro trabajo no encontramos el predominio de patrones trinucleótidos. Diferencias en la exploración de datos y

utilización de métodos tales como la rigurosidad para declarar un microsatélite y el nivel de tolerancia para una base no perfecta, explican éstas diferencias.

El aislamiento de SSR en *L. vannamei* muestran rendimientos variables. Pongsomboona *et al.* (2000) investigó una librería genética no enriquecida en *P. monodon* con pruebas de tri- y tetranucleótidos, obteniendo 79 clones positivos, desarrollando 6 marcadores polimórficos. La tasa de amplificación de microsatélites polimórficos fue de 7,6%. En *L. vannamei*, 251 clones positivos derivados de una librería no enriquecida e investigados con pruebas de di, tri y tetranucleótidos, permitieron el desarrollo de 93 marcadores polimórficos. En este caso, la tasa de éxito entre clones positivos para obtener microsatélites polimórficos fue del 36,7% (Meehan *et al.*, 2003). Siguiendo un protocolo semejante, Cruz *et al.* (2002) desarrolló 5 microsatélites de 68 clones positivos, con una tasa de éxito del 7,4%. En *L. schmitti* Espinosa *et al.* (2001) informa el desarrollo de 2 microsatélites de 30 clones positivos, dando una tasa de éxito del 6,6%. Xu *et al.* (1999) obtuvo un tasa de éxito del 12,5% desarrollando 10 microsatélites de 83 clones positivos en *P. monodon*. Wuthisuthimethavee *et al.*(2003) desarrolló 102 microsatélites de 253 clones secuenciados, en una librería genómica enriquecida en *P. monodon* lo que implica una tasa de éxito de 40.3 % en la obtención de marcadores moleculares.

En nuestro trabajo diseñamos 286 pares de primers, en secuencias EST, generando 129 amplificaciones por PCR (Anexo 1 y Anexo 2). El número de marcadores polimórficos obtenidos fue del 56%. Los resultados del diseño de primers, reflejados en marcadores polimórficos fue del 23% en *L. vannamei*. Sin embargo nuestros datos sobre

polimorfismo en la investigación inicial, deben ser juzgados cuidadosamente, ya que los productos obtenidos fueron investigados y corridos en un pequeño panel de prueba que consistió en 6 individuos de *L. vannamei*.

Primers diseñados para *L. vannamei* en la presente investigación, tuvieron una tasa de éxito en amplificación por PCR del 41% (118 de 286 pares de primers) Gupta *et al.* (2003) obtuvo 82% de primers funcionales de un conjunto de 78 EST-SSR diseñados en trigo de pan con una amplia transferibilidad entre especies de *Poacea genus*. En caña de azúcar, el 70% de EST-SSR diseñados, amplificaron productos por PCR (Da Silva, 2003). En algodón y helecho la tasa de éxito de EST-SSR por PCR fue bajo, 14 y 15% respectivamente (Saha *et al.*, 2003; Woodhead *et al.*, 2003). Tong *et al.*, (2002) obtuvieron un 72% de tasa de éxito en la amplificación de primers basados en secuencias EST en *P. monodon*. Para la identificación de ESTs a gran escala en humanos, Beasley *et al.* (1999) tomaron en consideración parámetros importantes para el diseño de primers con el fin de optimizar las amplificaciones de PCR. Tres parámetros importantes son utilizados en el diseño de primers: longitud del primer , contenido de GC, y AT con tendencia de GC hacia la terminal 3'; primers con 20 bp por lo menos y un contenido del 50% de GC con una mínima estabilidad en la región 3' terminal. Estos parámetros permitieron el incremento dramático en las tasas de éxito de PCR. En nuestro trabajo, el conjunto de primers diseñados tuvo un contenido de GC entre el 40 y 60% y una mínima estabilidad en la región 3' terminal. Sin embargo los primers diseñados cortos (17,1 bp de longitud promedio) fueron diseñados debido al tipo de software utilizado . Es posible que primers de corta longitud, puedan ser

responsables de un porcentaje de primers fallidos, lo que explicaría una tasa de éxito menor al comparar nuestro trabajo con otros reportados en la literatura.

Una ventaja teórica de marcadores SSR desarrollados a partir de secuencias EST es la alta transferibilidad entre especies relacionadas. En nuestra investigación, de los marcadores EST-SSRS que amplificaron en *L. vannamei*, el 69 y 21% también amplificaron en *L. stylirostris* y *T. byrdi* respectivamente (Anexo 1 y Anexo 2). Xu *et al.* (1999) informa que 3 SSRs de 10 SSRs desarrollados en *P. monodon* amplificaron en *L. vannamei*. Pongsomboon *et al.* (2000) informa la obtención de productos débiles en 3 de 6 primers que se desarrollaron en las mismas especies (*L. vannamei* y *P. monodon*). Ball *et al.* (1998) presenta 4 de 6 SSRs desarrollados para *L. setiferus* los cuales amplificaron en *F. aztecus*, *F. duorarum*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*. Aun cuando la transferibilidad de marcadores desarrollados a partir de microsatélites genómicos en camarón puede ser probado a gran escala, en nuestro trabajo demostramos que marcadores moleculares EST-SSR dan una alta tasa de transferibilidad entre dos especies estrechamente relacionadas.

En nuestro screening inicial encontramos que 10 primers diseñados para *L. vannamei* basados en secuencias EST de esa especie no amplificaron para camarón blanco pero presenta resultados positivos y amplificación por PCR en *L. stylirostris* y *T. byrdi* (Anexo 1 y Anexo 2). Una posible explicación para este hecho es la presencia de intrones, los cuales impiden la amplificación en PCR debido a la presencia de zonas intrónicas grandes. Los productos de PCR que amplificaron en otras especies y no en *L. vannamei*, muestran secuencias con longitudes grandes en relación a secuencias

originales esperadas en EST. De hecho, utilizando un punto de corte una diferencia de 30 bp del tamaño esperado, se encuentra evidencia de intrones en 20 marcadores SSR que amplificaron en PCR para *L. vannamei*. Catorce de esos productos de PCR con supuestos intrones amplificaron en *L. vannamei*, presentando también productos amplificados en *L. stylirostris* con tamaños similares en ambas especies (Tabla 4). La prueba definitiva de la presencia de intrones debería ser obtenida con la secuenciación de estos productos. Estos marcadores son equivalentes a marcadores EPIC, producto del diseño de primers que flanquean secuencias intrónicas. (Bierne *et al.*, 2000).

Para una identificación con alta resolución en genética de poblaciones, se requiere de gran cantidad de marcadores moderadamente polimórficos. En nuestro trabajo evaluamos la utilidad de nuestros marcadores EST-SSRS mediante el equilibrio Hardy – Weinberg (*HW*) con 59 primers en un panel de prueba con animales silvestres. Estas muestras fueron extraídas por el método Chelex las cuales se almacenaron por 9 meses a – 20 ° C. El método de Chelex fue utilizado en este caso para seleccionar marcadores que amplifique en forma reproducible con DNA extraído por un método fácil y rápido. El método de Chelex que puede ahorrar costos y trabajo en relación a métodos más elaborados de extracción. De 59 primers probados, 47 amplificaron satisfactoriamente en PCR. La interacción entre calidad de DNA y primers influye en la amplificación por PCR (nuestras propias observaciones y Coombs *et al.*, 1999), lo que quizás explicaría la falla de amplificación en 14 de nuestros marcadores.

Un alto porcentaje de primers evaluados (72%) no muestran diferencias significativas del equilibrio Hardy-Weinberg en 0,01 del valor P (Tabla 5). Ball *et al.* (2003) reporta

una observación en *L. setiferus* donde 5 de 6 microsatélites mostraron una desviación significativa de *HWE* lo que podría ser explicado por la presencia de alelos nulos y el efecto Wahlund. En estudios poblacionales de *P. monodon* en Filipinas, 6 microsatélites mostraron desviaciones significativas del *HWE*. En este caso se menciona la presencia de alelos nulos pero también la presencia de errores en alelos y cambios genéticos en las poblaciones evaluadas (Xu *et al.*, 2001). En *L. vannamei* un déficit de heterocigosidad en 4 de 5 microsatélites evaluados, fue explicado también por la presencia de alelos nulos (Cruz *et al.*, 2002). En contraste, seis loci polimórficos fueron evaluados en *L. schmitti* y no se encontró desviaciones significativas en el equilibrio Hardy-Weinberg (Maggioni *et al.*, 2003). Aunque el panel de prueba utilizado en nuestro trabajo fue pequeño, la conformación del equilibrio Hardy-Weinberg y error estándar pequeño de los valores P, demuestran que la mayoría de nuestros marcadores pueden ser utilizados en estudios de genética de poblaciones en *L. vannamei*.

El número de alelos en nuestro panel de evaluación de equilibrio Hardy-Weinberg varió de 2 a 24 (Tabla 5), al comparar nuestros resultados con los microsatélites genómicos (gSSR) desarrollados en librerías genómicas, los niveles de polimorfismo EST-SSR son bajos. En diferentes especies de camarón el número de alelos de gSSR varía de 1 (Maggioni *et al.*, 2003, Meehan *et al.*, 2003) a un máximo de 76 alelos (Ball *et al.*, 2003). Adicionalmente algunos de los loci evaluados para *HWE* corresponden a EST-SSRs con repeticiones mononucleótidas, los cuales no son adecuados para estudios de genética de poblaciones debido a lo difícil de su evaluación en geles de poliacrilamida. Sin embargo, esos marcadores mononucleótidos pueden ser útiles en un estudios de ligamiento, donde el tamaño de los alelos son conocidos por los genotipos parentales.

Veinte y ocho primers desarrollados en esta investigación fueron evaluados para segregación mendeliana. Cinco primers presentan evidencia de alelos nulos en individuos segregantes. Todos las cinco loci corresponden a parentales homocigotos (4 para macho y 1 para hembra) que no segregaron según el modelo esperado (datos no mostrados). Sin embargo, asumiendo la presencia de alelos nulos, todos los primers deberían ser útiles para un análisis de ligamiento. La causa de alelos nulos en camarón deberá ser clarificada con estudios de secuenciación.

EST-SSRs y otros marcadores basados en PCR pueden revelar polimorfismo extra mediante análisis con SSCP. cuando la electroforesis convencional (PAGE) falla. Esta variabilidad corresponde a polimorfismo de nucleótidos simples (Single nucleotide polymorphism o SNP por sus siglas en inglés), mientras que el PAGE descubre polimorfismos de longitud. En nuestro trabajo encontramos que 44% de marcadores de EST-SSRs que eran monomórficos en la investigación inicial por PAGE, fueron polimórficos al momento de realizar el análisis de SSCP. La presencia de 8 marcadores mostraron bandas diferenciadas entre parentales del panel de mapeo, lo que indica la utilidad de estos marcadores EST en un mapa genético. En *P. monodon* el 30% de los marcadores en secuencias EST eran polimórficos mediante análisis SSCP, útiles para genética de poblaciones y estudios en mapas de ligamiento (Tong *et al.*, 2002). En nuestro caso el mayor número de marcadores polimórficos obtenidos puede ser explicado por la utilización de bajas temperaturas y geles de poliacrilamida de mayor concentración (8%) que los reportados por Tong *et al.* (2002), lo que afecta a la sensibilidad de SSCP (Humphries *et al.*, 1997).

Trece marcadores EST-SSRs muestran homología significativa con proteínas conocidas mediante comparaciones por BLAST. Tong *et al.* (2002) encontró en su trabajo de ESTs de *P. monodon* que 23% de secuencias corresponden a proteínas conocidas. Ese porcentaje es prácticamente el doble de las proteínas encontradas en nuestra investigación para *L. vannamei*. La razón para esta diferencia no es clara. Sin embargo, en ambos casos se demuestra que el uso de secuencias EST en la genética del camarón para obtención de marcadores tipo I, es factible.

5.2. MARCADORES INTRÓNICOS

En la segunda fase de nuestro estudio demostramos la posibilidad de aislar loci basados en marcadores intrónicos a nivel taxa en varias especies de crustáceos con énfasis en *L. vannamei*.

El minado de datos y el procesamiento de 7439 secuencias intrónicas, permitió el diseño de 173 juegos de primers dirigidos a intrones putativos basados en secuencias homólogas en *D. melanogaster*. Del total de secuencias analizadas 2,32% correspondieron a zonas de homología de intrones en mosca de la fruta. Trabajos de homologación de secuencias de cDNAs y EST similares han sido realizados por otros autores (Lessa, 1992; Palumbi y Baker, 1994; Bierne *et al.*, 1999; Duda *et al.*, 1999; France *et al.*, 1999; Touriya *et al.*, 2003).

Nuestros resultados en aislamiento de secuencias intrónicas son similares a lo obtenido por Bierne *et al.* (2000) en *P. monodon* y *L. vannamei* con una tasa de amplificación

del 44%. En nuestro panel de pruebas de intrones utilizamos un grupo multiespecies: *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. biridy*. El porcentaje de amplificación fue de 32, 38, 41, 42 y 31% respectivamente, reflejándose la universalidad de los marcadores tipo I. En estudios realizados en Teleostos Touriya *et al.* (2003) cinco pares de primers fueron probados en 16 especies marinas y agua dulce, obteniendo un 93% de producto amplificado. Liu (2003) reporta la evaluación de 50 secuencias en catfish (bagre de canal) de las cuales el 84 % amplificaron. En el caso de intrones la diversidad, tamaño, posición, secuencia y cantidad de productos amplificados no sigue un patrón definido (Bierne *et al.* , 2000).

Los intrones amplificados en el barrido inicial mostraron un 40% (n = 21) de polimorfismo en el panel de mapeo de *L. vannamei* con rangos entre 2 - 4 alelos polimórficos mediante análisis convencional de PAGE. El 60% de primers monomórficos restantes de *L. vannamei* (set) fueron probados con la técnica SSCP, de los cuales, 7 juegos mostraron polimorfismo. Estos primers fueron probados en un pequeño panel de prueba para Segregación Medeliana y en el proyecto “Mapa genético de *L. vannamei*” que se lleva a cabo en el laboratorio de Genética del CENAIM. Diez y siete primers (32 %) demostraron su utilidad para mapeo. Holland *et al.* (2001) describe resultados similares en maíz presentando un PIC de 0,46 y 58% de polimorfismo en especies diploides de Avena. Hassan *et al.* (2002) demuestra polimorfismo en 14 (82%) de 17 supuestos intrones, con tamaños de 2 a 14 alelos.

En estudios de poblaciones de *P. monodon* y *L. vannamei* se ha demostrado que secuencias intrónicas tienen alta heterocigocidad, son polimórficos con tamaños entre 2

– 6 alelos, dentro de la especie y entre especies (Duda *et al.*, 1999; Bierne *et al.*, 2000). La aparente neutralidad de evolución intrónica presenta suficiente resolución de datos para determinar la estructura poblacional de una especie o entre especies. Teóricamente los intrones no están sujetos a limitaciones de selección como los exones, los cuales se encuentran en regiones codificantes. Además se presume que las bases intrónicas probablemente evolucionan tan rápidamente como los sitios silenciosos del DNA nuclear (bases en las cuales un cambio no afecta la secuencia del amino ácido) (Palumbi *et al.*, 1996; Roderick, 1998). En *Drosophila* los intrones y regiones no codificantes de flanco 5' y 3' de los genes son más polimórficas que las regiones exónicas (Hare *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003).

Los primers diseñados en nuestro proyecto para *L. vannamei* son transferibles a otras especies de crustáceos. Nuestros resultados muestran la transferibilidad de marcadores de *L. vannamei* a otras especies (*L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum*, y *T. byrdi*) en proporción variable. La universalidad y transferibilidad de primers intrónicos ha sido demostrada previamente en Teleostos con la amplificación en 16 especies de peces marinos y agua dulce, además de dos mamíferos y un reptil (Touriya *et al.*, 2003). Nuestros resultados coinciden con estudios realizados previamente en *L. vannamei* y *P. monodon* utilizando secuencias intrónicas (Bierne *et al.*, 1999; Duda *et al.*, 1999; Touriya *et al.*, 2003).

Estudios de diversidad genética intraespecífica en *L. vannamei* utilizando intrones del Factor de Elongación 1 α , amplificaron fragmentos con longitudes promedio entre 191 y 200 bp (France *et al.*, 1999). Este estudio demuestra que alelos intrónicos de *L.*

vannamei, están cercanamente relacionados con los de *L. stylirostris* (7,6% máxima diferencia) y más distantes al compararlos con *P. monodon* (14,2%). La diferencia entre *L. stylirostris* y *P. monodon* fue de 22.3% (Duda *et al.*, 1999; France *et al.*, 1999). Estos estudios demuestran la utilidad de intrones para la construcción de dendogramas de relación entre especies hermanas de camarón.

Mount *et al.* (1992) reportaron que la distribución de la longitud de intrones de *Drosophila melanogaster* es dimórfica. Sobre una base de 209 intrones completos, existe una clase de intrones menor a 90 bp que se distribuyen continuamente. Intrones de mayor tamaño en cambio presentan una distribución discontinua. En cambio Cameron *et al.* (2000) en un análisis de 1345 productos intrónicos en la misma especie, obtuvo longitudes promedios de 402,54 bp y determinó una alta asimetría de longitudes intrónicas, diferente a los resultados de Mount *et al.*, (1992). La longitud intrónica es el resultado de un proceso mutacional neutral, independiente de la tasa de recombinación, no obstante las longitudes intrónicas son significativamente más grandes en regiones del genomio donde existe poca recombinación. La longitud mínima en intrones (< 60 bp) es más abundante en regiones con altas tasa de recombinación regulados y sujetos a la firmeza y estrictez en la Selección. (Cameron *et al.*, 2000).

5.3 INTEGRACION DE RESULTADOS

En este trabajo presentamos la utilidad de la exploración de datos para el desarrollo de marcadores moleculares en *L. vannamei*, especie en la cual marcadores tipo I no han sido reportados previamente. Marcadores EST-SSR, EST-SSCP e intrones han sido

desarrollados a partir de secuencias públicamente disponibles. Estos marcadores son altamente transferibles por lo menos entre las especie evaluadas y su utilidad en diferentes tareas investigativas en la genética del camarón ha sido demostrada por nuestro trabajo. Mapeo genético utilizando AFLPs indica que el genoma de *L. vannamei* cubre alrededor de 4000 cM (Perez *et al.*, 2004). Para el estudio de caracteres controlados por múltiples genes (QTLs) se requiere de mapas genéticos que tengan en promedio un marcador cada 20 cM. Debido a la distribución aleatoria de marcadores, en camarón blanco se requerirá alrededor de 300 marcadores codominantes, o alternativamente, alrededor de 100 marcadores codominantes más un conjunto de marcadores dominantes para cubrir el genoma a una escala adecuada. Existe una alta disponibilidad de secuencias EST para varias especies de camarón en bases de datos públicas. Un trabajo similar al presentado aquí con mayor volumen de ESTs permitirá generar marcadores suficientes para mapeo de QTLs.

Con la utilización de exploración de datos en secuencias EST para plantas, se han identificado centenares de marcadores SSR en diferentes especies (Thiel *et al.*, 2003). Aunque un número exacto de EST-SSRS generados por exploración de datos en secuencias ESTs públicamente disponibles, ha sido reportado previamente en cerdo (Rohrer *et al.*, 2002), genetistas dedicados en genética animal no han aprovechado la alta disponibilidad de secuencias EST en bases de datos públicos. La disponibilidad de ESTs para diferentes especies animales es alta (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html) y combinado con el uso de un nuevo servicio en la web para búsqueda de microsatélites y diseño de primers (<http://hornbill.cspp.latrobe.edu.au/cgi-bin/pub/index.pl>) (Robinson *et al.*, 2004), el

aislamiento de SSR se vuelve muy simple. Para ilustrar este punto examinamos mil ESTs , cada una en tres especies diferentes (aves de corral *Gallus gallus*, cerdo *Sus scrofa* y el salmón del atlántico *Salmo salar*) y generaron primers EST-SSR en 6,8, 8,5 y 5,7% respectivamente. En el caso especial de *Salmo salar*, cuyo mapa de ligamiento comprende 64 marcadores (Gilbey *et al.*, 2004), para abril del 2004, hubo 87.982 secuencias EST depositadas en NCBI. Asumiendo una tasa de éxito del 1% en el desarrollo de marcadores, alrededor de 900 marcadores EST-SSR nuevos se podrían probar para polimorfismo y ligamiento. Los porcentajes de EST-SSRS en aves de corral, cerdo, salmón y camarón están en el mismo rango y gama para plantas (Saha *et al.*, 2003), lo cual señala una fuente importante de información útil. Adicionalmente el diseño de marcadores tipo intrón basados en homologías con genomios completos, como es el caso de *D. melanogaster*, *Aphis mellifera* o *Anopheles gambiae* podría generar cientos o probablemente miles de marcadores útiles para especies poco estudiadas desde el punto de vista genético como el caso de *L. vannamei*.

Nuestro trabajo demuestra que una aproximación de bajo costo mediante minado de datos y comparación de homologías es útil para generación de marcadores codominantes tipo EST-SSRs, EST-SSCPs e intrones en camarón. La implementación de estas técnicas a escala mayor abre interesantes líneas de investigación con presupuestos manejables localmente.

6. CONCLUSIONES

La información de secuencias EST disponible públicamente en el caso de *L. vannamei* es útil para la generación de marcadores EST-SSR, EST-SSCPs e intrones.

La exploración de datos para EST-SSR e intrones tienen bajo costo, lo que evita un aumento de costos operativos asociado con las etapas iniciales para el desarrollo de marcadores moleculares, es decir la construcción de la denominada librería genómica y su secuenciación.

Debido a que los marcadores EST-SSR, SSCP-SSR e intrones se derivan directamente de la expresión de genes, la identidad del producto y la función pueden ser identificadas por la comparación con bases de datos de proteína, generando marcadores tipo I.

Se ha demostrado que los marcadores EST-SSRS e intrones son transferibles entre especies. Transferibilidad significa que el costo neto por marcador desarrollado será aún más bajo si estos son utilizados en especies diferentes.

Aunque el nivel de polimorfismo en marcadores tipo EST-SSR es más bajo que los microsatélites genómicos aislados con métodos convencionales, el uso del análisis de SSCP permite revelar el polimorfismo a nivel de un solo nucleótido (SNP), aumentando aún más el porcentaje de marcadores útiles tipo EST-SSR.

Los marcadores desarrollados en esta investigación en *L. vannamei* son polimórficos y útiles en genética de camarones.

7. RECOMENDACIONES

Incrementar el minado de datos en secuencias públicas disponibles para la obtención de nuevos marcadores moleculares.

Ampliar los estudios de homologación de secuencias utilizando la información completa de genomio completo de especies de insectos (mosquito y abeja) con el fin de generar más marcadores tipo intrón.

8. BIBLIOGRAFIA

- Alcívar-Warren, A. 2001. Biotechnology and Aquaculture Interface: The site of Maximum Impact Workshop. Application of Biotechnology to Address Shrimp Industry Development and Environmental and Public Health Issues. . ARS-OI Biotechnology- Aquaculture Workshop.
- Argue, B., S. Arce, J. Lotz and S. Moss. 2002. Selective breeding of Pacific white shrimp(*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture* 204 : 447 – 460.
- Ball, A. and R. Chapman. 2003. Population genetic analysis of white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, using microsatellite genetic markers. *Molecular Ecology* **12**: 2319-2330.
- Ball, A., S. Leonard and R. Chapman. 1998. Characterization of (GT)_n microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Molecular Ecology* **7**: 1251-1253.
- Beasley, E., R. Myers, D. Cox and L. Lazzaroni . 1999. Statistical refinement of primer design parameters. *In* PCR applications: protocols for functional genomics . Edited by M.A. Innis, D.H. Gelfand and J.J. Sninsky. Academic Press, San Diego, CA. 55-71p.
- Bello, N. 2001. Desarrollo de Marcadores Moleculares en el Avestruz. (*Struthio camelus*). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 60p.
- Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyse DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **27**: 573-580.

- Bierne, N., I. Beuzart, V. Vonau, F. Bonhomme, and B. Bédier. 2000. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *L. stylirostris*. *Aquaculture* 184: 203-219.
- Bierne, N., E. Lehnert, E. Bedier, F. Bonhomme and S. Moore. 2000. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon – primed intron-crossing (EPIC)-PCR. *Molecular Ecology* 9: 233 –235.
- Bradley, R. and D. Hills. 1997. Recombinant DNA sequences generated by PCR amplification. *Molecular Biology Evolution* 14: 592- 593.
- Broker, A. and J. Benzie. 2000. Population structure of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in Australian waters, determined using microsatellite markers. *Marine Biology* 136: 149-157.
- Calderón, J. 2001. Análisis de una traumática experiencia: El WSSV en Ecuador. VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, V Congreso Latinoamericano de Acuicultura.
- Cámara Nacional de Acuicultura. 2003. <http://www.cna-Ecuador.org>.
- Cardle, L., L. Ramsay, D. Milbourne, M. Macaulay, D. Marshall and R. Waugh. 2000. Computational and Experimental Characterization of Physically Clustered Simple Sequence Repeats in Plants. *Genetics* 156: 847-854.
- Chow, S and K. Hazama. 1998. Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular ecology* 7: 1255-6.
- Comeron, J. and M. Kreitman. 2000. The Correlation between Intron Length and Recombination in *Drosophila*: Dynamic Equilibrium between mutational and selective forces. *Genetics* 156: 1175-1190

- Coombs, N., A. Gough, and J. Primrose. 1999. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res* 27: e12.
- Cruz, P., H. Mejia-Ruiz, R. Pérez-Enriquez and A. Ibarra. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, *Molecular Ecology* 2: 239-241.
- Davis, G. and D. Hetzel. 2000. Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. *Aquaculture research* 31: 3-10.
- Dinesh, K., W. Chan, T. Lim and V. Phang. 1995. RAPD markers in fishes - an evaluation of resolution and reproducibility. *Asia-pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 3: 112-118.
- Don, R., P. Cox, B. Wainwright, K. Baker and J. Mattick. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008.
- Duda, T. and R. Palumbi. 1999. Population structure of the black tiger prawn, *penaeus monodon*, among western indian ocean and western pacific populations. *Marine Biology* 134: 705-710
- Espinosa G., M. Jager, E. García-Machado, Y. Borell, N. Corona, A. Robainas and J. Deutsch. 2001. Microsatellites from the white shrimp *LitoL. schmitti* (Crustacea, Decapada). *Biotechnología aplicada* 18: 232-234.
- Falconer, D. 1989. *Introduction to Quantitative Genetics*, 3rd edn. Longman, Essex.
- Ferreira, M. y D. Gratapaglia. 1998. *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. 1 ed. Brasilia: Embrapa-Cenargen 220p

- Fornzler, D., H. Her, E.Knapik, M.Clark, H. Lehrach, J. Postlethwait, L. Zon and D. Beier. 1998. Gene Mapping in zebrafish using single-strand conformation polymorphism analysis. *Genomics* 51(2):216 –22.
- France, S., N. Tachino, T. Duda, R. Shleser, and S. Palumbi. 1999. Intraspecific genetic diversity in the marine shrimp *Penaeus vannamei*: multiple polymorphic elongation Factor-1 α loci revealed by intron sequencing. *Marine Biotechnology* 1:261–268
- Gilbey, J., E. Verspoor, A. McLay and D. Houlihan. 2004. A microsatellite linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Animal Genetics* 35: 98-105.
- Giovambattista, G., M. Ripoli, J. Lirón, M. Kienast, E. Villegas, F. Castagno y P. Peral. 2001. Aplicación de las Técnicas de Polimorfismo de DNA en la resolución de casos de Abigeato, identificación individual y determinación de Paternidad. *Analecta veterinaria* 21(1): 5-11
- Gupta, P., S. Rustgi, S. Sharma, R. Singh, N. Kumar and H. Balyan. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Molecular Genetics Genomics* 270: 315-23.
- Hare, M. and S. Palumbi. 2003. High intron sequence conservation across three mammalian orders suggests functional constraints. *Molecular Biology and Evolution* 20: 969–978.
- Hassan, C., C. Lemaire, C. Fauvelot and F. Bonhomme. 2002. Seventeen new exon-primed intron-crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish. *Molecular Ecology Notes* 2(3): 334

- Holland, J., S. Helland, N. Sharapova and D. Rhyne. 2001. Polymorphism of PCR-based markers targeting exons, introns, promoter regions, and SSRs in maize and introns and repeat sequences in oat. *Genome* 44: 1065-1076.
- Humphries, E., V. Gudnason, R. Whittall, and N. Ian. 1997. Single – strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clinical Chemistry* 43(3): 427 – 435 .
- Kantety, R., M. La Rota, D. Matthews and M. Sorrells. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology* 48: 501-510.
- Karp, A., I. Pand and D. Ingran. 1998. Molecular tools for screening biodiversity plants and animals. Chapman & Hall. London. 41-45p.
- Lessa, E. 1992. Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. *Molecular Biology and Evolution* 9: 323-330
- Li, Y., A. Korol, T. Fahima and E. Nevo. 2004. Microsatellites within genes: Structure, Function, and Evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21(6):991-1007.
- Liu, Z., A. Karsi and R. Dunham. 1999. Development of Polymorphic EST Markers Suitable for Genetic Linkage Mapping of catfish. *Marine Biotechnology* 1: 465-476.
- Liu, Z. 2003. Research project: Channel Catfish Molecular Markers: project 640231000-005-06S. Auburn University.
- Liu, Z., A. Karsi and R. Dunham. 1999. Development of Polymorphic EST Markers Suitable for Genetic Linkage Mapping of catfish. *Marine Biotechnology* 1: 465-476.

Maggioni, R., A. Rogers and N. Maclean. 2003. Population structure of *Litopenaeus setiferus* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. *Molecular Ecology* 12: 3213-7.

Marine Genomic : <http://www.marinegenomics.org>

Meehan, D., Z. Xu, G. Zúñiga and A. Alcívar – Warren. 2003. High frequency and large number of Polymorphic microsatellites in cultured shrimp *Penaeus (Litopenaeus vannamei)* (Crustacea : Decapoda). *Marine Biotechnology* 5: 311–330.

Miller, M. 1997. Tools for Population Genetics analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for analysis of allozyme and molecular population data. Computer software distributed by the author.

Moore, S., V. Whan., G. Davies, K. Byrne, D. Hetzel and P. Niegel. 1999. The development and application of genetics markers for the Kuruma prawn *M. japonicus*. *Aquaculture* 173: 19-32.

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

O'Brien, S. 1991. Molecular genome mapping : lessons and prospects. *Genetic Development* 1 :105-111.

Palumbi, S. and S. Baker. 1994. Contrasting populations structure from Nuclear Intron Sequences and mtDNA of Humpback Whales. *Molecular Biology and Evolution* 11: 426-435.

Pérez, F. 2001. Perspectivas del mejoramiento del Camarón en el Ecuador. www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/boletin42/proyectos

Pérez, F. y M. Zhinaula. 2003. Selección Genética de Camarón en el Ecuador. VII Congreso Ecuatoriano de Acuicultura.

- Pongsomboona, S., V. Whanb, S. Mooreb and A. Tassanakajon. 2000. Characterization of tri- and tetranucleotide microsatellites in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Science Asia* 26: 1-8.
- Robinson, A., C. Love, J. Batley, G. Barker and D. Edwards. 2004. Simple sequence repeat marker loci discovery using SSR primer. *Bioinformatics*. In press.
- Roderick, G. 1998. Geographic structure of Insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Reviews Entomology* 41:325-52
- Rohrer, G., S. Fahrenkrug, D. Nonneman, N. Tao and W. Warren. 2002. Mapping microsatellite markers identified in porcine EST sequences. *Animal Genetics* 33: 372-376.
- Rojtinnakorn, J., I. Hirono, T. Itami, Y. Takahashi and T. Aoki. 2002. Gene expression in haemocytes of Kuruma prawn, *M. japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish & Shellfish Immunology* 13: 69-83.
- Russell, Peter. 1992. *Genetics*, 3rd edition. Harper Collins Publishers.
- Saha, S., M. Karaca, J. Jenkins, A. Zipf, O. Reddy, K. Umesh and R. Kantety. 2003. Simple sequence repeats as useful resources to study transcribed genes of cotton. *Euphytica* 130: 355-364.
- Sambrook, J., E. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. U.S.A. Vol. 1,2,3.
- Scott, D. 2001. Microsatellites Derived from ESTs, and their Comparison with those Derived by Other methods. CAB International. *Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting*: 225 – 237.
- Serapion, J., H. Kucuktas, J. Feng and L. Shanjiang. 2004. Bioinformatic Mining of Type I Microsatellites from Expressed Sequence Tags of Channel Catfish

- (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture Abstracts, Marine Biotechnology, 1436-2236.
- Shahjahan, R., K. Hughes, R. Leopold and J. DeVault. 1995. Lower incubation temperature increases yield of insect genomic DNA isolated by the CTAB method. *Biotechniques* 19: 332-4.
- Silva, E. and M. Russo. 2000. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. *Hydrobiology* 420:119-135
- Small, M. and E. Gosling. 2000. Species relationships and population structure of *Littorina saxatilis* Olivi and *L. tenebrosa* Montagu in Ireland using single-strand conformational polymorphisms (SSCPs) of cytochrome b fragments. *Molecular Ecology* 9:39-52.
- Tassanakajon, A., A. Tiptawonnukul, P. Supungul, V. Rimphanitchayakit, D. Cook, P. Jarayabhand, S. Klinbunga, and V. Boonsaeng 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7(1): 55 – 61.
- Thiel, T., W. Michalek, R. Varshney and A. Graner. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare*). *Theoretical Application in Genetic* 106: 411-422.
- Tong, J., S. Lehnert, K. Byrne, H. Kwan, and K. Chu. 2002. Development of polymorphic EST markers in *Penaeus monodon*: applications in penaeid genetics. *Aquaculture* 208: 69 –79.
- Toth, G., Z. Gaspari, and J. Jurka . 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res* 10: 967-81.

- Touriya, A., M. Rami, G. Cattaneo-Berrebi, C. Ibanez, S. Augros, E. Boissin, A. Dakkak and P. Berrebi. 2003. Primers for epic amplification of intron sequences for fish and other vertebrate population genetic studies. *Biotechniques* 35:676-682
- Van der Werf. 1989. Introduction to some aspects of molecular genetics. University New England. Australia. 35-43p.
- Wang, J. and Q. Mu. 2003. Soap-HT-BLAST: high throughput BLAST based on Web services. *Bioinformatics* 19: 1863-4.
- Weber, J. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 7:524-530.
- Woodhead, M., J. Russell, J. Squirrell, P. Hollingsworth, L. Cardle, L. Ramsay, M. Gibby and W. Powell. 2003. Development of EST-SSRs from the Alpine Ladyfern, *Athyrium distentifolium*. *Molecular Ecology* 3: 287-290.
- Wuthisuthimethavee, S., P. Lumubol, A. Vanavichit and S. Tragoonrung. 2003. Development of microsatellite markers in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Aquaculture* 224: 39-50.
- Xu, Z., A. Dhar, J. Wyrzykowski, A. Alcivar-Warren and J. Primavera. 2001 Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines using microsatellite. *Aquaculture* 199: 13-40.
- Yue, G. and L. Orban. 2002. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. *Molecular Ecology* 2: 99-100.
- Yue, G., Y. Li and L. Orban. 2001. Characterization of microsatellites in the IGF-2 and GH genes of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Marine Biotechnology* 3: 1-3.

- Yue, G., M. Ho, L. Orban and J. Komen. 2004. Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp. *Aquaculture*. In press.
- Zhang, D. and G. Hewitt. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations. *Molecular ecology* 12: 563–584

9. ANEXOS

Anexo 1. Marcadores EST-SSR e información de polimorfismo en *Litopenaeus vannamei* en un pequeño panel multiespecies constituido por *L. vannamei*, *L. stylirostris* y *T. birdy*. En cada especie se presenta el tamaño de bandas y número de alelos.

LOCUS	ENTR	PRIMERS 5' - 3'	REPEAT SEQUENCE	ESPÈRADO	<i>L. vannamei</i>	<i>L. stylirostris</i>	<i>T. birdy</i>
CNM-MG 332	>2403	ACTGGACTAAGCAAGG GATTACAACAAGAAGAA	(T)5 C (T)8 G (T)5 A (T)7	196	204(1)	219-237(3)	
CNM-MG 334	>2578	GAGTTCCAATGTAAGTAG AAAATGTAGGTCGGTC	(A)7 T (A)3 G(A)T (A)4 T (A)4	124	129(1)	129(1)	
CNM-MG 335	>3955	AGCCAGGAAGAGGAGG CATCGCCAGAAAGACAG	(GAGC)4	112	112(1)	112(1)	112(1)
CNM-MG 338	>4799	TGCTCAAGTCGTTACT GAGGTTTCTGTCTATAA	(TTTG)4	116	119(1)	119(1)	
CNM-MG 339	>6023	AAACAACATATTGCAGTTC AAGCGTCAGATTCCAG	(ACAAA)4	162	159-191(8)		
CNM-MG 344	>7025	TTACGGGTGAAGTGTT TTTATGCTTCCCTACC	(AC)7	289	309(1)	304-309(2)	
CNM-MG 345	>8364	GAAGTGAGCTTGGCATCCA GTAGAGCAGCGAGCCAGC	(TC)4 CC (TC)5	109	(MB)	(MB)	(MB)
CNM-MG 347	>2630	TGATGCCAACAATAAAG GTCGAAGCTGGAAACT	(TGA)6	287	309-316(3)		
CNM-MG 350	>5810	ACAGAAAACCAAGCAA ACGGGATCATAGACAGC	(GT)4 TT (GT)6 TT (GT)2 AT (GT)3 AT (GT)	245	256-276(3)		
CNM-MG 351	>6093	GCAAACAGGAGACAAT CGGACTCTAGCAATAA	(T)20	218	216-227(4)	233(1)	
CNM-MG 354	>7065	AAGACAGAAAGGGTGA CAAGAGGGAGAAAGTAG	(T)15	190	203-214(4)	214(1)	
CNM-MG 355	>7175	TGGCATTTCATCTTTGG	(AAAT) ATAT (AAAT)2 AATT (AAAT)	262	274-280(2)	275-279(2)	277(1)

		AAGAGGCACTTCATCC				
CNM-MG 356	>7188	TGCGTTCACATTTCCA AATTGAGTGTCCCTTGC	(GATA) GAGA (GATA)3 GACN (GATA)3	177	180-192(2)	
CNM-MG 357	>7190	GCTTGAATCGCTACTGC GTTGCTGCCACTCATT	(CTG)6 CTA (CTG)3	278	287-290(2)	288(1)
CNM-MG 359	>7229	TGACAGTAACTCCCAAAT GAATGCAGGAAACATG	(GATTT)3	195	204(1)	254(1)
CNM-MG 362	>2630	TACTTGGACCTCAGTCA GCACGCTTAGTCTCAA	(AAAAC) AAA (AAAAC)2	199	192-224(7)	
CNM-MG 363	>5567	TGCCTAAACCCAAGTC CAGTGGAATATGAAATAAGA	(AT)2 AC (AT)3 GT AA (AT)7	113	121(1)	
CNM-MG 364	>5587	CGTCGTAGTCACAAGAT CAGTATCAATACCGTCCT	(TA)2 TC (TA)7	166	170-173(2)	
CNM-MG 365	>5998	CTTCATACCCATTCTTTCT GCAATAGGCTACAGTTCC	(CTTC)4	300	305(1)	300(1)
CNM-MG 366	>6145	TCACTTTCCAAATCAAAAC CTAGCAATCTTATTACTACC	(AG)3 AA (AG)2 GG (AG)7	196	199(1)	
CNM-MG 367	>6328	AAACCACCCTGACCATC CTGTGCCAAATTACAAGC	(ATTTT)4	284	281-308(9)	256(1)
CNM-MG 369	>6676	AGCAAGCATTCTCCTA TTGTGGTCGAACCTAAAC	(T)19	239	251-255(2)	249-251(2)
CNM-MG 370	>7353	ATAGCGGACCACCTAG CTCCGTAAATCTTGG	(ACAA)2 A ATAA (ACAA)3	228	239(1)	
CNM-MG 371	>7446	CCAAGAGGGAGTAGAAA GGATAAACACGAAACC	(TA)6 TG (TA) AA (TA)3 T (TA)2	268	292-297(2)	
CNM-MG 372	>7462	TGGATTGCGGATIGA TCCCAGCACTTGTTCATC	(TTA)5	252	265-292(2)	265(1)
CNM-MG 373	>7527	GATGTCTTATTGGAAA CAGAGCAGATATGGAA	(AAGAA)3	170	177(1)	
CNM-MG 374	>7553	TTGAAAAGCAAAGAAC	(AT)7	200	209(1)	209(1)

		CTTGGCAGGAGTAGTA					
CNM-MG 378	>2496	AAAGGGTGAAGCATAT GTGTTTGGGTTGGTAT	(CA)4 GA (CA)5	199	207(1)	207(1)	291(1)
CNM-MG 379	>2545	GCACGATGGTTCAGTA CCAATGCAAATAACAGA	(TG)3 (TT)2 (TG)2 (TT) (TG)5 TA (TG)4	248	257-260(2)		
CNM-MG 380	>5602	CGAGCGTTATCAAATG GAAATGATGGGGAAGA	(ATT)3 GTT (ATT)5	238	237-260(6)	257-261(2)	
CNM-MG 383	>6156	TTCCTCGTCATTTAC TGCTTACACCGCCAGA	(TA)2 TG (TA)4 C (TA)4 CA (TA)2	268	247-283(3)		
CNM-MG 384	>6534	ATCGGGAATACAATCG AACCCTAACAAACAATAAG	(AAACA)5	227	227-247(5)		
CNM-MG 386	>6623	CGAGCACAGGAAGATA TCTGGGAGAAGGGATA	(AAAAC)3	257	271-274(2)	273(1)	339(1)
CNM-MG 387	>6636	CAGCTCATACGGAGAC CTTGCGTGAAATTGTT	(AACAA)2 TATA (AACAA)2 AGCA (AACAA)	221	212-223(3)	223(1)	
CNM-MG 390	>7251	CGTAAGATGTGCCAGT CAGTTATAAAGTCAAAAGTA	(TGA)5	248	254-260(2)	254(1)	
CNM-MG 393	>2113	TTTGACGGAATGAGCA GGGGAAATTAGTTAGAGG	(TTTTTC) (T)8 (TTTTTC)5	267	293-299(3)		
CNM-MG 396	>2518	GTTCTCGAACATGGGA GGGTGATGCAACCTAT	(AAAC)3	295	319(1)	326-335(2)	
CNM-MG 397	>2809	GACTTGGAAGGGAAGT AGAAATAAAGGCTCTATGC	(AGAAAA) AA (AGAA AA)2 AA (AGAA)2	100	105(1)	105(1)	101-105(2)
CNM-MG 398	>2880	GGGAAGAATATGTAATG TAACAAGTGCCTGAAA	(CATA)5	178	177-197(6)		
CNM-MG 401	>7364	GACATGAGGTATAGCCATTA TATGCACCCTGCTGAC	(TTGT)4	208	212(1)	268(1)	214(1)
CNM-MG 402	>7415	CTTTTGGCTGGCTTAC TTCCTTTTGATCTACATTG	(AGAAA)3	178	187-194(3)		
CNM-MG 403	>7540	TTTCTTGAGAAGGGAG	(TAA)5 T (TAA)4	285	299(1)		

		GCAATCTTACATGGTGG					
CNM-MG 405	>7789	GTGACTGCCCTTTCTACC CTTCCTTGCACGATTTT	(GA)17	251	298-317(4)	320346(2)	
CNM-MG 406	>7797	GATAAAGAAGCGAGAACG CTATGGCTAGATCCGAGA	(GA)18	256	318-354(8)	333-363(2)	
CNM-MG 407	>2077	GTCTCCTTGCCCGTGTC CGAGTCCGTTGATCCTT	(TTTCT)4	286	293-296(2)		
CNM-MG 408	>2272	ATGTAGTCCTTAACCCATTC GGTCATCAGTCCTGCTCT	(T)16	263		(MB)	
CNM-MG 412	>5818	GCCATTGATTGCTCT TGACTTGGTCTTTGTTAG	(GT)8	235	236-245(2)	235(1)	
CNM-MG 416	>6631	TGCCAGTGCCATTTGA CCTCCTCCTCCCAACT	(TAT)4 TTT (TAT)2	258	286-288(2)		
CNM-MG 417	>7337	TAAGTTCCGTAGTCTCA CATCATTATCATTATCGTTG	(ATG)2 GTG (ATG)4 ATA (ATG)2 ATA	205	212(1)	294(1)	
CNM-MG 418	>7393	TAGCCAACGAACAAGC GATTAGTTGATTAGCAGGA	(TAA)6	280	291-295(3)		
CNM-MG 421	>7555B	TTTCTGCCACGGAGTT CTGTTGCCCAAATAGC	(AAT)5	144	148-163(3)	149(1)	
CNM-MG 422	>7555	GCAACTATTTATCATCTAAC TTCTGGAAGACTGTGG	(AT)9	153	156(1)	164(1)	
CNM-MG 423	>7572	TTTGATGGCAAGGAG AGTGGAGTGGCTGGAA	(TAAA)4	257	270(1)	270(1)	
CNM-MG 425	>2255	TAACCAAGCAGAATG TGATCAATGCAAGAAA	(T)15	249	288(1)	286(1)	
CNM-MG 426	>2278	AGGGAGGCTGAGGACG CAATTAGCAGTGATTATTTTCG	(TTC)5	205	209(1)	211-217(2)	252-256(2)
CNM-MG 430	>5553	GGGAAGCCCAAATAAGA AAAGAAGAGGAAAGGGATAG	(CT)3 CATT (CT)6 CA (CT)5	199	187-221(9)		
CNM-MG 431	>5616	ATGAAAAGACGAAATG	(TAA)5 TAG CAA (TAA)2	246	248-268(3)	267-271(2)	

		ACGAGCGTTATCAAAT						
CNM-MG 432	>7343	TAGAAGGCAAAGCAGT ATTCTATCACCACCGT	(AAAG)4	275	291-301(3)	284-302(3)		
CNM-MG 433	>7374	TAGATCCCTTCTAGTTTC CTTTAGACAGCCAATT	(AAT)3 ... (AAT)2 AGT (AAT)4	292	317		(MB)	
CNM-MG 434	>7390	ACAGGGCAGGACAATA GTTAACTGAGCCATACTTT	(ATTTT)3	237	247(1)	247(1)	247(1)	
CNM-MG 435	>7525	CACTGATTGGCTGTTC TACTGCTCCTACTGTTTC	(AAAG)3 AAAA (AAAG)	235	244(1)	240-251(4)	246(1)	
CNM-MG 436	>7567	AGAAGTTGCGGCCTAT TACCGAGTTATTCTTGCTG	(TA)10	295	320-331(5)			
CNM-MG 437	>7568	CAACCAGGAAATAGAACAG GCAGCCTTACCACGAC	(CAA)6	135	133-136(2)	230-244(4)		
CNM-MG 439	>7830	TGGCTAGATCCGAGACT CAACATCCCTTCACAAAC	(TC)17	225	291-324(6)	288-335(3)		
CNM-MG 443	>2501A	GAGGCAAGTCAAAGGG TCTGGCGTATCAATGTG	(CCA)2 (CCTCCACCTCCA)2 (CCA)	226	225(1)	225(1)	225(1)	
CNM-MG 444	>2501B	CGTACAAGGCATTGGG GCATCTACTTTGACGCACT	(GTT)4	278	274-294(5)	243-265(4)	260-331(2)	
CNM-MG 447	>2687	TGATGAGCACCTTGAC CACTAGAGGCTTATACCA	(TACA)2 TAA (TACA)2 ... (TACA)3	240	252(1)	252(1)	252(1)	
CNM-MG 450	>6344	ACTGACACCTGCATTG CACAGGCACAGGAATA	(TAT) TGT (TAT)2 ... (TAT) CAT (TAT)3	213	222(1)	244(1)		
CNM-MG 451	>6655	TCCACCATAGCCTCCA CCGCTGCAATGAACCA	(CCA)3 CCT (CCA)3 (TCA)3 (CCA)2	169	313(MB)	306(MB)	342(MB)	
CNM-MG 452	>6739	AGCCCAGCCCCGTGTT TGACAATAAAGCCTGAA	(AAC)2 AGC (AAC)3	489	534-540(2)	524(1)		
CNM-MG 455	>7414	GAGCGTATCTAACCTCA TATGGCTATTGTAACCTTC	(AAAAT)4	284	307-316(2)	314(1)		
CNM-MG 456	>2157	TTCTTCACATATTGCCCTAC	(TTC)6 ATC (TCC)2 GTC (TTC)2	238	252(1)	234251(3)		

		GATTCCGTCGCCAACT					
CNM-MG 457	>2450	CAATCTTCTGGTGGTTC TATGGCTCGGGTGTAT	(TC)8	243	247(1)	222-236(3)	
CNM-MG 459	>2461	ATCATGTAAGGGTATTTGG CATTATTCGGCGTTTT	(T)14	136	134-139(3)	133-136(2)	
CNM-MG 460	>4295	TTCCATAATGCTGAATC CTGAGCGAAAAGACGAG	(TA)9	134	238(1)		
CNM-MG 462	>5766	AGATACGCTTCCTAATGAT GCTAGTTCCTGCTCCC	(ATG)6	157	192(1)	192(1)	
CNM-MG 463	>5798	AACGCAGCGCAGAAGA TGGAATTGTGAGCGGATA	(AGC)6	268	265-283(5)	273-284(3)	
CNM-MG 465	>6596	AAGTCCAGACAACGAG TAACCTTTAGCAACCT	(TTA)5	256	300(1)	308(1)	
CNM-MG 467	>7413	CTTATTACTACTGCTGCTAG AGGCTGGACTTCTTGT	(TTA)4 TTG (TTA)3 CTA (TTA)	226	229(1)	229(1)	
CNM-MG 470	>7997	AAGTAACTTGGGTGAAA TAGGGCATAGACCATC	(TTTA)6	252			296(1)
CNM-MG 471	>4532	AAGTGTGCTGGGTATG GCGGACGACAAGGTTT	(GAT)3 GAG (GAT)3 GAC (GAT)2	256	270-284(5)	259-272(3)	
CNM-MG 472	>4550	CCCTTCCACCGTGTTG CAGCCTTGCCCTTCTT	(AAAG)2 A (AAAG) C (AAAG)2	196	243-245(2)	250-257(2)	242-253(2)
CNM-MG 474	>5631	CTGGCTTGTGGAATGG CAACGAAAAGGCAGATGG	(T)15	195	193-200(2)		
CNM-MG 477	>6643	TGATGATGACGACGATG ATTCTTGGGAGATGTTG	(GAT)6 (GAC)3 ATT (GAT)3 GGT (GAT)	366	353(1)		258-269(3)
CNM-MG 479	>6674B	GTGAAGTTGGGATTATAG CTGCCAGTTTAGCGAC	(T)16	102	96-106(4)		
CNM-MG 483	>7908	ATTCGCTACATATCATCAC AAGAGGCAATAAGGGT	(T)7 A (T)11	281	294-303(4)		
CNM-MG 484	>8015	TCACCATCGCCAGAAA	(GCTC)4	115	117(1)	117(1)	

		CCAGGGAAGAGGAGGA					
CNM-MG 487	>3977	GACAGACAGTGGTGGCG CGTTCTCCTTGCGTGATG	(GGC)6	297	288-309(7)	653-687(MB)	622-715(MB)
CNM-MG 488	>4104	GCTGAAACGCTCGTCA TGGGCATACTGGGAAA	(AAAAT)3	265	266-620(2 B)	266-620(2 B)	
CNM-MG 489	>4141	GACAGCCACCACGATAAG GCAAGGAGGGACAGGAT	(AACTG)3	233	236-245(2)	222-228(MB)	219-637(MB)
CNM-MG 494	>7935	ACCACTGACTCCCACG CAGGGTCAAAGCAAGA	(AC)5 AG (AC)2 AT GG (AC) (ACGC)3	289	293-315(8)	325-337(4)	
CNM-MG 496	>7993	TGTCACTGTTGAGCCCTACT CAGATTCCTCAGCCTCCT	(TGG)4 CGG (TGG)	203	379-387(5)		
CNM-MG 498	>8181	TTGCTGCTTACTGTCTTGC CATCATCCGACTCTTCCT	(TGG)5	297	719-741(4)	560-566(2)	453(1)
CNM-MG 507	>5040	GATCCCGATGCCGTAGC TGTTTACCAGTTGGGTCCAT	(GCT)4 ACT (GCT)3	228	365-375(3)		
CNM-MG 508	>5063	GCAGCACTACAGGTAA AATTGCACAAGACTTCAT	(TG)4 CA (TG)5 TA (TG) TA (TG)3 TA (TG)2	118	119(1)	120(1)	105(1)
CNM-MG 512	>5625	TGGAAACCTGGCTTGA TCCTAAATACACGGCACT	(ATGT) GTGT AAGT (ATGT)3	240	249-257(4)	421-688(3)	
CNM-MG 514	>8069	TGGAGAAGACTGCCTGAT GATTTAGCCATACCTTTCA	(T)15	298	292-304(4)		
CNM-MG 516	>8230	GTGCCTATGGTGGTTC TCAATTTACTTCTTGGATC	(GCT)6	148		301(1)	
CNM-MG 518	>4876	CACAGTGCAGATGGC TACCGAACAAGGAATACAAT	(GCAA)4	169	169(1)	167(1)	
CNM-MG 521	>5012	GGGATACAGCAATAAC ATTGGAACAGACAAGTA	(TA)2 TGA (TA)3 TT (TA)5	299	319(1)	315(1)	
CNM-MG 522	>5027	GCCTTTGGTGGTTCTC AATTACTTCTTGGATCCTC	(GCT)6	143		270(1)	
CNM-MG 526	>5175	TCTATAACAACACGTCCACTAG	(TTTTG)3	183	186(1)	188(1)	

		CACGAACGACTTGCTCC						
CNM-MG 527	>5200	TAGCATTGTAGGGTCA CCTTACATTGCCTTTG	(ATT)3 A(ATT) T (ATT)3	188	198-205(2)	202(1)		
CNM-MG 528	>5286	GGGGAGTTGAGCATTG GGTTTACGGCGGAGAA	(CAC)3 CTAC (CAC)2	158			383-468(MB)	
CNM-MG 529	>5329	TTGCTGCTTACTGTCTTGC ATCATCCGACTCTTCCTCT	(TGG)5	296	724-755(4)	555-559(MB)	555-620(MB)	
CNM-MG 531	>4282	GTTCTGTTTACAATTGGTTC GAGGAGGACTGAGGGTG	(CAC)5	206	728(1)	483-679(MB)	409-788(MB)	
CNM-MG 532	>5026	TTGCGGCAGCGGTAAAGG GACGGCCAAGCCAAGACA	(GGA)3 GGT (GGA)3	108	106(1)	(MB)	(MB)	
CNM-MG 533	>5825	CGGGCGGGTACAAGCT GTCGCTGAAAATAATGC	(AGC)5	137			417-414(2)	
CNM-MG 535	>6792	ACACTACAAGCAACCA TCCCAAATAAACTCA	(T)17	280	334-345(3)		602-751(MB)	
CNM-MG 543	>8410	TGAAGCCATTGTCTGT TTGTGGGAGATGATGC	(ATT)5	263	294(1)	294(1)		
CNM-MG 548	>5851	ACAACCTCAAAGCTACA TCAGTCTCATCTTCCAT	(AAAT)4	252	287-303(2)	285(1)		
CNM-MG 554	>7410	TTTAGCTGGGCGACTT GTATGCAGCCTTCCCT	(AAAAG)3	126		927- 1466(MB)	1420- 1442(MB)	
TOTAL SECUENCIAS				112	106	77	29	

Resultados de la presente investigación. Elaborado por F. Pérez y J. Ortiz.

Anexo 2. Marcadores EST-SSR e información de polimorfismo en *Litopenaeus vannamei* en un panel multiespecies constituido por: *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. biridi*. En cada especie se presenta el tamaño de bandas y número de alelos.

LOCUS	ENTRY	PRIMERS 5'- 3'	REPEAT SEQUENCE	EXPECTED	<i>L. vannamei</i>		<i>F..</i>			
					<i>parentales</i>	<i>L. vannamei</i>	<i>L. stylirostris</i>	<i>F. californensis</i>	<i>duorarum</i>	<i>T. byrdi</i>
CNM-MG 556	>2126van	GGTGGATGGAAGTTGG CTGCGTTTATGTATCTGTAA	(TTTC)4	262	276(1)	276(1)		265-280(3)	276(1)	
CNM-MG 557	>2272van	TGGCCTATTCATACCTCA TCAGTCCTGCTCTTTCC	(T)16	282	282-286(2)	289-292(2)				
CNM-MG 559	>2310van	GCGTGTAGGTGAAACT CCCTGACTTCGATAGT	(TC)14	165	171 (1)	171(1)				
CNM-MG 565	>4181van	AACAGGAAAGGCGATGT CAGGTGCAAACCAAGC	(AACC)4	205	207(1)	207(1)		203-207(2)	203(1)	
CNM-MG 566	>4305van	TGTATCTGAACTTGAAGGGAA AGCAGGAGCAGCACCAC	(TGG)5	121			405-408(2)	551-557(2)		
CNM-MG 569	>4479van	TGTATCTGAACTTGAAGGGAA AGCAGGAGCAGCACCAC	(TTG)5	121			405-408(2)	551-557(2)		
CNM-MG 576	>5142van	CCTCGCTTGACAACCTG ATCGTGCATTCATGGAAAA	(T)15	166	168(1)	167(1)				
CNM-MG 579	>5590van	TCGCGTTGATAGTGAG ATCTTCGGCTACAGTAAG	(TA)13	269	290(1)	290(1)	289(1)	285-289(2)	285(1)	285(1)
CNM-MG 581	>5875van	AACAAATACTCGGGAAGG GCCAGAGCCAGAAAAGA	(CTTT)6(CTTTCTCT)7(TCT GGC)3(TC)13	264	263(1)	261-265(2)				
CNM-MG 594	>6955van	AGGTTGATGGCTTCTG GAGCCCTACATTTCTTTG	(TGT)5	292	299(1)	300(1)	300(1)	302(1)	308-311(2)	308(1)
CNM-MG 599	>7374van	CGAAAGCACAAAACAAA AACAACCGAGAAGAGG	(AAT)18	154	164(1)	164(1)				
CNM-MG 600	>7393van	GGCATCTAACTTGAGC AGTTGATTAGCAGGAAA	(TAA)6(ATAATGATG)4(AT A)5(AAAGAGAG)2(AG)20(T G)18	208	214-221(3)	217(1)				
CNM-MG 601	>7571van	AAATGGTTTATGGGAGGC								

		CTGCCGTGGATGTGCT	(CT)12	165	165(1)	165(1)	165(1)	165(1)	167(1)	
CNM-MG 603	>7817van	GGGTTTGTGCTGTGAA								
		CCTTGTAAGGGTAGGC	(TA)11	115	122(1)	122(1)	122(1)	122(1)	122(1)	122(1)
CNM-MG 604	>7822van	GTAGCCAGTATTAAACAG								
		TCAGTGACAGGGTATTC	(T)17(TTTTTA)3	160	165-168(2)	155-169(3)	166-194(4)	165-167(2)	160(1)	
CNM-MG 612	>8365van	GATGAGACTGCGGAAGC								
		CCCAGGAAGAGGAGGAG	(CGC)5(CTT)24	117			110-124(3)	158(1)	131-168(3)	
CNM-MG 617	>8526van	TGTATCTGAACTTGAAGGGAA								
		AGCAGGAGCAGCACCCAC	(TGG)5	121			410-415(3)			

RESULTADOS DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN. ELABORADO POR F. PÉREZ Y J. ORTIZ.

Anexo 3. Homologación de marcadores SSR – ESTs de *L. vannamei* con proteínas conocidas.

PRIMER	ACCESO	FUNCION	PROBABILIDAD	RANGO	ESPECIE
CNM-MG 365	Q9VXK0	NipSnap protein	5x10-23	105	<i>Drosophila melanogaster</i>
CNM-MG 369	P29341	Polyadenylate-binding protein	5x10-25	113	<i>Mus musculus</i>
CNM-MG 390	CAB41634.1	iron regulatory protein 1-like protein	9x10-23	106	<i>Pacifastacus leniusculus</i>
CNM-MG 412	NP_501503	polynucleotide 5'-kinase 3'-phosphatase	6x10-30	132	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CNM-MG 416	P18262	Ras-like protein	6x10-23	105	<i>Artemia salina</i>
CNM-MG 426/463	Q59296	Catalase	2x10-11	68	<i>Campylobacter jejuni</i>
CNM-MG 462	NP_002777	proteasome alpha 1 subunit isoform 2	8x10-20	98	<i>Homo sapiens</i>
CNM-MG 474	P81058	Penaeidin-3a precursor	3x10-28	124	<i>Litopenaeus vannamei</i>
CNM-MG 496	P02402	60S acidic ribosomal protein	9x10-26	114	<i>Artemia salina</i>
CNM-MG 512	P81057	Penaeidin-2a precursor	1x10-20	99	<i>Litopenaeus vannamei</i>
CNM-MG 516/522	Q9NB34	60S ribosomal protein L34	3x10-25	67	<i>Ochlerotatus triseriatus</i>
CNM-MG 528	AAO92284	Putative beta thymosin	9x10-30	132	<i>Dermacentor variabilis</i>
CNM-MG 529	Q29315	60 S acidic ribosomal protein P2	1x10-15	80	<i>Sus scrofa</i>

Resultados de la presente investigación. Elaborado por F. Pérez y J. Ortiz.

Anexo 4. Marcadores intrónicos e información de polimorfismo en *Litopenaeus vannamei* en un panel de prueba constituido por *L. vannamei* de un set de mapeo y animales silvestres: *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. biridi*. Se presenta el tamaño de banda y número de alelos observados.

LOCUS	ENTRY	PRIMERS 5'- 3'	EXPECTED	<i>L. vannamei</i> parentales	<i>L. vannamei</i>	<i>L. stylirostris</i>	<i>F. californiensis</i>	<i>F. duorarum</i>	<i>T. biridi</i>
CNM-MG 620	>2026van	ATCACTACCAGCAAGGAC AGTCGGATGGGTTCTT	97	97(1)	97(1)	97(1)	97(1)	97(1)	
CNM-MG 622	>2044van	ATGGTTAGGGTGGACAAAT ACGCAGGCTCATACGG	144	145(1)	145(1)	144(1)	145(1)	144(1)	
CNM-MG 624	>2072van	GGGTGCGGGTTTCTTGGTGA GGAAGGGGAAGGGAAGGGTG	77	77(1)	77(1)	77(1)	77(1)	77(1)	77(1)
CNM-MG 626	>2097van	TGCGTGATGGATGGACTTAG CGTAACAAGAGGGAATTATGGA	267				563-569(2)	543-550(2)	
CNM-MG 630	>2290van	TTTATGTATCCAAGGAGGCT ACCATTTCGTGTCTGATAGTC	269	405(1)	405(1)	410(1)	408(1)	398-407(2)	
CNM-MG 631	>2335van	GCTGCTGGATCTCGAT AAGGATGGGGTAGTGG	169	153(1)	153(1)	153(1)	153(1)	153(1)	
CNM-MG 633	>2504van	ATTCCAGGGTGGCACTTTCT TTAGGGTAACCGACATTATTTG	203	476-478(3)	478-480(3)	486(1)	465-506(4)	490-494(3)	
CNM-MG 639	>2925van	GACGTGGACCTAAGAAG TATCAGCGGAGGAAGT	187	300-305(3)	300-305(2)	298(1)	312(1)	311(1)	
CNM-MG 644	>3899van	CTGAACCAGGATAAGGG TGATGATACGTGGGAAGA	91	275-281(2)	269-276(4)	283(1)	277-289(3)	267(1)	
CNM-MG 645	>3925van	AGCGAAAGTCGTCCCTAG TCATGCTCAGCGTGCC	97	98(1)	98(1)	98(1)	98(1)	98(1)	
CNM-MG 650			ns	204(1)	204(1)	204(1)	204(1)	204(1)	
CNM-MG 652	>4045van	AATGACCTGCTCCTTGTGA CGTGCGTGTTCCGGCTAC	206	474-487(2)	474-487(3)	484-495(3)	471-478(2)	469-477(2)	
CNM-MG 656	>4098van	GCGGTGCTGCATCATCAAAA CGCTTCAAGGGCCAGTATCTT	158	289-304(2)	289-304(3)	286-291(3)	267-301(4)	267-265(4)	
CNM-MG 657	>4108van	AATTTCTCCGCAGAAGGTGC GAGGAAGCCCAAGGGTATTG	212	349-370(2)	349-370(3)	344-350(4)	324-359(4)	323-332(4)	

CNM-MG 658	>4111van	CATGCGGCCAGTAGTTTCAT GCATAACGACGCTGGTGAAT	155	271-313(4)	300-318(3)	287-292(2)	284-287(2)	274-284(3)	
CNM-MG 662	>4145van	TAAACAGGGCGCAGTTCGAG AAGCAGCGTTCCTTGTGAG	112	361(1)	361(1)	357-364(4)	361-363(2)	353(1)	
CNM-MG 664	>4175van	CATCCATCGCATCCGTATTA GATCCCAGGTCTTGGAACCC	188				677-706(2)	650-692(3)	
CNM-MG 667	>4230van	CTGGTGCTGTTGACAAGGC GGTGTAAACGAGCTGGGCAT	192	390-395(2)		370-390(2)	384-390(2)	383-415(4)	396-416(2)
CNM-MG 668	>4247van	GCAGAACGACGCTGGTGAAT CCTGATGTCTCCGCAGATGG	178	321-366(4)	364-373(2)	338-344(3)	342-348(2)	321-341(3)	375(1)
CNM-MG 669	>4252van	CCACCGTCCCAGGGTAAAGA ACCAACGACACCAACGCAGA	202			680(1)	671-688(4)	601-704(3)	
CNM-MG 670	>4260van	CAGAGCAAGCGGTACTCCAC GAACCAAGCGACGAAGCAGA	223					185(1)	
CNM-MG 673	>4315van	CGTACTCATCGGAGACGAGAT ACCGTACTGTAAGAACAAGCC	168	146(1)	146(1)	146(1)	146(1)	146(1)	146(1)
CNM-MG 674	>4350van	TGACAAAATGCTCGGCCCAA GCACCTCACCGCTTCTCTCG	230				599-691(3)	672-692(4)	661-706(3)
CNM-MG 675	>4366van	TACGACCAAATCCTGACACTAA GAACAAAGATGGCACGATAA	287				600-608(3)	489-513(3)	519-524(2)
CNM-MG 677	>4378van	CGCCACAGTGGTCGGATTTT CCTGATGGTGGGGTTGGATG	196	335-345(2)	335-346(3)	349-351(2)	352-373(4)	351-361(3)	
CNM-MG 679	>4398van	GTTGGTGAGGCGGATTGAGA GTTATGGTTCAGCCAAGAGG	216	348-372(2)	348-372(3)	353-358(3)	290-358(3)	334-372(3)	
CNM-MG 681	>4411van	GAGCCTTTCATTTCTCCTTTAT ACATCATCTCCGTGTCTGGT	251				236(1)	682-691(2)	692(1)
CNM-MG 682	>4432van	ACCAGCAAAGAAGCAGAAGG ATGGCTGATTCAGTGGTGAG	342				675-687(2)	675-689(2)	692-710(4)
CNM-MG 689	>4511van	TCGGCCTCAAGAACTATGAC TTCTCCTTAGCCTCGTCAAT	133				131(1)		174(1)
CNM-MG 690	>4641van	TGGGAATGGTAGTTCGCAGGAA GTGCCGCCACCCAGTTCTT	154	262-266(2)	262-266(2)	266(1)	268(1)	269-280(3)	345-377(2)
CNM-MG 695	>4735van	CATCGCATCCGTATTACCCT GTCTTGAACCCTCACCA	176				693-735(3)	666-710(3)	407(1)

CNM-MG 699	>4760van	CAAGCACTCGATGAACCCTT GTCCAGCTTCTCCATCTCCT	198	359-366(3)	363-402(2)	350-385(4)	356-363(2)	356-363(2)	385-443(2)
CNM-MG 700	>4820van	TCACCAAGAAACCCGCACCC GATCGCTGACGCTGAACACG	154	475(1)	474(1)	460-475(2)	350-525(4)	350-509(4)	269-509(4)
CNM-MG 701	>4830van	CGGCAAATGGTCCCTAGATG GGAAACGCTTGGCAGCATAA	125	198-241(2)	202-241(2)	240(1)	241-247(2)	249(1)	246-254(2)
CNM-MG 704	>4864van	TATCCGTCACAGCGTCCACA GACCCAGAAGAAGTACAAGG	151			488-492(2)	492-494(2)	465-474(2)	482-491(2)
CNM-MG 712	>4945van	TTGGCGTGGAAAGTTTCTCAT CAAACACCGCAAGCACCCCTG	142	260(1)	260(1)	258-270(3)	265(1)	263(1)	225-254(2)
CNM-MG 716	>4995van	AACAAGAGGGAATTATGGATTG GTGCGTGATGGATGGACTTA	265				546(1)	527-532(2)	445-478(4)
CNM-MG 717	>5002van	GAAGGTGGTCTTGAGGAGCA AGATATCCGTCACAGCGTCC	92	436-444(4)	445(1)	435-444(3)			427-445(3)
CNM-MG 720	>5035van	CAGGAAGTCAGAAGTAGAGTA CATCAGGATTCTATTCAAGTT	182	183(1)	183(1)	183(1)	183(1)	183(1)	183(1)
CNM-MG 723	>5042van	ATGTCGGGAGGATTAAGTGT ATGGGATCAGTCACCACAAG	383	376(1)	376(1)		726(1)	713-726(2)	475-712(2)
CNM-MG 726	>5078van	ACCTGGTAGGCAACAAGGGA GCCTCGGTAACATTGTGAAG	173	492(1)	491-493(2)		491-502(3)	494-526(3)	176(1)
CNM-MG 727	>5080van	TGTTCCAGTACGGTTCCTA CACAAGACTTCCGCATTAA	110	92(1)	92(1)	92(1)	92(1)	92(1)	91(1)
CNM-MG 729	>5101van	CATCAGCAGACATGCAGGGA TCCAGATCGGCCTCAAGAAC	184			164(1)			
CNM-MG 732	>5132van	TACGACCAAATCCTGACACTAA CCAAACAGCCTAACTCTGCC	166	148(1)	148(1)	148(1)	148(1)	148(1)	148(1)
CNM-MG 738	>5173van	AACAACCTGGTGCTGTTCTCGA ACTTGGTGGTCTGGTGTA	211	446(1)	446(1)	417-447(3)	435-490(3)	458-495(3)	417-444(2)
CNM-MG 740	>5181van	CTAAACAGCCCTCCAAGCAG AACTTGTCACGGACCTTCC	100	85(1)	85(1)	85(1)	85(1)	85(1)	
CNM-MG 742	>5212van	CATGACATGCTGGCTTGGGTC CTTGAAGGCTGCTTGGAGTG	198	354-367(3)	357(1)	357(1)	364(1)	341(1)	341-384(3)
CNM-MG 746	>5248van	AGAAGGGTTGCTTCCAGAT AGGGTGGACAAATCAACATG	235	214(1)	214(1)	214(1)	215(1)	216(1)	217(1)

CNM-MG 747	>5262van	AACTTGCAGGCAATGTGAGC CTTCCGACTCGAAGAACGAC	158	138(1)	138(1)	138(1)	138(1)	138(1)	138(1)
CNM-MG 748	>5266van	GCGGGTATGGCCTTCTGATC GTTTCGAGCTTGGTCGTCCTG	164						191-201(2)
CNM-MG 750	>5290van	TACGACCAAATCCTGACACTAA CCAAACAGCCTAACTCTGCC	166	149(1)	149(1)	149(1)	149(1)	149(1)	149(1)
CNM-MG 754	>5296van	GTCCTGCACATGACGATGCT GGCTGCTGCGAGACAAGTAA	212						278-373(3)
CNM-MG 755			NS	339-353(2)	341-365(4)	333-339(2)	338-343(2)	320-339(2)	371-384(2)
CNM-MG 757	>5324van	AACTGCCCGAAATGCGACAA TCATGCTCAGCGTGGCTTCC	134	148(1)	150(1)	144(1)			151(1)
CNM-MG 759	>5336van	CAGTGCTCCTCCCTTCGTAA CAGTTCACCCGTATCCTTCA	267				250-281(3)	250-281(3)	
CNM-MG 760	>5355van	CACGGTCATGGCCGTATCGG GTGTTGGGCTTGGCGTGAA	152	530(1)	529-543(2)	532-543(2)	539-547(2)	537-540(2)	483-596(3)
CNM-MG 761	>5363van	GACCGCTTCGTCAAAGTAAA TGAAACCATTAGGGAGCATG	148	410(1)	409(1)	397-405(2)	408(1)	397-406(3)	369-403(3)
CNM-MG 762	>5366van	AATGGCAATTCAACCACTTA TATCAATACCCTTGGGCTTC	125	384(1)	384(1)	366-379(3)	380-393(3)	375(1)	375-379(2)
CNM-MG 763	>5382van	GTGTCTGGGAGCTGGAGTGG GGACGGGTGCCCTGTAGGTT	176	430-447(3)	429-464(3)	403-409(2)	593-619(3)	569-590(3)	491-700(4)
CNM-MG 764	>5401van	TCTGTGGAATTCTACCCCAAG GAAGCACTGACGGCACATCA	115		151(1)	147(1)	142-155(3)	148-361(3)	127-362(3)
CNM-MG 766	>5410van	GTCTTGAACCCCTACCACA CATCGCATCCGTATTACCCT	195				697(1)	637-686(3)	403(1)
CNM-MG 767	>5520van	CTTGACATTCTCGTCCTTGC TCCTGGCGTGACCTCCTCT	194	173(1)	173(1)	173(1)	173(1)	173(1)	173(1)
CNM-MG 770	>6165van	GAAGCCAGGTATGGTTGTCA GCTTCAGATCCTTACCAGAC	168	149(1)	149(1)	149(1)	149(1)	149(1)	149(1)
CNM-MG 772	>6181van	CTACCATTTCTCGTCCATA CTCTGATGACGGCTACCTTA	180	297-300(2)	295-297(2)	282-294(2)	301-316(2)	294-352(4)	283-292(2)
CNM-MG 775	>6363van	GGAGTTGTGAAGTCAGGGTT AACAGCAAAGGCAGTCAAGG	238				170(1)	170(1)	158(1)

CNM-MG 776			NS			585-612(2)	512-582(2)	516-573(3)	585(1)
CNM-MG 778	>6658van	GAGACCTCTGCCAAGACCCG CAATCCTAACCTTCCCACGA	100	330-332(2)	330(1)	380-387(2)	340-351(4)	353(1)	266-531(3)
CNM-MG 779	>6662van	TGAAGAGGTCCAGGGCAAGA ATGTGCTGGGCATAGGCAGT	213			592-597(2)		588-608(3)	589-612(2)
CNM-MG 780	>6823van	AGGCTGGCTGACCTGATGGA GCGAAGATTGCGAATACAAA	123	514-516(2)	510-531(2)	479-485(3)	517-521(2)	505-519(3)	484(1)
CNM-MG 781	>6975van	TCCACGGTTACGTCCTTGTC CAGCCTTCCACATCTCAGCA	198	386-394(2)	385-387(2)	388(1)	389(1)	394-396(2)	389(1)
CNM-MG 782	>7060van	ATTGATGAAGCTGACCGGATTT TCTAGGCCCTCTACCGTTGC	209	368-371(2)	370-380(2)	367-373(3)	377-410(2)	375-378(2)	497(1)
CNM-MG 783	>7197van	ACCGAAAGATTTCTGACCAT TCAGTGTGGCTTGATGCTC	270			579-594(3)	599(1)		557-589(2)
CNM-MG 784	>7297van	CAAGGGAGTTTGGTTGGGAGA GAATGTCTGGGTAGCGTGGG	264	562-636(2)		549(1)	564-574(2)	546(1)	445-516(3)
CNM-MG 785	>7435van	GTCCTCAATCGCAGAAACAA TGGAAATCATTGAGGGCAA	200	200(1)	201(1)		201(1)	201(1)	
CNM-MG 786	>7488van	AGACCAGGGCTTGTTGTGCG GTTGGGTGCTGAGAATAGTG	226			639(1)	607-616(1)	597(1)	638(1)
CNM-MG 787	>7515van	TAATCTGCCTACAGCCAGT CTGGTCGATATTGCAAAGTC	175			662-678(2)	654(1)	659(1)	659-674(2)
CNM-MG 789	>7536van	AGAAGCATTGCCGTTAGCCT GCACTGATGCCAAGAAGCCA	152			397(1)	375-403(3)	373-402(2)	453-467(2)
CNM-MG 790	>7561van	GACAAATGCTCGGCCCAAAT TCACCGCTTTCCTCGGCTAC	205			593-664(4)	649-666(3)	643-680(3)	228-660(4)
CNM-MG 791	>7570van	TGAGAATGACCGTGGTGTATC TTGGTGCTGAGAACAGAGTG	161	403-408(2)	413(1)	402-418(4)	394-403(2)	394-414(3)	319(1)

Resultados de la presente investigación. Elaborado por F. Pérez y J. Ortiz.

Anexo 5. Homologación de marcadores intrónicos de *L. vannamei* con proteínas conocidas.

PRIMER	PROTEIN ACCESSION	FUNCTION	PROBABILITY	SCORE	SPECIES
CNM-MG620	AAR01298.1	Factor de elongación 2	2×10^{-59}	229	<i>Libinia marginata</i>
CNM-MG622	AAL62465.1	Proteína 60S acidic ribosomal	2×10^{-55}	199	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG624	CAA58023.1	Proteína ribosomal L7a	1×10^{-11}	70.1	<i>Drosophila melanogaster</i>
CNM-MG630	BAC41415.1	Proteína mKIAA0320	3×10^{-70}	267	<i>Mus musculus</i>
CNM-MG631	XP_320350.1	ENSANGP00000009134	5×10^{-31}	137	<i>Anopheles gambiae</i>
CNM-MG633	AAM28646.1	Precursor dihydrolipoamideacetyl transferase	3×10^{-50}	198	<i>Xenopus laevis</i>
CNM-MG639	[NP_003163.1	Proteína surfeit1;surfeitlocus	2×10^{-33}	144	<i>Homo sapiens</i>
CNM-MG644	[NP_611468.1	CG9090-PA	9×10^{-32}	137	<i>Drosophila melanogaster</i>
CNM-MG645	BAC41415.1	Proteína mKIAA0320	3×10^{-70}	267	<i>Mus musculus</i>
CNM-MG650	AAL62465.1	Proteína Ribosomal 60S	7×10^{-51}	201	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG652	AAK52067.1	Qmprotein	9×10^{-94}	344	<i>Heliothis virescens</i>
CNM-MG656	AAK92167.1	Proteína ribosomal L32	1×10^{-37}	156	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG657	AAK92167.1	Proteína ribosomal L32	3×10^{-39}	162	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG658	[NP_079863.1	Proteína ribosomal S21	2×10^{-29}	129	<i>Mus musculus</i>
CNM-MG662	[NP_080675.1	RIKEN cDNA1500041N16	2×10^{-27}	102	<i>Mus musculus</i>
CNM-MG667	XP_394568.1	Proteína Ribosomal S25	3×10^{-21}	102	<i>Apis mellifera</i>
CNM-MG668	AAP21828.1	Proteína ribosomal S21	2×10^{-31}	136	<i>Branchiostoma belcheri singtaunese</i>
CNM-MG673	O61231 RL10_DROME	Proteína ribosomal S10 L10 (Qmprotein)	6×10^{-68}	257	<i>Drosophila melanogaster</i>
CNM-MG677	AAB27066.1	ADP-ribosylation factor1;ARF1	4×10^{-83}	308	<i>Drosophila melanogaster</i>
CNM-MG679	AAK92167.1	Proteína ribosomal S32	5×10^{-49}	194	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG690	AAN05607.1	Proteína ribosomal 7a	1×10^{-16}	87	<i>Argopecten irradians</i>
CNM-MG699	[NP_001976.1	electron-transfer-flavo protein,;	2×10^{-44}	158	<i>Homo sapiens</i>
CNM-MG700	AAN05607.1	Proteína ribosomal 7a	3×10^{-21}	69.7	<i>Argopecten irradians</i>

CNM-MG701	[ref NP_033121.1	Proteína ribosomal S5	1x10-51	204	<i>Mus musculus</i>
CNM-MG712	AAP14951.1	Proteína ribosomal 27a	5x10-51	201	<i>Branchiostoma belcheritsingtaunese</i>
CNM-MG717	AAL62472.1	Proteína ribosomal S8	3x10-14	79	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG720	AAL09707.1	Proteína ribosomal 30	5x10-28	124	<i>Branchiostom abelcheri</i>
CNM-MG723	BAB78527.1	ribosome-associatedproteinP40	7x10-46	185	<i>Bombyx mori</i>
CNM-MG726	AAC61597.1	F1F0-typeATPsynthasesubunitg	2x10-22	105	<i>Homo sapiens</i>
CNM-MG727	AAN52382.1	Proteína ribosomal l39	2x10-14	79.7	<i>Branchiostoma belcheri</i>
CNM-MG732	AAK92191.1	Proteína ribosomal s23	7x10-74	277	<i>Spodopterafrugiperda</i>
CNM-MG738	AAH59695.1	Zgc:73391protein	3x10-28	125	<i>Daniorerio</i>
CNM-MG740	CAG02850.1	Unnamed protein product	5x10-28	124	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
CNM-MG742	[NP_998805.1	Microtubule - associated protein,RP/EB	1x10-46	187	<i>Danio rerio</i>
CNM-MG746	BAC56488.1	Similar to acidic ribosomal phosphoprotein PO	3x10-39	162	<i>Bostaurus</i>
CNM-MG747	AAC03149.1	Factor de elongación 1 α	2x10-47	189	<i>Libinia marginata</i>
CNM-MG750	AAK92191.1	Proteína ribosomal S23	3x10-75	281	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG755	AAP21828.1	Proteína ribosomal S21	7x10-32	137	<i>Branchiostoma belcheritsingtaunese</i>
CNM-MG757	AAN73075.1	cysteine-richintestinal protein	3x10-32	139	<i>Hirudo medicinalis</i>
CNM-MG760	AAK92158.1	Ribosomal proteinL27A	5x10-41	165	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG761	AAK92167.1	Ribosomal protein L32	3x10-23	108	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG763	[NP_035016.1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 α subcomplex, 4.	2x10-12	73.9	<i>Mus musculus</i>
CNM-MG767	BAD12426.1	Fructose 1,6-bisphosphatealdolase	9x10-46	183	<i>Antheraeayamamai</i>
CNM-MG770	AAC03149.1	Factor de elongación 1 α	7x10-66	250	<i>Libinia marginata</i>
CNM-MG772	AAF13315.1	Translation initiation factor 5A	1x10-32	142	<i>Spodoptera exigua</i>
CNM-MG778	AAC83399.1	P 21ras-like protein	6x10-22	105	<i>Artemia sp.</i>
CNM-MG780	AG8 A	Chain A, Aldehyde Dehydrogenase From Bovine Mitochondria	7x10-53	207	

CNM-MG781	Q9VND8 RHEB_DRO ME	GTP-binding protein Rhebhomolog	9x10 ⁻³⁵	148	<i>Drosophila melanogaster</i>
CNM-MG782	Q9NVP1 DD18_HUMA N	ATP-dependent RNAhelicaseDDX18(DEAD-boxprotein18)(Myc-regulat	1x10 ⁻⁸³	310	<i>Homosapiens</i>
CNM-MG784	AAF15900.1	Thioredoxin reductase	2x10 ⁻⁵³	209	<i>Homosapiens</i>
CNM-MG785	AAH19268.2	HRMT1L2 protein	1x10 ⁻⁴¹	172	<i>Homosapiens</i>
CNM-MG791	AAH62033.1	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	1x10 ⁻⁷⁹	286	<i>Rattus norvegicus</i>

Resultados de la presente investigación. Elaborado por F. Pérez y J. Ortiz.