

Programa de Estudios de Posgrado

**IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y HERENCIA DE
MICROSATÉLITES Y SU APLICACIÓN COMO
MARCADORES MOLECULARES EN UN PROGRAMA DE
MEJORAMIENTO DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus*
*vannamei***

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

p r e s e n t a

Pedro Cruz Hernández

La Paz, B.C.S. Octubre de 2003.

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:30 horas del día 13 del Mes de octubre de 2003, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

**IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y HERENCIA DE
MICROSATÉLITES Y SU APLICACIÓN COMO MARCADORES
MOLECULARES EN UN PROGRAMA DE MEJORAMIENTO DE
CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei***

Presentada por el alumno:

Pedro Cruz Hernández

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO,
MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES
CON ORIENTACIÓN EN **Acuacultura**

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

LA COMISION REVISORA

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz
Co-Director de tesis

Dr. Ricardo Pérez Enríquez
Co-Director de tesis

Dr. Patrick Gaffney
Co-tutor

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Co-tutor

Dr. Humberto Villareal Colmenares
Co-tutor

DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Dedicatoria

A mis grandes familias (los Cruz y los Hernández).

A mis padres Martha Hernández y Luis Rogelio Cruz, por el amor y educación recibida. Estoy orgulloso de Ustedes.

A mis hermanos, Martha, Luis, Jorge y Cristina, por aguantarme tanto tiempo como el hermano mayor y por aceptarme como su amigo.

A mis amigos y amigas de toda la vida.

Prefacio

La presente tesis está basada en los siguientes artículos

1. Cruz, P., Mejia-Ruiz, C.H., Perez-Enriquez, R., Ibarra, A.M. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Molecular Ecology Notes* 2, 239-241.
2. Cruz, P., Ibarra, A.M., Mejia-Ruiz, H., Gaffney, P.M., Perez-Enriquez, R. Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Marine Biotechnology* (en prensa).

La información generada se presentó en los siguientes congresos internacionales

1. Cruz, P., Perez-Enriquez, R., Mejia-Ruiz, H., Ibarra, A.M. 2003. Isolation and characterization of microsatellites in a *SAU3AI* partial genomic library in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. International Conference Plant and Animal Genome XI. January 11-15, 2003. Sand Diego CA.
2. Cruz, P., Ibarra, A.M., Perez-Enriquez, R. 2003. Genetic variability in a breeding program of *Litopenaeus vannamei*, assessed by microsatellites. International Congress of the World Aquaculture Society 2003, May 19-23, 2003. Salvador, Brasil.

Conformación de comité

La presente tesis fue dirigida por:

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz	Biotecnología y Biología molecular. CIBNOR
Dr. Ricardo Pérez Enríquez	Genética Acuícola. CIBNOR

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Patrick Gaffney	Ciencias Marinas. Universidad de Delaware
Dra. Ana María Ibarra Humphries	Genética Acuícola. CIBNOR
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz	Biotecnología y Biología molecular, CIBNOR
Dr. Ricardo Pérez Enríquez	Genética Acuícola. CIBNOR
Dra. Elizabeth Ponce Rivas	CICESE

El comité de tesis y sinodales estuvo integrado por:

Dr. Patrick Gaffney	Ciencias Marinas. Universidad de Delaware
Dra. Ana María Ibarra Humphries	Genética Acuícola. CIBNOR
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz	Biotecnología y Biología molecular, CIBNOR
Dr. Ricardo Pérez Enríquez	Genética Acuícola. CIBNOR
Dr. Humberto Villareal Colmenares	Acuicultura. CIBNOR

Agradecimientos

A toda la gente en el **CIBNOR** que hace que la maquinaria siga adelante, dirección, administración, servicios, biblioteca, mantenimiento, informática, redes, laboratorios, etc. A la gente de posgrado (de antes y de ahora), que han hecho un buen trabajo y puedo decirles que estoy orgulloso de sacar mi doctorado en México, suerte en las mejoras que se requieren y firmeza en los logros alcanzados. Dr. Sergio Hernández, Dra. Thelma Castellanos, Osvelia, Lety, Lupita, Bety, Horacio, Manuel. A mis maestros en los cursos de posgrado, la escuelita que muchos no quieren en un posgrado y yo creo que vale la pena seguirla, a mi me sirvió bastante y por eso confió en que la podrán mejorar. Todas las contribuciones de la gente en mi examen de admisión (Dr. Nolasco, Dra. Hernandez-Saavedra, Dr. Lopez-Cortez, Dr. Ascencio, Dra. Arredondo) y examen predoctoral (Dr. Estrella, Dr. Villareal, Dr. Pérez, Dr. Mejía, Dra. Castellanos). Gracias por el apoyo recibido en la parte experimental molecular, sin ustedes aun no conocería el ADN: Claudia, Humberto, Soledad, Norma Hdez., la Chula, Sandra, Tali, Paty, Gris, Susana, Gaby, Tasha. A la gente de mejoramiento genético, que para sacar el ADN antes necesitaba al camarón: Ana María, Juan José Luis, Juan Gabriel, Juan Macliz, Juan Basilio, Juan Hilario, Juan güero, Juan Marcos, Juana Fabiola, Juan Carlos Ivan, Juan Victor Polo. A mis compañeros del laboratorio de Genética Acuícola: Gabriel, Macliz, Minerva, Gaby M., la otra Gaby, Ricardo, Rubén, José Luis G., Noé, Francisco, Fabiola, Carlos, Estela, Ernesto y en especial a José Luis Ramírez y Susana Ávila que son los pilares del laboratorio (y amigos de por vida)...ahhh y aprovechando el viaje pues al compadre Juan Carlos, a la ahijada Victoria y a la pequeña Isabel. A mis compañeritos de la UABCS (y familias *in crescendo*) que nos estamos dando la oportunidad de contarnos las canas, las arrugas, la caída del pelo, los kilos de mas, los críos en crecimiento, y pues ojalá nos sigamos viendo las caras para decirnos lo viejos que estamos....Chava y Tere (Chavita, Rodrigo, Jesús), Chucho e Irma (Chuchito, Manuel, Memo), Juan Pedro y Caro (Christine), Edgar, Pablo, Marcelo, Armando, José Luis, Paty y Silvia. A la familia Lluch-Cota por brindarme siempre su casa. A George Lucas por generar por mas de 20 años en que malgastar mi dinero y divertirme. Toda la palomilla de la Unidad de Patología, que buen equipo (y pachangas) hicimos, que buenos pasteles en el mezanine (o como se escriba) y que ojalá nos sigamos la pista: Valerie, Meliza, Tania (colada) Hever, Alicia, Adrián, Mary Esther, Ric, Martín, Norma, O. Jaime, Norma H., Arturo, Delia, Reina, Nacho, Gaby, Rogelio, Jesús, Felipe, la Chula, Flor, Estrellita (colada), Toño, Roberto Carlos, Angel, Gabriel, Lili, Claudia, Nadia, Daniel, Celia, Vania, Alberto, Ceseña, Poncho, Lupita, Erick, Amauri. Yo se que de ustedes habrá amistades de por vida. Gracias a la gente de APSA, a Filiberto de Maricultura, al equipo de la Dra. Lupita Espín del IBT, al equipo del Dr. Bernie May en UC Davis en especial a Tasha. A mi comité tutorial (Dr. Gaffney, Dr. Villareal, Dra. Ponce, Dra. Ibarra, Dr. Mejía, Dr. Pérez) en especial a Pat, Ana M. y Ric por sus acertadas sugerencias en los artículos. Ana María, por el apoyo económico y asesoría para la realización de este trabajo, por la guía constante y por seguir influyendo positivamente en mi formación. Me siento orgulloso de formar parte de tu equipo.....Maestra. A mis directores de tesis (Dr. Mejía-SIMAC 980106079, Dr. Pérez-CONACYT 33496-V) por darme la libertad de hacer y deshacer, que aunque fue largo el camino la experiencia ha valido la pena. Ricardo gracias por ser un buen amigo y un excelente crítico. Humberto gracias por la amistad, serenidad y orientación en el mundo del ADN. Todo el apoyo de CONACYT (beca 84027). Gracias mamá, papá, hermanos, toda la familia por mantenernos unidos. A Dios mil Gracias. A mi país, México, que es mi gente, mi familia, que son ustedes y que por eso queremos que sea mejor cada día. Te agradezco por mi educación (gratuita) y espero retribuir siendo un buen mexicano que actúe con honestidad y amor a la Patria. De aquí nadie me mueve....y si muero lejos de ti...

Índice

Acta de Revisión de Tesis.....	i
Dedicatoria.....	ii
Prefacio.....	iii
Conformación de comité.....	iv
Agradecimientos.....	v
Índice.....	vi
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tablas.....	xiii
Glosario.....	xiv
Resumen.....	1
Abstract.....	4
Introducción general.....	7
Justificación.....	10
Objetivo general.....	11
Hipótesis general.....	11
Capítulo I. Identificación y caracterización de marcadores moleculares tipo microsatélites en el genoma del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	
I.1 Introducción.....	12
I.2 Objetivos específicos.....	16
I.3 Materiales y Métodos.....	17
I.3.1 Colecta y preservación de tejidos.....	17
I.3.2 Extracción de ADN genómico.....	17
I.3.3 Estrategias para la identificación de microsatélites.....	18
I.3.3.1 Estandarización a partir de microsatélites previamente reportados.....	18
I.3.3.2 A partir de RAPDs.....	18

I.3.3.3 A partir de una genoteca parcial con Sau3A1.....	19
I.3.3.3.1 Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	19
I.3.3.3.2 Ligación de las digestiones en un vector plasmídico.....	19
I.3.3.3.3 Transformación de células competentes con los vectores.....	21
I.3.3.3.4 Secuenciación del inserto de ADN de camarón.....	21
I.3.4 Análisis de secuencias y diseño de iniciadores.....	22
I.3.5 Estandarización de amplificaciones de ADN mediante <i>PCR</i>	23
I.4 Resultados.....	25
I.4.1 Estrategias para la identificación de microsatélites.....	25
I.4.1.1 A partir de microsatélites previamente reportados.....	25
I.4.1.2 A partir de una genoteca parcial con Sau3A1.....	25
I.4.1.2.1 Estrategia A. Secuenciado directo de clonas.....	27
I.4.1.2.2 Estrategia B. Secuenciado de clonas positivas.....	27
I.4.2 Análisis de secuencias y diseño de iniciadores.....	31
I.4.3 Estandarización de amplificaciones de ADN mediante <i>PCR</i>	33
I.5 Discusión.....	37
I.5.1 Éxito en la identificación de microsatélites.....	37
I.5.2 Composición, abundancia y distribución de los microsatélites.....	40
I.5.3 Elevada presencia del microsatélite (CCTAA) _n	42
I.5.4 Identificación de una región minisatélite.....	43
I.5.5 Perspectivas para el uso de los microsatélites.....	44
I.6 Conclusiones.....	45
I.7 Recomendaciones.....	46

Capítulo II Optimización de la amplificación por *PCR* y determinación de la herencia mendeliana de los microsatélites *Pvan1758* y *Pvan1815*

II.1 Introducción.....	48
II.2 Objetivos particulares.....	52
II.3 Materiales y Métodos.....	53
II.3.1 Optimización de las amplificaciones de los microsatélites.....	53

II.3.2 Análisis de la herencia mendeliana de los loci-microsatélites.....	54
II.4 Resultados.....	55
II.4.1 Amplificación de los microsatélites.....	55
II.4.2 Herencia mendeliana de los loci microsatélites.....	58
II.5 Discusión.....	60
II.5.1 Tendencia hacia alelos nulos en el locus <i>Pvan1815</i>	60
II.5.2 Herencia mendeliana.....	61
II.6 Conclusiones.....	63
II.7 Recomendaciones.....	64
 Capítulo III. Monitoreo de variabilidad genética en tres generaciones de un programa de mejoramiento genético de <i>Litopenaeus vannamei</i>	
III.1 Introducción.....	65
III.2 Objetivos particulares.....	67
III.3 Materiales y Métodos.....	68
III.3.1 Colecta de muestras y establecimiento de generaciones.....	68
III.3.2 Amplificación de los microsatélites.....	70
III.3.3 Análisis de variabilidad genética.....	70
III.4 Resultados.....	72
III.4.1 Heterocigosidad.....	72
III.4.2 Número de alelos.....	73
III.4.3 Heterogeneidad para frecuencias alélicas.....	74
III.5 Discusión.....	76
III.5.1 Variabilidad genética: Heterocigosidad y número de alelos.....	76
III.5.2 Diferencias en frecuencias alélicas entre generaciones.....	79
III.6 Conclusiones.....	82
III.7 Recomendaciones.....	83
 <i>Perspectivas generales del trabajo</i>	85
1. <i>Identificación de microsatélites</i>	85

2. Análisis de variabilidad genética en poblaciones naturales.....	85
3. Análisis de variabilidad genética en programas de cultivo y de mejoramiento genético.....	86
4. Genotipificación y seguimiento de pedigríes.....	87
5. Mapeo genético.....	88
6. Asociación de los marcadores genéticos con características productivas (QTLs).....	89
Referencias	92

Apéndices

I	Protocolo de extracción de ADN de camarón.....	99
II	Reacción de PCR para amplificar RAPDs (Polimorfismos amplificados al Azar).....	101
III	Protocolo para la digestión parcial del ADN con la enzima de restricción Sau3A1.....	102
IV	Purificación de ADN plasmídico (Minipreps).....	103
V	Digestión con BamHI y Defosforilación del vector para ligación.....	105
VI	Ligación de las digestiones en un vector plasmídico.....	106
VII	Preparación de células competentes y transformación	107
VIII	Estimación rápida del tamaño del inserto en clonas bacterianas mediante PCR.....	109
IX	Marcaje de sondas con biotina con primers aleatorios.....	111
X	Transferencia de ADN de clonas bacterianas a membrana de nylon.....	112
XI	Hibridación con sondas biotiniladas visualizando por quimioluminiscencia.....	113
XII	Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6 % y urea 7.5 M	115
XIII	Visualización de microsatélites en geles de poliacrilamida mediante Sybr-Green.....	117
XIV	Visualización de microsatélites en geles de poliacrilamida mediante quimioluminiscencia.....	118
XV	Microsatélites previamente reportados al año 1999 que amplifican en <i>P. vannamei</i>	120
XVI	Microsatélites identificados a partir del secuenciado directo sin hibridar.....	121
XVII	Microsatélites identificados a partir de hibridaciones simultaneas con las sondas (CT) ₁₀ y (GT) ₁₀	123

<i>XVIII</i>	<i>Microsatélites y primers diseñados para estandarizar su amplificación.....</i>	<i>128</i>
<i>XIX</i>	<i>Microsatélites de gran tamaño en los que no fue posible diseñar primers adecuados</i>	<i>131</i>
<i>XX</i>	<i>Reacción de PCR para amplificar los microsatélites Pvan1758 y Pvan1815.....</i>	<i>132</i>

Lista de figuras

Capítulo I

Fig. I.1 Esquema general de la identificación de microsatélites a partir de librerías genómicas parciales.....	20
Fig. I.2 Estimación del tamaño de los fragmentos de ADN de camarón de la genoteca parcial con <i>Sau3A I</i> mediante la amplificación de 18 clonas tomadas al azar de la región comprendida entre los <i>iniciadores T3 y T7</i> del plásmido pKS II.....	27
Fig. I.3 Diferentes regiones microsatélites observadas en la estrategia B y su frecuencia clasificándolas en base al tamaño de la parte repetitiva y el número de repeticiones.....	29
Fig. I.4 Frecuencia de los diferentes microsatélites de acuerdo al tamaño de la repetición(di-, tri-, tetra- o penta-nucleótido) y el número de repeticiones.....	30
Fig. I.5 Perfección de las regiones microsatélites en <i>L. vannamei</i> en las estrategias A y B.....	31
Fig. I.6 Patrones electroforéticos en los 7 microsatélites amplificados en <i>L. Vannamei</i>	36
Fig. I.7 Esquema general de la identificación de microsatélites a partir de librerías genómicas parciales, puntualizando en las recomendaciones para <i>L. Vannamei</i>	47

Capítulo II

Fig. II.1 Diferencias en la amplificación del locus <i>Pvan1815</i> en función de la concentración de $MgCl_2$. SD: Productos sin desnaturalizar.....	56
Fig. II.2 Patrones de bandeo observados en el microsatélites <i>Pvan1758</i> y su correspondiente interpretación como genotipos.....	57
Fig. II.3 Patrones de bandeo observados en el microsatélites <i>Pvan1815</i> y su correspondiente interpretación como genotipos.....	58

Capítulo III

Fig. III.1 Diagrama descriptivo de las líneas familiares del programa de camarón blanco en el CIBNOR seguidas generacionalmente (G_0 , G_1 , G_2) en este estudio.....	69
Fig. III.2 Frecuencias alélicas para los dos loci-microsatélites a lo largo de las generaciones.....	75
Fig. III.3 Frecuencias alélicas para los dos loci-microsatélites en la segunda generación (G_2) y en una muestra de una línea colombiana.....	81

Lista de Tablas

Capítulo I

Tabla I.1 Estandarización de amplificaciones de microsatélites mediante <i>PCR</i>	23
Tabla I.2 Resumen de regiones microsatélite identificadas en <i>L. vannamei</i> en base a dos estrategias.....	28
Tabla I.3 Microsatélites obtenidos en el camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	35
Tabla I.4 Éxito en la identificación de Microsatélites para diferentes especies de peneidos.....	37

Capítulo II

Tabla II.1 Proporciones genotípicas en la progenie de diferentes cruzas en base a una segregación mendeliana considerando un diferente número de alelos presente en la familia.....	50
Tabla II.2 Frecuencias genotípicas de los microsatélites en las tres familias G_1 y los valores de chi-cuadrada para las proporciones mendelianas esperadas.....	59

Capítulo III

Tabla III.1 Variabilidad genética en las generaciones consecutivas (G_0 , G_1 y G_2) del programa de cultivo de camarón blanco.....	72
Tabla III.2 Análisis de heterogeneidad para comparaciones pareadas de heterocigosidad observada (H_o) y frecuencias alélicas entre generaciones consecutivas.....	73

Glosario

ADN (Ácido desoxirribonucleico). Base molecular de la herencia. Una molécula de *ADN* es un polímero de *desoxinucleótidos* ordenados en una doble hélice (dos hebras) de azúcares fosfatados con bases purinas y pirimidinas proyectándose al centro. Cada hebra se mantiene unida por enlaces fosfodiéster entre los carbonos 3' y 5' de nucleótidos adyacentes. De acuerdo al modelo de Watson y Crick, el *ADN* forma una doble hélice que es mantenida unida por enlaces de hidrógeno entre pares de bases (doble enlace entre timina y adenina y triple enlace entre citosina y guanina), por tanto cada hebra en la doble hélice es complementaria en su secuencia.

ADN genómico. *ADN* que incluye toda la secuencia de nucleótidos contenida en el genoma de un individuo. Término utilizado para referirse al *ADN* extraído mediante el uso de proteinasa K, detergentes (SDS) y solventes (fenol). Con este método se obtienen fragmentos de 100 a 150 kb adecuados para la producción de genotecas mediante una digestión previa con enzimas de restricción. A nivel práctico el *ADN* extraído incluirá el *ADN* nuclear (cromosomal) y *ADN* mitocondrial.

AFLPs (del inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*). Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos Amplificados. Técnica que utiliza el *PCR* para amplificar un subgrupo de fragmentos de *ADN* generados por digestión con *enzimas de restricción*. A los fragmentos resultantes de la digestión con dos *enzimas de restricción* se les ligan a sus extremos unos adaptadores de secuencia conocida, los cuales funcionan como sitio de *alineamiento* para unos *iniciadores* específicamente diseñados.

Alelo. Una de dos o más formas alternativas de un gen, cada uno con una secuencia de nucleótidos única. El término es usado también para denotar las variantes de los marcadores moleculares genéticos codominantes como los microsatélites.

Alelos, número de alelos (n_A). Estimador de la variabilidad genética en poblaciones, se determina para cada muestra poblacional.

Alelos, número efectivo de alelos (n_e). Número de alelos igualmente frecuentes en una población. Su definición parte de la asunción de que pueden presentarse similares niveles de homocigosidad con un diferente número de alelos, de aquí que se derive que el número efectivo de alelos estará dado por $n_e = 1/\text{homocigosidad}$.

Alineamiento de iniciadores. Etapa de la *PCR* inmediatamente después de la desnaturalización, en la cual se baja la temperatura para permitir que los dos iniciadores se unan a las secuencias flanqueantes del *ADN* por amplificar en cada una de las hebras.

La temperatura de alineamiento es calculada cuidadosamente para asegurar que los iniciadores se unan solamente a las secuencias de *ADN* deseadas. Estas temperaturas (normalmente de 40-60° C) estarán determinadas por la secuencia y el número de bases en los iniciadores.

Biotina. Vitamina o cofactor en diversas reacciones enzimáticas. En estudios de Biología molecular se utiliza para marcar el *ADN* ya sea por enlaces covalentes o por hibridación. La biotina puede ser incorporada directamente en el *ADN* mediante su polimerización con iniciadores biotinilados o por polimerización en presencia de *dNTPs* biotinilados. La biotina representa el primer paso para la visualización del *ADN* mediante *quimioluminiscencia*.

Célula competente. Células bacterianas que han sufrido cambios en su membrana haciéndolas susceptible a ser transformadas. Este estado transitorio se puede lograr al incubar a las células a bajas temperaturas con CaCl_2

Clonación de *ADN*. Técnica que permite que secuencias individuales de *ADN* en mezclas complejas sean aisladas y copiadas permitiendo su manipulación y análisis detallado. El *ADN* a clonar es recombinado con *ADN* de un vector e introducido en una célula hospedera donde será copiado.

Desfosforilación. Reacción química mediada por una fosfatasa en la que una molécula pierde un grupo fosfato. Específicamente para el caso de una secuencia de *ADN* la desfosforilación se da por la pérdida del grupo fosfato en el extremo 5' por la acción de la fosfatasa alcalina. Lo anterior evita que el *ADN* digerido se vuelva a religar, como el caso específico de los plásmidos linealizados.

Desequilibrio de ligamiento. Cuando los alelos de diferentes loci se encuentran ligados no existe una segregación independiente de los mismos, lo cual trae consigo que a nivel poblacional se observen genotipos comunes entre individuos. El caso extremo de desequilibrio de ligamiento ocurre cuando los loci se encuentran en el mismo cromosoma y muy cercanos por lo que la frecuencia de recombinación es muy baja. Sin embargo en poblaciones naturales adaptadas a un medio ambiente se pueden dar asociaciones entre alelos de diferentes loci en diferentes cromosomas debido a procesos de selección natural.

Desnaturalización del *ADN*. Separación de las dos hebras que constituyen al *ADN* por rompimiento de los enlaces de hidrógeno entre bases complementarias. El *ADN* se desnaturaliza a temperaturas superiores a 90° C. Primera etapa en la *PCR*

***dNTPs* (desoxinucleótidos).** Nucleótidos cuya pentosa es una desoxirribosa y por ende son los monómeros del ácido desoxirribonucleico (*ADN*)

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

Enzima de restricción. Enzimas de origen bacteriano que cortan moléculas de *ADN* extraño en sitios específicos de reconocimiento. Su nomenclatura se basa en una abreviatura de la bacteria donde fueron aisladas, seguida por una numeración romana que da el orden cronológico de su descubrimiento.

Extensión del *ADN*. Tercera etapa en la *PCR*. La temperatura es elevada a 72° C para permitir que una *ADN polimerasa* inicie la síntesis a partir del iniciador agregando *dNTPs* libres sobre la hebra que sirve de templado.

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

Genética cuantitativa. Rama de la *Genética* en la que se analizan las características fenotípicas que pueden ser medidas en una escala de manera continua, y que son determinadas por la acción aditiva de múltiples genes.

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

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

GenBank (*Banco génico o genómico*). Base de datos de libre acceso de secuencias nucleotídicas y polipeptídicas, administrada por el “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html

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

Genoteca. Colección de fragmentos de *ADN* de una determinada especie insertados al azar en vectores (tales como plásmidos o fagos lambda) y clonados en hospederos (ej. bacterias). La colección debe de ser lo suficientemente grande para incluir toda la secuencia nucleotídica del genoma.

Genoteca parcial o librería subgenómica. Colección incompleta de *ADN* de un determinado individuo la cual se origina al seleccionar fragmentos de *ADN* de un específico rango de tamaños.

Genotipo. La constitución genética de un organismo, que estará dada por la información heredada por ambos padres. Específicamente para un solo locus, el genotipo estará dado por los alelos heredados por ambos padres (ver *homocigoto*, *heterocigoto*).

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

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

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

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

Heteroduplex. ADN de doble hebra en el cual cada cadena tiene un origen diferente y por tanto no son completamente complementarias.

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

Iniciador (del inglés *Primer*). Oligonucleotido (alrededor de 20 pb) de una sola hebra que se alinea (homologa) para iniciar la replicación del ADN mediante una polimerasa. Se requieren dos *iniciadores* (uno para cada hebra de ADN), los cuales flanquearán la región por amplificar.

IPTG. Isopropiltiogalactosa. Estimula la actividad del operón bacteriano lac presente en los vectores plasmídicos.

Kit. Anglicismo para referirse a un juego o caja de accesorios con reactivos y ciertos materiales que se venden en conjunto y sirven para desarrollar técnicas específicas.

Librería genómica. Ver *Genoteca*

Ligamiento. Cuando dos alelos de diferentes genes tienden a pasar juntos de una generación a la otra. Únicamente los genes situados en el mismo cromosoma pueden mostrar ligamiento. El grado de ligamiento entre dos genes dependerá de la frecuencia de recombinación que ocurra entre ellos durante la meiosis, por tanto conforme los genes estén mas separados en el cromosoma la frecuencia de recombinación será mayor y por ende existirá un menor ligamiento.

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

Loci. Plural de *locus*

Mapa genético. Arreglo lineal de sitios mutables (polimórficos) sobre un cromosoma, deducidos de experimentos de recombinación genética. Implica un ordenamiento de marcadores y genes estableciendo distancias genéticas entre los mismos.

Marcador molecular. Genes, proteínas o fragmentos de *ADN* polimórficos que permiten distinguir entre individuos, familias, poblaciones o especies.

MAS. (del inglés **Marker Assisted Selection**). Selección asistida por marcadores. Estrategia para auxiliar en el mejoramiento genético seleccionando a los reproductores o progenies en los primeros estadios de crecimiento en base a un marcador molecular que este relacionado con un mayor desempeño. En estos casos se eliminarán los organismos que porten marcadores que actúen en detrimento de la producción (los mas pequeños, los menos resistentes), la ventaja del *MAS* comparado con el mejoramiento tradicional es que no será necesario crecer a los organismos para darse cuenta de si tienen buen o mal desempeño sino desde un principio con un análisis de *ADN* serán seleccionados.

Mendel, leyes de. **1. Ley de la segregación.** Los factores de un par de caracteres son segregados. En términos modernos, se refiere a la separación de los dos alelos de un individuo diploide en diferentes gametos y por ende segregación en la progenie. **2. Ley de la distribución independiente.** Los miembros de diferentes pares de factores se distribuyen independientemente.

Microsatélite. Regiones de *ADN* con secuencias cortas de una a seis pares de bases (pb) repetidas en tandem, es decir la misma secuencia una tras otra, llegando a medir toda la región hasta 100 pb. Se analizan mediante amplificaciones por *PCR*, para lo cual es necesario diseñar *iniciadores* flanqueantes, lo cual representa una identificación previa del microsatélite en la especie en cuestión implicando un proceso de *clonación* y *secuenciado*. También son conocidos como *SSRs* (del inglés *Simple Sequence Repeats*), *STRs* (del inglés *Short Tandem Repeats*) ó *VNTRs* (del inglés *Variable Number Tandem Repeats*), esté último término incluyendo a los minisatélites.

Miniprep. Método de extracción de *ADN* plasmídico que se basa en una lisis alcalina del *ADN* cromosomal bacteriano

Minisatélite. Los minisatélites son secuencias de 10 a 100 pb repetidas en tandem en el genoma. El número de repeticiones normalmente es inferior a 1000, abarcando una región de 10^2 a 10^5 pb. También pueden ser referidos como *VNTR* (del inglés *Variable Number of Tandem Repeats*) . Los minisatélites usualmente son analizados al digerir el *ADN* con *enzimas de restricción*, para posteriormente transferir a una membrana (*Southern blot*) y realizar una hibridación con la sonda minisatélite marcada.

Nucleótido. Unidades monoméricas del *ADN* (ver *desoxinucleotidos*) y *ARN*, conformados por una base nitrogenada (purinas o pirimidinas) una pentosa (desoxirribosa o ribosa, respectivamente) y un grupo fosfato.

PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*). Reacción en cadena de la polimerasa.

Técnica con la que se copian las hebras complementarias de una molécula de *ADN* blanco simultáneamente a través de una serie de ciclos, que incluyen una *desnaturalización* del *ADN*, *alineamiento* de *iniciadores* y *extensión* (síntesis) mediante una polimerasa (comúnmente Taq polimerasa). 30 ciclos producirán un factor de amplificación de 100 millones. Técnica desarrollada por Mullis y col. en 1985.

Pedigrí. Diagrama de la historia ancestral o registro genealógico de un individuo.

Plásmido. *ADN* bacteriano extracromosomal en el que se codifican genes que le confieren a la bacteria ciertas propiedades (resistencia, fertilidad, virulencia, etc.). Mantienen una replicación independiente al *ADN* cromosomal.

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

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

QTLs. (del inglés *Quantitative Trait Loci*). *Loci* (genes) de caracteres cuantitativos. Es un marcador molecular (ya sea un gen o un fragmento de *ADN*) que se encuentra estrechamente asociado con una característica cuantitativa, de tal manera que la simple inspección a nivel molecular permita predecir con cierta confianza como será el desempeño del organismo para la característica en cuestión. Dicho de otra manera el marcador molecular (ahora *QTL*) será heredado de manera ligada con otros genes que influyen sobre la característica, por ejemplo mayor crecimiento.

Quimioluminiscencia. Emisión de luz como resultado de una reacción química, la cual puede ser registrada en una película de rayos X. Diversas técnicas moleculares utilizan sondas o *iniciadores* marcados (ej. *biotina*) para ser observados por quimioluminiscencia alternativamente al uso de la radioactividad. En el *kit* “Photop Star Detection de New England” la *biotina* asociada al *ADN* se une a estreptavidina, y esta a su vez a una fosfatasa alcalina biotinilada la cual remueve los grupos fosfatos de un tercer reactivo (CDP-Star) emitiendo una señal luminosa.

RAPD (del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*). *ADN* Polimórfico Amplificado al Azar. Técnica basada en el uso de *PCR*, en donde un solo iniciador (de alrededor de 10 pb) diseñado arbitrariamente puede amplificar fragmentos polimórficos de *ADN* flanqueados por dos sitios complementarios de *alineamiento* en orientación invertida, es decir el mismo iniciador se une a ambas hebras de *ADN*.

RFLPs (del inglés *Restriction Fragment Length polymorphism*). Polimorfismo de la longitud de Fragmentos de Restricción. Técnica en la que originalmente se digería el

ADN genómico con enzimas de restricción para posteriormente transferir a una membrana (*Southern blotting*) e hibridar con una sonda conocida (ej. *minisatélite*). Actualmente, existe una variante en la que primeramente se amplifican por *PCR* regiones conocidas, comúnmente de *ADN* mitocondrial, y posteriormente se digieren con *enzimas de restricción*, evaluando el *polimorfismo* en cuanto al largo de los fragmentos generados.

Satélite. Grandes regiones de *ADN* (10^3 a 10^7 pb) con segmentos de más de 100 pb repetidos en tandem.

Secuenciación. Establecimiento del orden de las bases nucleotídicas (secuencia) de 5' a 3' en un fragmento de *ADN* de interés.

Southern blotting. *Inmovilización del ADN.* Técnica por la cual diferentes fragmentos de *ADN* corridos electroforéticamente son transferidos de un gel a una membrana, en donde se inmovilizarán y podrán ser *desnaturalizados* para hacer pruebas de hibridación con sondas marcadas por radioactividad o *quimioluminiscencia*.

Stock. Anglicismo con el cual se hace referencia a una población en términos pesqueros. Existencias en español.

Transformación. Introducción de *ADN* foráneo en una bacteria con la ayuda de un vector plasmídico.

Vector plasmídico. Plásmidos usados como vectores para introducir fragmentos de *ADN* en bacterias y producir múltiples copias del mismo. Actualmente existen diversos plásmidos de secuencia diseñada, con sitios específicos de corte, secuencias para iniciadores, y genes para resistencia a antibióticos o síntesis de metabolitos para su selección.

VNTR (del inglés *Variable Number of Tandem Repeats*). *Número variable de repeticiones en tandem.* Término genérico para denotar a las secuencias repetidas en tandem de 1 a 100 pb, incluye las regiones *microsatélite* y *minisatélite*.

X-gal. 5-bromo-4cloro-3-indol- β -D-galactosa. Substrato cromogénico para la β galactosidasa, la cual es codificada por el gen reportero lacZ de los vectores plasmídicos. La reacción trae consigo un precipitado que le da una coloración azul a las colonias bacterianas. En los vectores plasmídicos el sitio de inserción del *ADN* foráneo se encuentra en la secuencia de lacZ, por lo que una inserción exitosa interrumpirá su secuencia y por tanto la síntesis de β galactosidasa, por lo que no se dará la reacción cromogénica con X-gal, observándose colonias con coloración blanca.

Glosario

ADN (Ácido desoxirribonucleico). Base molecular de la herencia. Una molécula de *ADN* es un polímero de *desoxinucleótidos* ordenados en una doble hélice (dos hebras) de azúcares fosfatados con bases purinas y pirimidinas proyectándose al centro. Cada hebra se mantiene unida por enlaces fosfodiéster entre los carbonos 3' y 5' de *nucleótidos* adyacentes. De acuerdo al modelo de Watson y Crick, el *ADN* forma una doble hélice que es mantenida unida por enlaces de hidrógeno entre pares de bases (doble enlace entre timina y adenina y triple enlace entre citosina y guanina), por tanto cada hebra en la doble hélice es complementaria en su secuencia.

ADN genómico. *ADN* que incluye toda la secuencia de nucleótidos contenida en el genoma de un individuo. Término utilizado para referirse al *ADN* extraído mediante el uso de proteinasa K, detergentes (SDS) y solventes (fenol). Con este método se obtienen fragmentos de 100 a 150 kb adecuados para la producción de genotecas mediante una digestión previa con enzimas de restricción. A nivel práctico el ADN extraído incluirá el ADN nuclear (cromosomal) y ADN mitocondrial.

AFLPs (del inglés Amplified Fragment Length Polymorphism). Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos Amplificados. Técnica que utiliza el *PCR* para amplificar un subgrupo de fragmentos de *ADN* generados por digestión con *enzimas de restricción*. A los fragmentos resultantes de la digestión con dos *enzimas de restricción* se les ligan a sus extremos unos adaptadores de secuencia conocida, los cuales funcionan como sitio de *alineamiento* para unos *iniciadores* específicamente diseñados.

Alelo. Una de dos o más formas alternativas de un gen, cada uno con una secuencia de nucleótidos única. El término es usado también para denotar las variantes de los marcadores moleculares genéticos codominantes como los microsatélites.

Alelos, número de alelos (n_A). Estimador de la variabilidad genética en poblaciones, se determina para cada muestra poblacional.

Alelos, número efectivo de alelos (n_e). Número de alelos igualmente frecuentes en una población. Su definición parte de la asunción de pueden presentarse similares niveles de homocigosidad con un diferente número de alelos, de aquí que se derive que el número efectivo de alelos estará dado por $n_e = 1/\text{homocigosidad}$.

Alineamiento de iniciadores. Etapa de la *PCR* inmediatamente después de la *desnaturalización*, en la cual se baja la temperatura para permitir que los dos *iniciadores* se unan a las secuencias flanqueantes del *ADN* por amplificar en cada una de las hebras.

La temperatura de alineamiento es calculada cuidadosamente para asegurar que los iniciadores se unan solamente a las secuencias de *ADN* deseadas. Estas temperaturas (normalmente de 40-60° C) estarán determinadas por la secuencia y el número de bases en los iniciadores.

Biotina. Vitamina o cofactor en diversas reacciones enzimáticas. En estudios de Biología molecular se utiliza para marcar el *ADN* ya sea por enlaces covalentes o por hibridación. La biotina puede ser incorporada directamente en el *ADN* mediante su polimerización con *iniciadores* biotinilados o por polimerización en presencia de *dNTPs* biotinilados. La biotina representa el primer paso para la visualización del *ADN* mediante quimioluminiscencia.

Célula competente. Células bacterianas que han sufrido cambios en su membrana haciéndolas susceptible a ser *transformadas*. Este estado transitorio se puede lograr al incubar a las células a bajas temperaturas con CaCl_2

Clonación de *ADN*. Técnica que permite que secuencias individuales de *ADN* en mezclas complejas sean aisladas y copiadas permitiendo su manipulación y análisis detallado. El *ADN* a clonar es recombinado con *ADN* de un vector e introducido en una célula hospedera donde será copiado.

Desfosforilación. Reacción química mediada por una fosfatasa en la que una molécula pierde un grupo fosfato. Específicamente para el caso de una secuencia de *ADN* la desfosforilación se da por la pérdida del grupo fosfato en el extremo 5' por la acción de la fosfatasa alcalina. Lo anterior evita que el *ADN* digerido se vuelva a religar, como el caso específico de los plásmidos linealizados.

Desequilibrio de ligamiento. Cuando los alelos de diferentes loci se encuentran ligados no existe una segregación independiente de los mismos, lo cual trae consigo que a nivel poblacional se observen genotipos comunes entre individuos. El caso extremo de desequilibrio de ligamiento ocurre cuando los loci se encuentran en el mismo cromosoma y muy cercanos por lo que la frecuencia de recombinación es muy baja. Sin embargo en poblaciones naturales adaptadas a un medio ambiente se pueden dar asociaciones entre alelos de diferentes loci en diferentes cromosomas debido a procesos de selección natural.

Desnaturalización del *ADN*. Separación de las dos hebras que constituyen al *ADN* por rompimiento de los enlaces de hidrógeno entre bases complementarias. El *ADN* se desnaturaliza a temperaturas superiores a 90° C. Primera etapa en la *PCR*

***dNTPs* (desoxinucleótidos).** Nucleótidos cuya pentosa es una desoxirribosa y por ende son los monómeros del ácido desoxirribonucleico (*ADN*)

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

Enzima de restricción. Enzimas de origen bacteriano que cortan moléculas de *ADN* extraño en sitios específicos de reconocimiento. Su nomenclatura se basa en una abreviatura de la bacteria donde fueron aisladas, seguida por una numeración romana que da el orden cronológico de su descubrimiento.

Extensión del *ADN*. Tercera etapa en la *PCR*. La temperatura es elevada a 72° C para permitir que una *ADN polimerasa* inicie la síntesis a partir del iniciador agregando *dNTPs* libres sobre la hebra que sirve de templado.

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

Genética cuantitativa. Rama de la *Genética* en la que se analizan las características fenotípicas que pueden ser medidas en una escala de manera continua, y que son determinadas por la acción aditiva de múltiples genes.

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

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

GenBank (*Banco génico o genómico*). Base de datos de libre acceso de secuencias nucleotídicas y polipeptídicas, administrada por el “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html

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

Genoteca. Colección de fragmentos de *ADN* de una determinada especie insertados al azar en vectores (tales como plásmidos o fagos lambda) y clonados en hospederos (ej. bacterias). La colección debe de ser lo suficientemente grande para incluir toda la secuencia nucleotídica del genoma.

Genoteca parcial o librería subgenómica. Colección incompleta de *ADN* de un determinado individuo la cual se origina al seleccionar fragmentos de *ADN* de un específico rango de tamaños.

Genotipo. La constitución genética de un organismo, que estará dada por la información heredada por ambos padres. Específicamente para un solo locus, el genotipo estará dado por los alelos heredados por ambos padres (ver *homocigoto*, *heterocigoto*).

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

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

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

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

Heteroduplex. ADN de doble hebra en el cual cada cadena tiene un origen diferente y por tanto no son completamente complementarias.

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

Iniciador (del inglés **Primer**). Oligonucleotido (alrededor de 20 pb) de una sola hebra que se alinea (homologa) para iniciar la replicación del ADN mediante una polimerasa. Se requieren dos *iniciadores* (uno para cada hebra de ADN), los cuales flanquearán la región por amplificar.

IPTG. *Isopropiltiogalactosa*. Estimula la actividad del operón bacteriano *lac* presente en los vectores plasmídicos.

Librería genómica. Ver *Genoteca*

Ligamiento. Cuando dos alelos de diferentes genes tienden a pasar juntos de una generación a la otra. Únicamente los genes situados en el mismo cromosoma pueden mostrar ligamiento. El grado de ligamiento entre dos genes dependerá de la frecuencia de recombinación que ocurra entre ellos durante la meiosis, por tanto conforme los genes estén mas separados en el cromosoma la frecuencia de recombinación será mayor y por ende existirá un menor ligamiento.

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

Loci. Plural de *locus*

Mapa genético. Arreglo lineal de sitios mutables (polimórficos) sobre un cromosoma, deducidos de experimentos de recombinación genética. Implica un ordenamiento de marcadores y genes estableciendo distancias genéticas entre los mismos.

Marcador molecular. Genes, proteínas o fragmentos de *ADN* polimórficos que permiten distinguir entre individuos, familias, poblaciones o especies.

MAS. (del inglés **Marker Assisted Selection**). Selección asistida por marcadores. Estrategia para auxiliar en el mejoramiento genético seleccionando a los reproductores o progenies en los primeros estadios de crecimiento en base a un marcador molecular que este relacionado con un mayor desempeño. En estos casos se eliminarán los organismos que porten marcadores que actúen en detrimento de la producción (los mas pequeños, los menos resistentes), la ventaja del MAS comparado con el mejoramiento tradicional es que no será necesario crecer a los organismos para darse cuenta de si tienen buen o mal desempeño sino desde un principio con un análisis de *ADN* serán seleccionados.

Mendel, leyes de. **1. Ley de la segregación.** Los factores de un par de caracteres son segregados. En términos modernos, se refiere a la separación de los dos alelos de un individuo diploide en diferentes gametos y por ende segregación en la progenie. **2. Ley de la distribución independiente.** Los miembros de diferentes pares de factores se distribuyen independientemente.

Microsatélite. Regiones de *ADN* con secuencias cortas de una a seis pares de bases (pb) repetidas en tandem, es decir la misma secuencia una tras otra, llegando a medir toda la región hasta 100 pb. Se analizan mediante amplificaciones por *PCR*, para lo cual es necesario diseñar *iniciadores* flanqueantes, lo cual representa una identificación previa del microsatélite en la especie en cuestión implicando un proceso de *clonación* y *secuenciado*. También son conocidos como *SSRs* (del inglés *Simple Sequence Repeats*), *STRs* (del inglés *Short Tandem Repeats*) ó *VNTRs* (del inglés *Variable Number Tandem Repeats*), esté último término incluyendo a los minisatélites.

Miniprep. Método de extracción de *ADN* plasmídico que se basa en una lisis alcalina del *ADN* cromosomal bacteriano

Minisatélite. Los minisatélites son secuencias de 10 a 100 pb repetidas en tandem en el genoma. El número de repeticiones normalmente es inferior a 1000, abarcando una región de 10^2 a 10^5 pb. También pueden ser referidos como *VNTR* (del inglés *Variable Number of Tandem Repeats*) . Los minisatélites usualmente son analizados al digerir el *ADN* con *enzimas de restricción*, para posteriormente transferir a una membrana (*Southern blot*) y realizar una hibridación con la sonda minisatélite marcada.

Nucleótido. Unidades monoméricas del *ADN* (ver *desoxinucleótidos*) y *ARN*, conformados por una base nitrogenada (purinas o pirimidinas) una pentosa (desoxirribosa o ribosa, respectivamente) y un grupo fosfato.

PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*). *Reacción en cadena de la polimerasa*. Técnica con la que se copian las hebras complementarias de una molécula de *ADN* blanco simultáneamente a través de una serie de ciclos, que incluyen una *desnaturalización* del *ADN*, *alineamiento* de *iniciadores* y *extensión* (síntesis) mediante una *polimerasa* (comúnmente Taq polimerasa). 30 ciclos producirán un factor de amplificación de 100 millones. Técnica desarrollada por Mullis y col. en 1985.

Pedigrí. Diagrama de la historia ancestral o registro genealógico de un individuo.

Plásmido. *ADN* bacteriano extracromosomal en el que se codifican genes que le confieren a la bacteria ciertas propiedades (resistencia, fertilidad, virulencia, etc.). Mantienen una replicación independiente al *ADN* cromosomal.

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

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

QTLs. (del inglés *Quantitative Trait Loci*). *Loci (genes) de caracteres cuantitativos*. Es un marcador molecular (ya sea un gen o un fragmento de *ADN*) que se encuentra estrechamente asociado con una característica cuantitativa, de tal manera que la simple inspección a nivel molecular permita predecir con cierta confianza como será el desempeño del organismo para la característica en cuestión. Dicho de otra manera el marcador molecular (ahora *QTL*) será heredado de manera ligada con otros genes que influyen sobre la característica, por ejemplo mayor crecimiento.

Quimioluminiscencia. Emisión de luz como resultado de una reacción química, la cual puede ser registrada en una película de rayos X. Diversas técnicas moleculares utilizan sondas o *iniciadores* marcados (ej. biotina) para ser observados por quimioluminiscencia alternativamente al uso de la radioactividad. En el kit “Photoprobe Star Detection de New England” la biotina asociada al *ADN* se une a estreptavidina, y esta a su vez a una fosfatasa alcalina biotinilada la cual remueve los grupos fosfatos de un tercer reactivo (CDP-Star) emitiendo una señal luminosa.

RAPD (del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*). *ADN Polimórfico Amplificado al Azar*. Técnica basada en el uso de *PCR*, en donde un solo iniciador (de alrededor de 10 pb) diseñado arbitrariamente puede amplificar fragmentos polimórficos de *ADN* flanqueados por dos sitios complementarios de alineamiento en orientación invertida, es decir el mismo iniciador se une a ambas hebras de *ADN*.

RFLPs (del inglés *Restriction Fragment Length polymorphism*). *Polimorfismo de la longitud de Fragmentos de Restricción*. Técnica en la que originalmente se digería el *ADN* genómico con enzimas de restricción para posteriormente transferir a una

membrana (*Southern blotting*) e hibridar con una sonda conocida (ej. *minisatélite*). Actualmente, existe una variante en la que primeramente se amplifican por *PCR* regiones conocidas, comúnmente de *ADN mitocondrial*, y posteriormente se digieren con enzimas de restricción, evaluando el polimorfismo en cuanto al largo de los fragmentos generados.

Satélite. Grandes regiones de ADN (10^3 a 10^7 pb) con segmentos de más de 100 pb repetidos en tandem.

Secuenciación. Establecimiento del orden de las bases nucleotídicas (secuencia) de 5' a 3' en un fragmento de ADN de interés.

Southern blotting. *Inmovilización del ADN.* Técnica por la cual diferentes fragmentos de *ADN* corridos electroforéticamente son transferidos de un gel a una membrana, en donde se inmovilizarán y podrán ser desnaturalizados para hacer pruebas de hibridación con sondas marcadas por radioactividad o *quimioluminiscencia*.

Stock. Anglicismo con el cual se hace referencia a una población en términos pesqueros. Existencias en español.

Transformación. Introducción de *ADN* foráneo en una bacteria con la ayuda de un vector plasmídico.

Vector plasmídico. Plásmidos usados como vectores para introducir fragmentos de ADN en bacterias y producir múltiples copias del mismo. Actualmente existen diversos plásmidos de secuencia diseñada, con sitios específicos de corte, secuencias para iniciadores, y genes para resistencia a antibióticos o síntesis de metabolitos para su selección.

VNTR (del inglés *Variable Number of Tandem Repeats*). *Número variable de repeticiones en tandem.* Término genérico para denotar a las secuencias repetidas en tandem de 1 a 100 pb, incluye las regiones *microsatélite* y *minisatélite*.

X-gal. *5-bromo-4cloro-3-indol-β-D-galactosa.* Substrato cromogénico para la β galactosidasa, la cual es codificada por el gen reportero *lacZ* de los vectores plasmídicos. La reacción trae consigo un precipitado que le da una coloración azul a las colonias bacterianas. En los vectores plasmídicos el sitio de inserción del *ADN* foráneo se encuentra en la secuencia de *lacZ*, por lo que una inserción exitosa interrumpirá su secuencia y por tanto la síntesis de β galactosidasa, por lo que no se dará la reacción cromogénica con X-gal, observándose colonias con coloración blanca.

Resumen

Enmarcado dentro de un programa de mejoramiento genético de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y con fines de evaluar la variabilidad genética dentro de dicho programa, se identificaron marcadores moleculares tipo microsatélites, abarcando desde su secuenciación, caracterización, diseño de *iniciadores*, optimización del *PCR* y análisis de ajuste a una herencia mendeliana. Para caracterizar a los microsatélites se construyó una genoteca parcial *Sau3AI* con aproximadamente 2000 clonas. Para identificar a los microsatélites se siguieron dos estrategias: *A*) secuenciado directo de clonas y *B*) secuenciado de clonas que hibridaran positivamente con dos sondas biotiniladas (CT)₁₀ y (GT)₁₀. Los microsatélites identificados fueron principalmente dinucleótidos, 58.82 % (1/0.42 kb), seguidos de trinucleótidos, 27.73 % (1/0.88 kb), tetranucleótidos, 9.25 % (1/2.7 kb), y pentanucleótidos, 4.2 % (1/5.84 kb). El microsatélite (CT)_n fue el mas abundante seguido de (GT)_n, coincidiendo con un reporte previo para esta misma especie, a pesar de que en *Penaeus monodon*, y en la mayoría de los artrópodos y vertebrados, el dinucleótido (GT)_n es el mas abundante. La elevada presencia de una región previamente reportada de un satellite/microsatélite (PVS1) en las clonas (43.33 %), y por ende en el genoma de *L. vannamei* (1/0.8 kb) disminuyó la probabilidad de identificar nuevas regiones microsatélites, por lo que se propone conformar librerías de DNA genómico cortando con enzimas de restricción (ej. *HaeIII*, *AluI*, o *HincII*, vector *SmaI*) que no reconozcan tal región. Después de secuenciar 90 clonas (29,199 pb), e identificar 119 regiones microsatélites en 56 de éstas, con una abundancia de microsatélites de 1 cada 0.25 kb, se evaluaron 25 pares de *iniciadores* diseñados en las zonas flanqueantes de los microsatélites para amplificarlos mediante la “reacción en cadena de la polimerasa” (*PCR*). Siete fueron los microsatélites amplificados, de los cuales cinco presentaron claros patrones de bandeo. Los cinco microsatélites amplificados exitosamente por *PCR* tienen un elevado potencial para la evaluación de variabilidad genética en poblaciones naturales de *L. vannamei*.

De los dos microsatélites más polimórficos (*Pvan1758* y *Pvan1815*) se optimizó la reacción de *PCR* hasta interpretar correctamente sus diferentes variantes alélicas y genotipos individuales. Ambos loci-microsatélites analizados (*Pvan1758* y *Pvan1815*) se ajustaron a una herencia mendeliana, al evaluar su segregación alélica en la progenie de tres familias, corroborando con el genotipo materno y logrando inferir el genotipo paterno. En el locus *Pvan1815*, se observaron alelos nulos, lo cual se resolvió al manejar condiciones menos astringentes en el *PCR* (mayor concentración de $MgCl_2$). Lo anterior aumentó la confiabilidad de estos microsatélites para su posterior aplicación.

Los microsatélites *Pvan1758* y *Pvan1815* se usaron para evaluar la variabilidad genética a lo largo de tres generaciones de camarón cultivado siguiendo una estructura familiar. A partir de organismos de una línea domesticada de Los Melagos Son.-Venezuela (MV) (G_0 o población fundadora) se produjeron dos generaciones consecutivas (G_1 y G_2) de camarón blanco. El propósito de este estudio fue monitorear la variabilidad genética desde la población fundadora hasta la segunda generación, para establecer si los niveles de variabilidad eran los adecuados para proseguir con un programa de selección a largo plazo. La variabilidad genética evaluada en términos de heterocigosidad, tanto observada (H_o) como esperada (H_e) no cambió significativamente a lo largo de las generaciones ($H_o = 0.65 - 0.72$; $H_e = 0.77 - 0.71$) situándose alrededor del valor observado (H_o) promedio reportado para especies silvestres (0.666) y por arriba del reportado en especies cultivadas (0.594). La variabilidad genética evaluada en número de alelos (n_A) mostró un ligero aumento debido a la ganancia de alelos raros, en tanto que en el número de alelos efectivos (n_e) se observó una reducción del 16.6 % de G_0 a G_2 . El número de alelos ($n_A = 7.5 - 10$) y el número efectivo de alelos ($n_e = 4.16 - 3.47$) se situó por debajo de lo observado en poblaciones silvestres pero por arriba de lo reportado en poblaciones cultivadas. Se observaron diferencias en frecuencias alélicas en generaciones consecutivas en uno (G_0 - G_1) o ambos loci (G_1 - G_2), debido al aumento y disminución de ciertas variantes alélicas, lo cual puede ser atribuido a la contribución de los machos MV, que en la G_0 no fue incluida en el análisis y en la G_2 representó una nueva introducción de variabilidad.

A pesar de unos niveles de variabilidad genética aceptables en términos de heterocigosidad, los cambios en el número de alelos efectivos (n_e) muestran una

tendencia previa a permanecer 3 a 4 alelos en ambos loci, lo cual parece indicar que la población fundadora MV ya mostraba una reducción de variabilidad genética, la cual puede ser corregida durante las etapas tempranas del programa de crianza al introducir nuevos organismos con variabilidad genética diferente. Para incrementar la variabilidad genética en G_3 , varios individuos del programa fueron apareados con reproductores de una línea colombiana. Un análisis preliminar de los reproductores colombianos ($n = 23$) reveló valores superiores de variabilidad ($n_A = 10$, $n_e = 6.85$, $H_o = 0.74$, $H_e = 0.87$), diferentes frecuencias alélicas, y dos alelos exclusivos en ambos microsatélites que permitirá distinguir entre líneas.

El monitoreo de la variabilidad genética demostró ser útil y deberá continuar en este y otros programas, especialmente antes y después de que la selección sea aplicada. La inclusión de otros marcadores genéticos será útil, no solamente para complementar las evaluaciones de variabilidad genética, sino también para el seguimiento de pedigríes y posible asociación con características importantes a nivel de producción (QTLs).

Abstract

As an integral part of a genetic breeding program of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) the genetic variability was evaluated with molecular markers, specifically microsatellites identified *de novo*, including their characterization, sequencing, primers design, *PCR* optimization, and agreement to Mendelian inheritance expectations. A *Sau3A1* partial genomic library with 2000 clones was produced. Two strategies were followed to identify microsatellites: *A*) direct sequencing of clones, and *B*) sequencing of positive clones to biotinylated probes (CT)₁₀ and (GT)₁₀. The most abundant identified microsatellites were dinucleotides, 58.82 % (1/0.042 kb), followed by trinucleotides, 27.73 % (1/0.88 kb), tetranucleotides, 9.25 % (1/2.7 kb), and pentanucleotides, 4.2 % (1/5.84 kb). The most abundant microsatellite was (CT)_n followed by (GT)_n, in agreement with a previous report in *L. vannamei* and contrasting with *Penaeus monodon* and most of the arthropods species where (GT)_n is the most abundant dinucleotide. There was a previously reported satellite/microsatellite region (PVS1) in 43.33 % of the clones, resulting in a high abundance in the *L. vannamei* genome (1/0.8 kb). Because the presence of this microsatellite in the shrimp genome reduces the possibility of finding new microsatellites, we propose the construction of libraries by cutting with restriction enzymes that do not recognize any sequence in the PVS1 region (i.e. *HaeIII*, *AluI*, or *HincII*, vector *SmaI*). After sequencing 90 clones (29,199 bp), and identifying 119 microsatellite regions in 56 clones, an abundance of one microsatellite per 0.25 kb, the amplification by *PCR* of 25 designed primers pairs was evaluated. Seven microsatellites were amplified, and the banding pattern was clearly interpreted in five of them. These microsatellites have a high potential in genetic variation studies of populations of *L. vannamei*.

The *PCR* amplification of the most polymorphic microsatellites (*Pvan1758* y *Pvan1815*) was optimized to identify alleles and genotypes. Both microsatellites agreed with Mendelian expectations when the offsprings of three families were evaluated. The maternal genotype was verified and the paternal was inferred. The locus *Pvan1815*

showed null alleles, which were resolved decreasing the stringency of the *PCR* reaction increasing MgCl_2 concentration. These analyses and modifications increased the confidence in the use of these microsatellites in genetic variation studies.

Genetic diversity in a shrimp-breeding program with an established pedigree was monitored for three generations by *Pvan1578* and *Pvan1815* microsatellites. Two consecutive generations were produced (G_1 and G_2) using as a founder stock (G_0) a captive population in domestication from Los Melagos, Son.- Venezuela (MV line). The main goal was to monitor these generations to establish levels of genetic variation and proceed with a selection program. The amount of genetic variation, expressed as observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) did not change significantly through generations ($H_o = 0.65 - 0.72$; $H_e = 0.77 - 0.71$) with an average H_o around that reported for wild stocks (0.666) and higher than that observed in cultured stocks (0.594). The genetic variation expressed in number of alleles (n_A) increased through the gain of rare alleles. Nevertheless, the mean number of effective alleles (n_e) decreased 16.6% from G_0 to G_2 . The average number of alleles at G_0 and G_2 (7.5 and 10), and the average number of effective alleles (4.16 and 3.47) were less variable than those from wild populations, but higher than those from inbred stocks. There were significant differences in allele frequencies in one (G_0 - G_1) or both (G_1 - G_2) microsatellites, caused by a significant frequency increase or decrease of certain alleles through the contribution of the newly introduced MV male breeders. The MV male variability was not included in G_0 but was already considered at the G_2 as a new introduction of variability.

In spite of the acceptable genetic variation in heterozygosity, the decreased effective number of alleles (n_e) through generations highlights the previous trend of 3-4 alleles at both loci to dominate. These reduced n_e might indicate that a certain reduction in variability already existed in the initial MV line used as broodstock, which could be corrected during this early stages of the breeding program by introducing new and different organisms. To increase the genetic variation at a G_3 , several individuals in the breeding program were mated with breeders from a Colombia line. A preliminary analysis of the Colombian breeders ($n = 23$) revealed higher values of variability ($n_A = 10$, $n_e = 6.85$, $H_o = 0.74$, $H_e = 0.87$), different allele frequencies, and two exclusive alleles in both microsatellites that allow the distinction between the lines.

The monitoring of genetic variability has proved useful and should be maintained in this and other breeding programs, especially before and after selection is applied. The inclusion of other genetic markers will be useful, not only to complement the evaluations of genetic variability, but also for pedigree assessments and possible association with productive traits.

Introducción General

El camarón blanco *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* (Boone, 1931, Pérez Farfante, 1969) representa un importante recurso tanto pesquero como de cultivo en la región noroeste de México. La producción de camarón cultivado en el 2001 alcanzó las 47,465 toneladas valuadas en 2,738 millones de pesos (SAGARPA, 2002). Entre los problemas principales a los que se ha enfrentado el cultivo de estos organismos es una progresiva escasez de reproductores en buenas condiciones, debido principalmente a la diseminación de enfermedades por el traslado de organismos de una región a otra sin regulación alguna, además de que no existen en el país programas de cultivo que consideren una domesticación a largo plazo tratando de evitar al máximo pérdidas de variabilidad genética. La alternativa más viable para resolver estos problemas y además obtener un mayor rendimiento, es comenzar su domesticación combinada con un programa de mejoramiento genético (Ibarra, 1999). La forma clásica y vigente con la que se pueden lograr mejores resultados es conformando diferentes familias y evitando el apareamiento entre organismos cercanamente emparentados (endogamia), lo cual implica el establecimiento de pedigríes, para posteriormente seleccionar a los organismos con las mejores características productivas (crecimiento y supervivencia).

El avance vertiginoso de las técnicas moleculares en los últimos veinte años ha traído consigo el desarrollo de múltiples marcadores genéticos, los cuales pueden ser incorporados dentro del esquema clásico de un programa de mejoramiento, evaluando la variabilidad genética existente y monitoreando los niveles de endogamia, además de poder correlacionar tales marcadores con características productivas.

Recientemente los microsatélites han llegado a ser los marcadores moleculares de mayor aplicación en diversas ramas de la genética, desde la genética molecular hasta la genética cuantitativa pasando por la genética de poblaciones. Lo anterior es debido a que los microsatélites presentan múltiples ventajas y aplicaciones:

- 1) Los loci-microsatélite son encontrados en gran número en el genoma eucariótico, y en base a su composición están distribuidos de manera diferencial en las regiones exónicas (codificantes) e intrónicas (no codificantes) (Tóth et al., 2000).
- 2) Técnicamente los microsatélites son mas deseables que los grandes loci *VNTRs* ya que pueden ser analizados por medio de la “reacción en cadena de la polimerasa” (del inglés Polymerase Chain Reaction, *PCR*) (McPherson y Møller, 2000).
- 3) El análisis de *PCR* de pequeños fragmentos también permite el análisis de muestras degradadas en las cuales el tamaño promedio del fragmento de ADN genómico ha sido severamente reducido debido a daño ambiental (McPherson y Møller, 2000).
- 4) El análisis rutinario de microsatélites, debido a su elevada automatización, es rápido comparado con otros marcadores del ADN, aunque el trabajo inicial de detección de los microsatélites y construcción de *iniciadores* (del inglés *primers*) puede ser algo lento (Zane et al., 2002).
- 5) Su herencia es del tipo mendeliano, y son marcadores codominantes, lo que permite la visualización de su herencia tanto materna como paterna. De esta manera es posible definir loci y variantes alélicas, así como genotipos individuales (homocigoto o heterocigoto), lo cual permite evaluar el porcentaje de heterocigotos y las frecuencias alélicas de las diferentes variantes presentes en una muestra poblacional (Cavalli-Sforza, 1998).
- 6) Debido a que la mayoría de los microsatélites no están sujetos a presión selectiva, la tasa de mutación (adición o pérdida de unidades de repetición) es muy elevada, dando una elevada variación alélica (polimorfismo) y elevados niveles de heterocigosidad. La tasa mutacional de los microsatélites ha sido estimada entre 10^{-3} y 10^{-5} por locus por generación (Hancock, 1999).
- 7) Se ha observado que los microsatélites son variables aún en poblaciones con bajos niveles de variación por aloenzimas y ADN mitocondrial, y por tanto permiten observar diferencias y estructuras poblacionales antes no detectadas, como es el caso

de los peneidos (Hedgecock y Malecha, 1991; Palumbi y Benzie, 1991; Benzie et al., 1993, Bouchon et al., 1994; Garcia et al., 1994; Garcia y Benzie, 1995; Wolfus et al., 1997).

- 8) En varias especies de animales terrestres domesticadas, así como últimamente en peces (Estoup et al., 1997; Ferguson y Danzmann, 1998; Perez-Enriquez et al., 1999), el uso de los microsátélites se ha centrado en el establecimiento de pedigríes y esclarecer problemas de parentesco en programas de mejoramiento genético.
- 9) La generación de numerosos marcadores genéticos permitirá la búsqueda de posibles correlaciones entre los marcadores y los genes controlando características cuantitativas *QTL* (del inglés *Quantitative Trait Loci*). Un primer paso en identificar un *QTL* es desarrollar un mapa genético donde la localización cromosomal relativa de los diferentes marcadores genéticos sea determinada (Ferguson y Danzmann, 1998). Actualmente se están desarrollando mapas genéticos en base a microsátélites para diversas especies acuícolas, como el salmón del Atlántico, trucha arcoiris, trucha café (Bartley, 1997), camarón japonés (Moore et al., 1999) y camarón blanco (Alcivar-Warren et al., 1997).

En el presente trabajo de tesis, se abordó la aplicación de marcadores moleculares tipo microsátélites dentro de un programa de domesticación y mejoramiento genético de *L. vannamei*, incluyendo en primera instancia (Capítulo I) la identificación de los mismos a partir del genoma del camarón blanco. Esto incluyó la aplicación de una serie de herramientas moleculares como clonación en sistemas bacterianos, hibridaciones con sondas marcadas, secuenciación y amplificación de ADN entre otras, logrando caracterizar la composición y abundancia de regiones microsátélites en esta especie. Además de amplificar mediante *PCR* cinco microsátélites polimórficos y con potencial como indicadores de diversidad genética y parentesco. La segunda parte de la tesis (Capítulo II) consistió en la optimización de la amplificación de los dos microsátélites más polimórficos, hasta lograr interpretaciones genéticas de los patrones de bandeo de los productos de *PCR*, así mismo se determinó si estos microsátélites se ajustaban a una

herencia mendeliana. En el Capítulo III, se abordó la aplicación de estos microsatélites para evaluar variaciones genéticas a lo largo de tres generaciones de camarón cultivado en el CIBNOR para la conformación de un pío de cría, para lo cual se manejaron técnicas moleculares como electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante, transferencia a membranas y revelado en sistemas no radioactivos (quimioluminiscencia), así como la aplicación de estimadores genéticos derivados de la genética de poblaciones.

Justificación

Actualmente se reconoce que la aplicación biotecnológica más factible y directa para auxiliar en el mejoramiento genético en base a técnicas moleculares lo constituye la identificación de marcadores moleculares (Hedgecock y Malecha, 1991). La caracterización de marcadores moleculares dentro del esquema de un programa de mejoramiento genético en el camarón blanco traerá consigo múltiples ventajas: 1) generará el conocimiento básico sobre las características de secuencias nucleotídicas y su organización en el genoma, 2) permitirá monitorear los niveles de variabilidad genética y endogamia, 3) permitirá el desarrollo de mapas genéticos, 4) apoyará el seguimiento de pedigríes y permitirá el esclarecimiento de dudas en cuanto a parentesco, y 5) quizá lo mas importante y aplicable será la definición de la asociación de estos marcadores con caracteres cuantitativos importantes a nivel de producción. La identificación de marcadores moleculares en *Litopenaeus vannamei* es un primer paso en la aplicación de la biotecnología molecular en programas de mejoramiento genético.

El validar la herencia de un marcador y determinar si se ajusta a una segregación mendeliana es muy importante, ya que aumenta la confiabilidad para su aplicación en los estudios antes mencionados.

Dentro de un programa de mejoramiento genético del camarón, el monitoreo de la variabilidad genética permitirá en primera instancia determinar si los organismos con los que se inicia son lo suficientemente variables para continuar y además permitirá detectar pérdidas de variabilidad debidas a manejo inadecuado en el sistema de apareamiento, lo cual puede traer consigo efectos de endogamia a corto plazo. De esta manera el monitoreo de variabilidad genética aumenta la confianza en el buen uso y manejo del recurso a lo largo de su domesticación. Por otro lado en los programas de mejoramiento genético, una vez que se ha aplicado la selección genética, éste monitoreo permitirá definir si existen cambios en variabilidad genética, los cuales podrían estar asociados al mismo proceso, es decir, encontrar marcadores asociados a la característica siendo seleccionada.

Objetivo general

Caracterizar marcadores moleculares tipo microsatélites en el genoma del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y aplicarlos en la evaluación de los cambios de variabilidad genética a lo largo de tres generaciones en un programa de domesticación y mejoramiento genético.

Hipótesis general

El genoma del camarón blanco presentará suficientes regiones microsatélites que permitirán el desarrollo de marcadores moleculares que presentarán una herencia mendeliana y permitirán determinar una variabilidad genética estable a lo largo de tres generaciones de camarón blanco en cautiverio, para los cuales existió una estructura familiar y se evitó el apareamiento de organismos estrechamente emparentados.

Capítulo I

Identificación y caracterización de marcadores moleculares tipo microsatélites en el genoma del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

I.1 Introducción

La finalidad de los marcadores moleculares, como su nombre lo indica es identificar genes, productos de genes o secuencias de ADN que permitan distinguir entre organismos de diferentes especies, poblaciones o familias, por lo que es requisito indispensable el que exista cierto polimorfismo (diferentes variantes) para el marcador.

Actualmente uno de los marcadores moleculares con mayor utilidad son los microsatélites, también conocidos como *SSRs* (del inglés *Simple Sequence Repeats*), *STRs* (del inglés *Short Tandem Repeats*) ó *VNTRs* (del inglés *Variable Number Tandem Repeats*), esté último término incluyendo a los minisatélites. Los microsatélites son regiones de ADN con secuencias cortas de una a seis pares de bases (pb) repetidas en tandem, es decir la misma secuencia una tras otra (Hancock, 1999), llegando a medir toda la región hasta 100 pb (Chambers y MacAvoy, 2000). Las regiones de 10^2 a 10^5 pb con segmentos repetidos de 10 a 100 pb son conocidas como minisatélites, en tanto que las secuencias de 10^3 a 10^7 pb con segmentos repetidos de mas de 100 pb son conocidas como satélites (Chambers y MacAvoy, 2000). Los microsatélites fueron inicialmente identificados en el genoma humano como repeticiones del dinucleótido CA/GT (Lift and Luty, 1989; Weber y May, 1989) y posteriormente se encontraron en todo genoma eucariótico, principalmente en las regiones no codificantes donde la tasa de substitución es superior que en las regiones codificantes (Zane et al., 2002); aunque estudios recientes

han demostrado la presencia de microsatélites trinucleótidos en regiones génicas (Hancock, 1999). Al nivel de definición, la mayoría de los autores consideran a las regiones repetidas de mononucleótidos como microsatélites (Goldstein y Schlötterer, 1999; Chambers y MacAvoy, 2000; Tóth et al., 2000; Zane et al., 2002), en tanto que otros, a nivel práctico, manejan a los microsatélites a partir de repeticiones de dinucleótidos (Armour et al., 1999), ya que es con estos con los que se tiene una mayor confiabilidad para observar polimorfismos y ser usados como marcadores moleculares. Se considera la presencia de un microsatélite cuando existen al menos tres (Xu et al., 1999) o cuatro repeticiones (Chambers y MacAvoy, 2000), y además se maneja que entre mas número de repeticiones existan, este será más variable entre individuos, es decir más polimórfico (Schlötterer, 1998).

En función de su pureza, entendiéndose como las repeticiones sin interrumpir de un mismo motivo, los microsatélites pueden ser (Weber, 1990; Goldstein y Schlötterer, 1999): a) “perfectos”, cuando consisten de un solo tipo de repetición y no son interrumpidos por ningún nucleótido que no se apegue al patrón de repetición, ejemplo (CT)₂₀; b) “imperfectos”, cuando la región microsatélite presenta interrupciones de nucleótidos que no se ajustan al patrón de repetición, ejemplo (CT)₅GTA(CT)₁₀ y; c) “compuestos”, cuando se presentan adyacentes dos o mas regiones microsatélites de diferente patrón de repetición, ejemplo (CT)₁₀(GT)₁₅.

La característica mas sobresaliente de los microsatélites es que presentan una elevada variabilidad, dada por el número de repeticiones, la cual a su vez es originada por mutaciones. El mecanismo propuesto para describir la mutación en los microsatélites implica una replicación del ADN con doblamiento de hebras (Moxon y Wills, 1999, Ellegren 2000). Se especula que el doblamiento de hebras ocurre primariamente durante la síntesis retrasada de una de las hebras. Por ejemplo, puede involucrar el doblamiento de la hebra recién sintetizada que sobreviene a la disociación del complejo con la polimerasa. Este doblamiento crea una protuberancia pasajera que el mecanismo de reparación de la replicación del ADN no identificará, permitiendo que el microsatélite aumente su largo en una repetición más. Alternativamente, la formación de una

protuberancia pasajera en la hebra del templado podría permitir el acortamiento del microsatélite por la pérdida de una repetición.

Independientemente de sus ventajas, la identificación de regiones microsatélites *de novo* en el genoma de una determinada especie, es la parte más crítica y demandante de tiempo y recursos, convirtiéndose en algunos casos en la principal desventaja, sobre todo cuando el rendimiento final es muy bajo. La manera tradicional para la identificación de microsatélites incluye (Strassmann, et al., 1996; Estoup y Turgeon, 1996): a) el desarrollo de una genoteca o librería parcial genómica, es decir una colección de colonias bacterianas con fragmentos de ADN insertado de la especie en cuestión; b) una selección o “tamizado” con sondas marcadas de las regiones microsatélites a identificar; c) secuenciado de las clonas positivas; d) análisis de secuencias; e) diseño de *iniciadores*; y f) estandarización de la amplificación del microsatélite mediante *PCR*. El número de clonas positivas (conteniendo microsatélites) que puede ser obtenida por el método tradicional comúnmente se encuentra en el rango de 12 % a 0.04 % (Zane et al., 2002). Por ello, esta estrategia será efectiva solamente en los taxa con una elevada frecuencia de microsatélites, como se sabe son los peces y otros vertebrados (Zane et al., 2002). Los peneidos comprenden un grupo del cual se ha demostrado previamente (Xu, et al., 1999; Benzie, 2000) una alta frecuencia de microsatélites.

Debido al bajo rendimiento del método tradicional mencionado se han ideado actualmente otros protocolos para la identificación de microsatélites. El más novedoso de estos se basa en la producción de genotecas enriquecidas con microsatélites. Con este método se “transforman” selectivamente clonas solamente con ADN rico en el microsatélite escogido, y por tanto a diferencia del método tradicional el “tamizado” se hace antes de producir la genoteca, asegurando así que la mayoría de las clonas posean microsatélites (Zane et al., 2002).

Otro método novedoso está basado en la amplificación de ADN al azar (del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA, RAPDs*) y búsqueda de microsatélites por hibridación con sondas para posteriormente clonar y secuenciar (Ender, 1996; Ueno et al., 1999). Este método ha sido probado previamente en el camarón blanco (*L. vannamei*) obteniendo al menos un microsatélite polimórfico (Garcia y Benzie, 1995; Garcia et al., 1996).

Debido a que los microsatélites se encuentran usualmente en regiones no codificantes donde la tasa de mutación es mas elevada, la estrategia de diseñar “*iniciadores universales*” que amplifiquen regiones conservadas, como se hace efectivamente para ADN mitocondrial, no es viable para microsatélites. Sin embargo, la presencia de regiones altamente conservadas que flanquean a ciertos microsatélites ha sido reportada para cetáceos, tortugas, y peces permitiendo la amplificación cruzada de especies que divergieron hace 470 millones de años (Zane et al., 2002). Adicionalmente se espera que algunos de los microsatélites identificados en una especie puedan amplificarse en otra especie en tanto estén cercanas taxonómicamente. Actualmente para peneidos existen varios reportes de microsatélites identificados, de la manera tradicional. En 1999, al inicio de esta investigación existían para peneidos once microsatélites en el GenBank, el cual es el banco de datos donde se depositan las secuencias identificadas en cualquier organismo (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html), que potencialmente podrían amplificar por *PCR* en *L. vannamei*. Seis de estos microsatélites fueron identificados en otras especies (Ball et al., 1998; Xu et al., 1999), y cinco directamente en *L. vannamei* (Garcia et al., 1996; Bagshaw y Buckholt, 1997). Sin embargo de estos microsatélites únicamente uno de ellos demostró ser útil para análisis poblacional y asignación de parentesco en *L. vannamei* (Wolfus et al., 1997).

En el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) se iniciaron desde 1998 estudios de genética en el camarón blanco, como la estimación de parámetros genéticos en un pie de cría, tanto para caracteres de crecimiento como de capacidad reproductiva. Los marcadores moleculares, específicamente los microsatélites, serán útiles para evaluar la variabilidad genética en poblaciones naturales, así como los posibles cambios en variabilidad genética en generaciones cultivadas en cautiverio. En este primer capítulo, se reporta la identificación de microsatélites y su caracterización, principalmente a partir de la conformación de una genoteca parcial *Sau3A1*, además de un análisis prospectivo del método a partir de *RAPDs* y amplificaciones de otros microsatélites previamente reportados para otros peneidos.

1.2 Objetivos específicos

1. Conformar una genoteca parcial *Sau3AI* con fragmentos de ADN de 300 a 900 pb en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, que permita la identificación de microsatélites.
2. Identificar marcadores moleculares tipo microsatélites mediante *a)* el secuenciado directo de clonas y *b)* secuenciado después de hibridar con sondas (CT)₁₀ y (GT)₁₀ en la genoteca parcial de camarón blanco.
3. Caracterizar las regiones microsatélites del genoma del camarón blanco basándose en su composición (di-, tri-, tetra- y penta-nucleótidos), número de repeticiones y su abundancia, comparando con otras especies de peneidos.
4. Estandarizar la amplificación de los microsatélites mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) a partir del diseño de pares de *iniciadores* para cada región microsatélite.

1.3 Materiales y Métodos

1.3.1 Colecta y preservación de tejidos

Se tomaron diferentes muestras de tejidos de *Litopenaeus vannamei* (abdomen y pleópodos de adultos, abdomen de juveniles y postlarvas íntegras) para determinar el más adecuado para la obtención de ADN de alta calidad de manera práctica y rápida. En los pleópodos de adultos, las postlarvas sin cutícula y en el abdomen de juveniles se observaron mejores resultados. Lo anterior se debió a que, al trabajar con tejidos libres de cutícula, se eliminaban pigmentos y otros compuestos quitinados con elevado contenido de carbohidratos. En los tejidos a los que no se les retiraba la cutícula se obtenía un ADN precipitado con una coloración pardusca, que por ende afectaba la pureza de la muestra. De igual manera se evaluó qué método de preservación, congelar a -80°C ó preservar en alcohol al 70 % era el mas adecuado para la obtención de ADN de elevada calidad, observándose similares resultados con ambos procedimientos, por lo que se decidió utilizar el muestreo de tejidos en alcohol.

1.3.2 Extracción de ADN genómico

Se probaron cuatro diferentes protocolos de extracción (García et al., 1994, García y Benzie, 1995, Gaffney, *com. pers.*, Pérez-Enríquez y Taniguchi, 1999) para determinar cual era el mas adecuado para obtener mayor cantidad y calidad de ADN. En general en todos los protocolos se observó que se obtenía suficiente ADN y de buena calidad al agregar cantidades pequeñas de tejido (6 x 2 x 2 mm, el equivalente a un grano de arroz). El protocolo finalmente utilizado (Apéndice I) se derivó de modificaciones a los protocolos descritos por Garcia et al. (1994) y Garcia y Benzie (1995).

1.3.3 Estrategias para la identificación de microsatélites

1.3.3.1 A partir de microsatélites previamente reportados.

Se hicieron búsquedas de los microsatélites e *iniciadores* reportados (bibliografía y por “internet” en el GenBank) para *L. vannamei* y otras especies de peneidos, con fines de amplificarlos mediante *PCR* y estandarizarlos.

1.3.3.2 A partir de RAPDs

Se realizaron amplificaciones al azar mediante *PCR*, utilizando los *iniciadores* C1, C3, C4 y C5 prediseñados por la compañía Operon. Se amplificó el ADN de seis camarones para cada *iniciador* en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 PE en reacciones de 50 µl (ver apéndice II) . Los productos fueron evaluados en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV. De las amplificaciones con el *iniciador* C4 se extrajeron cuatro bandas de diferentes organismos utilizando el kit “GeneClean” (BIO 101). Cada banda fue clonada usando el kit “pGEM-T Easy vector systems” (Promega). De cada una de las bandas clonadas se obtuvo al menos una colonia positiva, identificada por su coloración blanca. Debido a que en esta estrategia cada banda que se obtenga mediante amplificación por *PCR* será necesario clonarla en un sistema bacteriano para poderla secuenciar, y esto implica un avance lento en la identificación de microsatélites y elevados costos se decidió no continuar con ella.

1.3.3.3 A partir de una genoteca parcial con *Sau3A1*

En la Fig. I.1, se presenta un diagrama con el procedimiento general para la obtención de la genoteca parcial en camarón blanco, describiéndose cada paso en los siguientes apartados y en los Apéndices III al XI.

1.3.3.3.1 Digestión del ADN con enzimas de restricción

El ADN extraído del abdomen de un camarón fue digerido con la enzima de restricción *Sau3A1* (GIBCO) siguiendo la metodología de Estoup y Turgeon (1996), buscando obtener una mayor concentración de fragmentos de ADN en la región de 300 a 900 pb (Apéndice III). El ADN correspondiente a la región de 300-900 pb se purificó a partir de un gel de agarosa al 1 % utilizando el Kit “GeneClean II” (BIO 101) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se realizaron seis eventos consecutivos de digestiones con sus respectivas purificaciones desde gel además de una digestión sin purificar.

1.3.3.3.2 Ligación de las digestiones en un vector plasmídico

Antes de la ligación, el plásmido pBluescript II KS de Stratagene purificado en base a la metodología de Sambrook et al., (1989) con modificaciones de Romero-Geraldo (*com. pers.*) (Apéndice IV), fue digerido con la enzima *BamHI* (GIBCO) y desfosforilado en su extremo 5' para evitar su religamiento (Apéndice V). Los fragmentos de ADN genómico de 300-900 pb resultantes de la digestión con *Sau3A1* se ligaron al plásmido, en varios ensayos con la ligasa T4 (GIBCO), manejando diferentes proporciones de inserto/plásmido (1:1, 2:1 y 3:1). Con base en los resultados poco exitosos que se obtuvieron con el uso del kit “GeneClean”, se decidió hacer ligaciones proporción 2:1 y 3:1 con la totalidad del ADN digerido sin purificar, es decir directamente de la reacción de digestión. En el Apéndice VI se presentan las reacciones de ligación con las que se obtuvo éxito en las posteriores transformaciones.

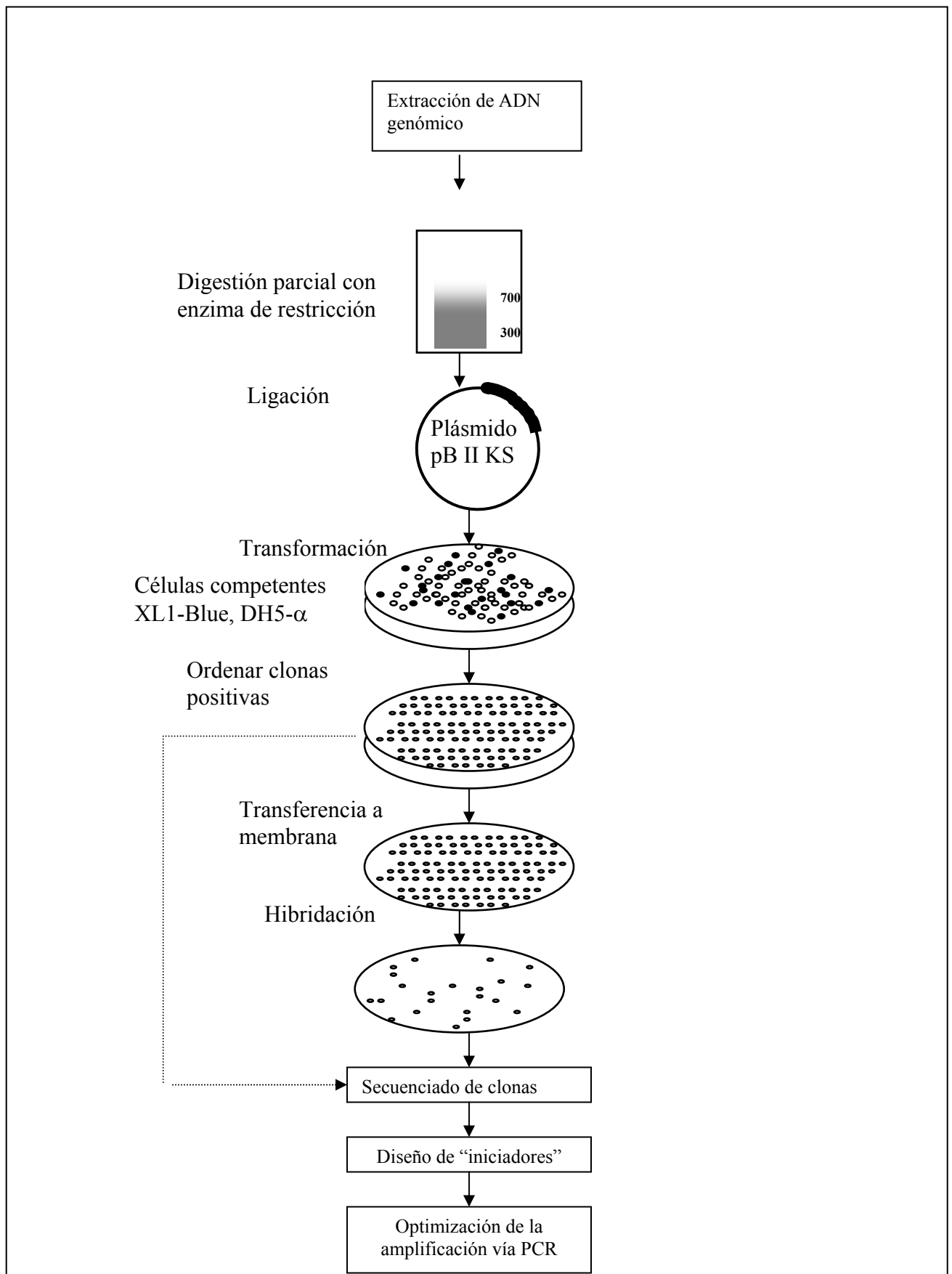


Fig. I.1 Esquema general de la identificación de microsatélites a partir de genotecas o librerías genómicas parciales.

1.3.3.3 Transformación de células competentes con los vectores con inserto

Con las presuntas ligaciones se hicieron siete transformaciones en células competentes XL1-Blue (cuatro intentos) y DH5- α (tres últimos intentos) siguiendo el protocolo de Sambrook et al. (1989) (Apéndice VII). Las diferentes transformaciones se sembraron en cajas con medio LB selectivo (ampicilina, IPTG y X-gal). Se dejó crecer por 20 hrs incubando a 37 °C y se seleccionaron las células con inserto, en donde las colonias blancas son positivas y las azules no poseen inserto.

En el caso de las clonas positivas y para verificar el tamaño del inserto se tomaron 20 clonas al azar para realizar amplificaciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) siguiendo el protocolo descrito por Estoup y Turgeon (1996) (Apéndice VIII).

Para realizar la secuenciación de las clonas positivas, primero se hicieron extracciones de ADN plasmídico siguiendo el protocolo de Sambrook et al. (1989) más modificaciones (Romero-Geraldo, *com. pers.*) (Apéndice IV).

1.3.3.4 Secuenciación del inserto de ADN de camarón

Para la búsqueda de regiones microsatélite se siguieron dos estrategias:

A) Secuenciado directo de clonas

De la placa I de la genoteca *Sau3AI* se secuenciaron al azar 22 clonas sin hacer ninguna selección previa.

El ADN extraído fue marcado para secuencia con el kit “Big Dye” (Perkin Elmer) usando por reacción 700 ng de ADN y 5 pmolas del *iniciador T3*. La reacción de secuencia se llevó a cabo en un secuenciador automático de capilar ABI Prism 310

(Perkin Elmer). Para las clonas con insertos de gran tamaño (> 600 pb) se realizó el secuenciado del complemento inverso con el *iniciador T7*.

B) Secuenciado de clonas positivas después de hibridar

Se usaron dos sondas, (CT)₁₀ y (GT)₁₀, las cuales fueron previamente marcadas con biotina con el Kit “NEBiot Phototope” (Apéndice IX). De cada una de las 10 placas de la genoteca *Sau3A1* se hicieron transferencias a membrana de nylon (Nytran) (Apéndice X) e hibridaciones simultaneas con ambas sondas marcadas (Apéndice XI) en donde se espera que la sonda se una a las regiones homólogas (microsatélites) del ADN de camarón insertado en las clonas bacterianas. Las colonias positivas fueron visualizadas por quimioluminiscencia usando el kit “Phototope-Star Detection” (New England Biolabs) y revelando en películas de rayos X (KODAK) (Apéndice XI). El secuenciado se realizó de manera similar a lo descrito en la estrategia A.

1.3.4 Análisis de secuencias y diseño de iniciadores

Las secuencias obtenidas se analizaron en el programa “Chromas” Ver 1.62 (Technelysium Pty Ltd) disponible en: www.technelysium.com.au/index.html, para localizar el inserto de ADN de camarón sobre el vector y a su vez las regiones microsatélite. A partir de las secuencias con regiones microsatélites se diseñaron *iniciadores* en cada uno de sus extremos para amplificar estas regiones por PCR. Los *iniciadores* se diseñaron usando el programa en línea “Primer 3” (Rozen y Skaletsky, 2000) (www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html), partiendo de las especificaciones originales del programa (*iniciadores* óptimos de 20 pb, temperatura de alineamiento óptima de 60° C, contenido de GC 20-80 %) y modificándolas en función de las limitaciones de cada secuencia.

I.3.5 Estandarización de amplificaciones de ADN mediante PCR

Para la estandarización de las amplificaciones de las diferentes regiones microsatélites mediante *PCR* se usaron cinco organismos, los pares de *iniciadores* (derecho *F* y reversa *R*, sintetizados en la Unidad de Síntesis de Oligos del Instituto de Biotecnología de la UNAM ó con la compañía Sigma-Genosys), y diferentes concentraciones de reactivos (Tabla I.1). Las condiciones manejadas en el termociclador (GeneAmp PCR System 9700 PE) fueron: 4 min a 94° C, seguidos de 35-40 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min de temperatura de alineamiento (50-58 °C), 1-2 min a 72 °C , y una extensión final de 5 min a 72 °C.

Tabla I.1 Estandarización de amplificaciones de microsatélites mediante PCR

Reactivo	Cantidad
ADN de camarón	10 - 100 ng (0.5 - 3 µl de extracto de ADN)
<i>Iniciadores (F y R)</i>	0.25 - 0.5 pmol/µl
dNTP	0.2mM
MgCl ₂	1.5 - 3.0 mM
Buffer 10X (Tris-HCl 100 mM, MgCl ₂ 15 mM, KCl, 500 mM, ph 8.3)	2.5 µl
Taq polimerasa	0.04 - 0.5 Unidades/µl
Vol. de la reacción 25 µl	

La presencia de productos se evaluó en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV. El número de productos de *PCR* (bandas) y su tamaño se evaluó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6 % y urea 7.5 M (Apéndice XII). La visualización de los productos se evaluó con dos metodologías, a) tiñendo los

geles con SybrGreen y observando en un transiluminador “Dark Reader” (Clare Chemical Inc.) (Apéndice XIII), y b) revelando por quimioluminiscencia usando *iniciadores* biotinilados (Apéndice XIV).

Los microsatélites amplificados exitosamente fueron analizados en diferentes muestras de de 17 a 47 individuos provenientes de una granja de cultivo. Se estimó la heterocigosidad observada (H_o), la heterocigosidad esperada (H_e), y el número de alelos (n_A) para cada microsatélite, usando el programa POPGENE versión 1.32 (Yeh et al., 1999).

I.4 Resultados

I.4.1 Estrategias para la identificación de microsatélites

I.4.1.1 A partir de microsatélites previamente reportados.

En el apéndice XV se presentan los resultados de las búsquedas bibliográficas y en el GenBank de microsatélites identificados hasta el año 2000 para diferentes especies de peneidos y que amplifican en *L. vannamei*. Seis de los once microsatélites reportados han sido identificados primeramente en otras especies de peneidos y posteriormente amplificados en *L. vannamei* usando los mismos *iniciadores*. De los cinco microsatélites reportados para *L. vannamei*, solamente se cuenta con la secuencia de tres en el GenBank sin especificar *iniciadores* para su amplificación, además de que no existe el respaldo de una publicación científica. El microsatélite reportado por Bagshaw y Buckholt (1997) inmerso en una región satélite (PVS1), no puede ser amplificado de manera individual como se explicará más adelante. El microsatélite *MI* ya ha sido probado exitosamente en diferentes familias de *L. vannamei*, comprobándose su herencia y utilidad para el seguimiento de pedigríes y análisis de variabilidad genética (Wolfus et al., 1997).

Por tanto, hasta el año 2000 existían 10 microsatélites reportados en peneidos potencialmente polimórficos que podían ser usados para análisis de variabilidad genética y dar seguimiento de pedigríes. De esta manera se intentaron amplificar los microsatélites *MI* (Wolfus et al., 1997) y *Pse0002* (Ball et al., 1998) siguiendo las indicaciones de los autores. Sin embargo no se obtuvieron patrones de bandeo claros en los primeros intentos, por lo que quedó pendiente su estandarización bajo nuestras condiciones (visualización por quimioluminiscencia), abocándonos principalmente a la identificación de nuevos microsatélites.

I.4.1.2 A partir de una genoteca parcial con Sau3A1

Después de varios ensayos para determinar la concentración, el tiempo de incubación y el número de dosis de la enzima de restricción (*Sau3AI*), se lograron digestiones con una mayor concentración de fragmentos de ADN en la región de 300 a 900 pb.

La incubación (30 min) previa del ADN a 65° C y la digestión a 37° C por 2 horas con dos dosis de enzima (1 µl cada hora) proporcionó los mejores resultados (Ver Apéndice III).

En ninguno de los ensayos de ligación realizados a partir de los fragmentos purificados (300 a 900 pb) con el kit “GeneClean” se obtuvieron colonias positivas. Lo anterior sugiere que durante la purificación con “GeneClean” se dañaron las terminaciones *Sau3AI* de los fragmentos, por lo que no se pudieron ligar con el plásmido ya que no tenían terminaciones compatibles. En cambio en los ensayos a partir de ligaciones con la totalidad del ADN digerido, es decir sin purificar mediante “GeneClean”, en las relaciones inserto:plásmido 2:1 y 3:1, se obtuvieron clonas positivas con inserto, el 24 y 29 % respectivamente del total de clonas en cada ensayo. En la proporción 2:1 se observó una mayor abundancia de clonas, siete veces más que en la proporción 3:1. De la suma de ambas ligaciones se conformó una genoteca parcial del camarón blanco, con aproximadamente 2000 clonas distribuidas en 10 cajas de petri con medio LB, ampicilina, X-Gal, IPTG, con 200 clonas por caja. El tamaño de la mayoría de los fragmentos de ADN de la genoteca se estimó entre 300 y 600 pb (Apéndice VIII, Fig.I.2). Esta genoteca se almacenó a 4° C y se resembró en cajas frescas cada 2 meses.

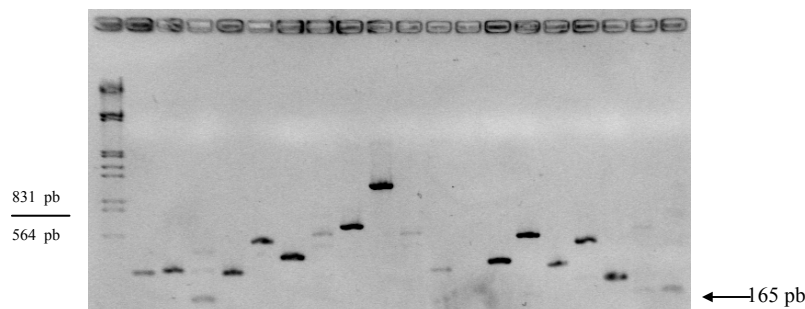


Fig. I.2 Estimación del tamaño de los fragmentos de ADN de camarón de la genoteca parcial con *Sau3AI* mediante la amplificación de 18 clonas tomadas al azar de la región comprendida entre los iniciadores *T3* y *T7* del plásmido pKS II. En el primer carril se tiene una escalera de ADN y en el último un plásmido sin inserto (165 pb).

1.4.1.2.1 Estrategia A). Secuenciado directo de clonas..

Se secuenciaron 22 clonas, de las cuales 16 presentaron regiones microsatélites (Apéndice XVI). De éstas, nueve presentaron diez regiones de un mismo microsatélite (CCTAA)_n incluido en una secuencia satélite previamente caracterizada por Bagshaw y Buckholt (1997), llamada PVS1. Se observaron 20 regiones microsatélites no reportadas repartidas en 13 clonas, siendo principalmente secuencias de 2 pb de pocas repeticiones (< 10), correspondiendo a un 60 % del total (Tabla I.2). Dentro de los microsatélites dinucleótidos se observó un 50 % de microsatélites (TA)_n, 41.66 % de (CT)_n, y 8.33 % de (GT)_n. Se observaron seis secuencias de tres nucleótidos (30 %), un tetranucleótido de ocho repeticiones (5 %) y un pentanucleótido (5 %) de cuatro repeticiones (Tabla I.2).

1.4.1.2.2 Estrategia B). Secuenciado de clonas positivas después de hibridar con (CT)₁₀ y (GT)₁₀

Se secuenciaron 68 clonas presuntamente positivas que contenían regiones (CT)_n y/o (GT)₁₀ o bien (GA)_n y/o (CA)_n respectivamente. En 60 clonas se observaron éstas y otras regiones microsatélite (Apéndice XVII). Treinta clonas (50 %) presentaron la región satélite/microsatélite (CCTAA)_n reportada por Bagshaw y Buckholt (1997), ya sea con otras regiones microsatélites (diez clonas) o exclusivamente ésta (veinte clonas). En 40 de las clonas se observó un total de 99 regiones microsatélites, principalmente de dinucleótidos (58.59 %) (Tabla I.2). De los microsatélites dinucleótidos, el 41.38 % fueron regiones (CT)_n, 27.59 % (GT)_n, 20.69 % (AT)_n y 10.34 % regiones (GC)_n (Fig. I.3a). En lo que respecta a microsatélites de repeticiones mas grandes se observaron once diferentes variantes de trinucleótidos (27.27%), la mayoría con más de tres repeticiones (Fig. I.3b) y siete diferentes variantes de tetranucleótidos (10.1 %) (Fig. I.3c), así como dos regiones de pentanucleótidos, un hexanucleótido y un >octanucleótido (Fig. I.3d). Al igual que en los microsatélites dinucleótidos, se observó una elevada riqueza en motivos que incluían CT tanto en los trinucleótidos (CCT, CTT, TTC, CAT) como en los tetranucleótidos (CCTT, CTAT, CTGT, TCCC, CTTT) (Fig. I.3b y I.3c).

Tabla I.2 Resumen de regiones microsatélite identificadas en *L. vannamei* en base a dos estrategias: A) secuenciado de clonas sin hibridar, B) secuenciado de clonas positivas después de hibridar simultáneamente con sondas (GT) y (CT).

Estrategia	Número de repeticiones ⁺															
	Di-				Tri-				Tetra-				> Penta-nucleótidos			
	a	b	c	d	a	b	c	a	b	c	b	c				
A)	(CT) (GT) (TA) Σ	1 1 2	3 6 9	1 1	(ACG) (AGC) (GCA) (TCG) (TTA) (TTC) Σ	1 1 1 1 1 5	 1 1	(GAAA) Σ	1 1	(CCTAA) (GAAAA) Σ	10* 1 1					
Subtotales	12 (60 %)				6 (30 %)			1 (5 %)			1 (5 %)					
Total estrategia											20					
B)	(CT) (GC) (GT) (TA) Σ	2 4 5 2 13	8 2 7 3 20	4 1 3 8	10 3 4 17	(ACG) (ATT) (CAA) (CAC) (CAT) (CGG) (CGT) (CTT) (GCA) (TAA) (TTC) Σ	1 1 1 2 3 2 3 2 10	1 2 1 1 1 2 1 5	(AGGG) (CCTT) (CTAT) (CTGT) (CTTT) (GATA) (TCCC) Σ	1 1 1 2 1 1 4	(CCTAA) (TTAAA) (ATCATT) (CCAAAA) Σ	1 1 1 1 4	30*			
Subtotales	58 (58.59 %)				27 (27.27 %)			10 (10.10 %)			4 (4.04 %)					
Total estrategia											99					
A) y B)																
Subtotales	70 (58.82 %)				33 (27.73 %)			11 (9.25 %)			5 (4.20 %)					
Total general											119					

⁺ Número de repeticiones: a, 3; b, 4-10; c, 11-20; d, >20.

* Microsatélite PVS1 previamente reportado (Bagshaw y Buckholt, 1997).

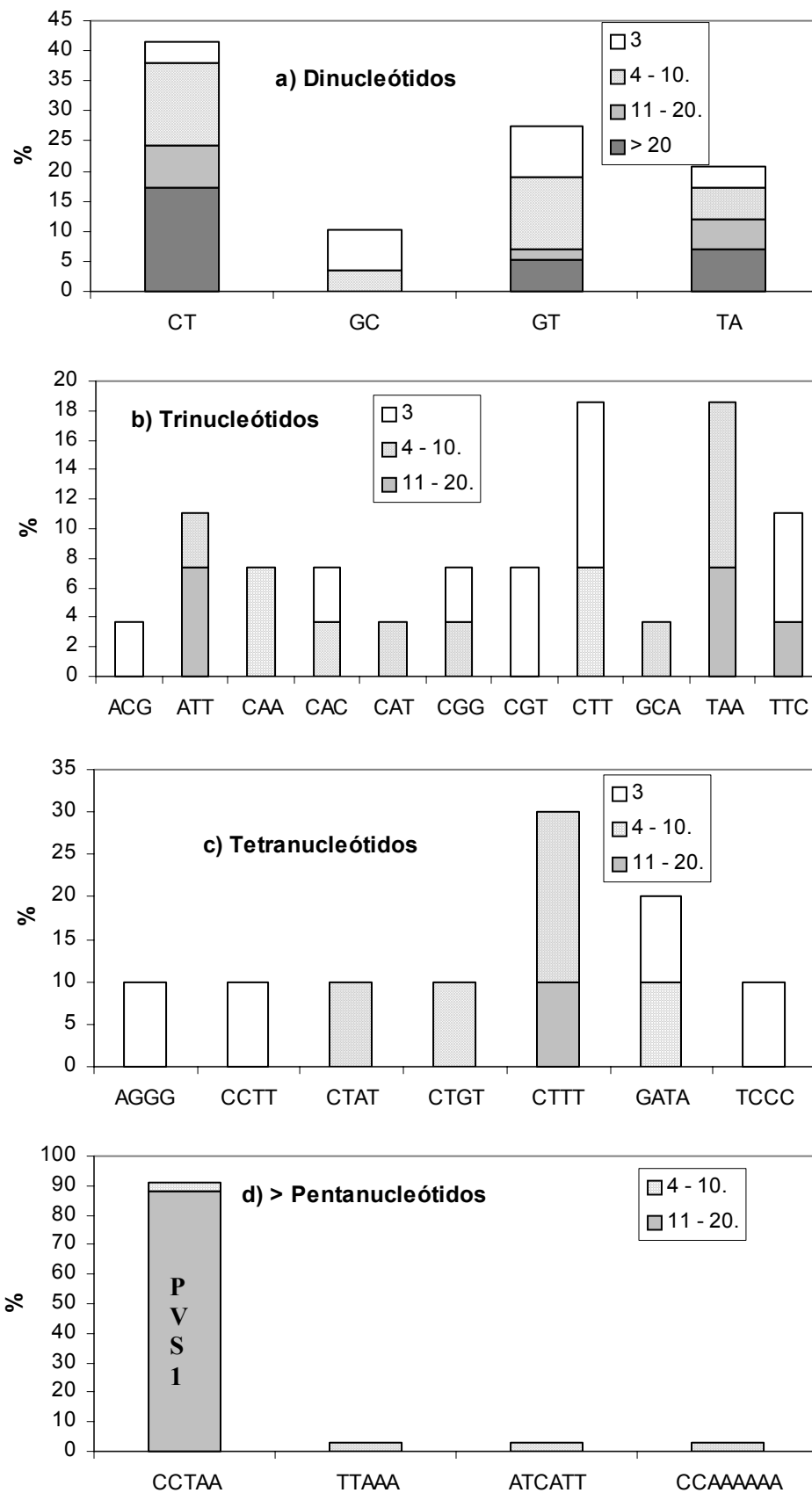


Fig. I.3 Diferentes regiones microsatélites observadas en la estrategia B y su frecuencia clasificándolas en base al tamaño de la parte repetitiva y el número de repeticiones. a) Dinucleótidos, b) Trinucleótidos, c) Tetranucleótidos y d) > Pentanucleótidos. PVS1 es un microsatélite previamente reportado (Bagshaw y Buckholt, 1997).

En general, la mayoría de las regiones microsatélites fueron de mas de tres repeticiones (72 de 99) (Tabla I.2). En la fig.I. 4 se observa la elevada frecuencia de tri-, tetra- y penta-nucleótidos, siendo el 41.18 % de las regiones microsatélites identificadas *de novo*. La frecuencia de los microsatélites pentanucleótidos se ve sobreestimada por la presencia del microsatélite (CCTAA)_n, reportado por Bagshaw y Buckholt (1997), como región PVS1 (Fig. I.4).

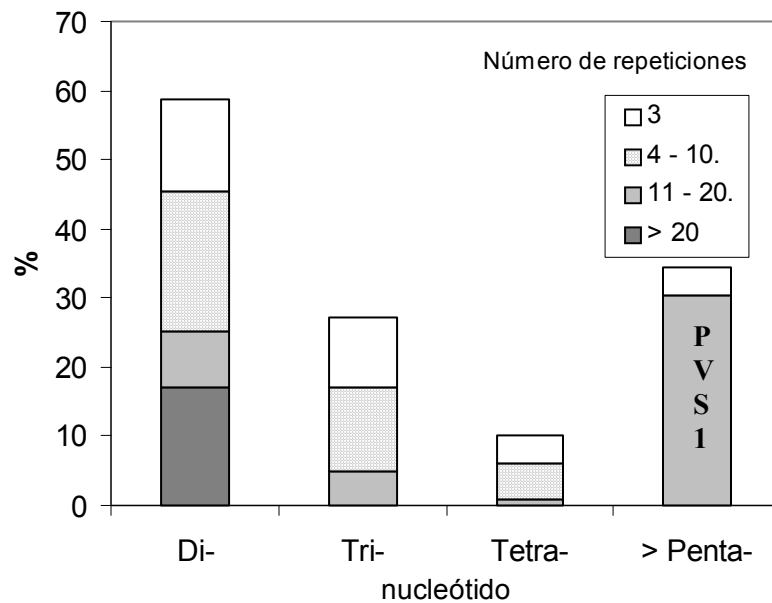


Fig. I.4 Frecuencia de los diferentes microsatélites de acuerdo al tamaño de la repetición (di-, tri-, tetra- o penta-nucleótido) y el número de repeticiones. PVS1 es un microsatélite (CCTAA)_n previamente reportado (Bagshaw y Buckholt, 1997).

Cinco de las clonas (*Pvan0296*, *Pvan1003*, *Pvan1004*, *Pvan1209*, *Pvan1351*) que presentaron microsatélites de gran número de repeticiones se caracterizaron por presentar diferentes regiones medulares, lo cual originaba secuencias microsatélites de gran extensión, superiores a 500 pb. En estas se observaron regiones de repeticiones perfectas con ciertas intercalaciones de otros motivos y en algunos casos una transición entre una región medular a otra (Apéndice XVII). Esto parece indicar que existen regiones mas propensas a sufrir mutaciones debidas a errores al momento de la replicación.

En lo que respecta a la perfección de las regiones microsatélites en *L. vannamei* la mayoría de estas fueron imperfectas, en ambas estrategias. Lo anterior se debe a que

conforme un microsatélite tiene mayor número de repeticiones es más probable que se presenten interrupciones. Por otro lado con la estrategia B se observaron microsatélites compuestos los cuales en varios casos se caracterizaron por su gran tamaño (Fig. I.5).

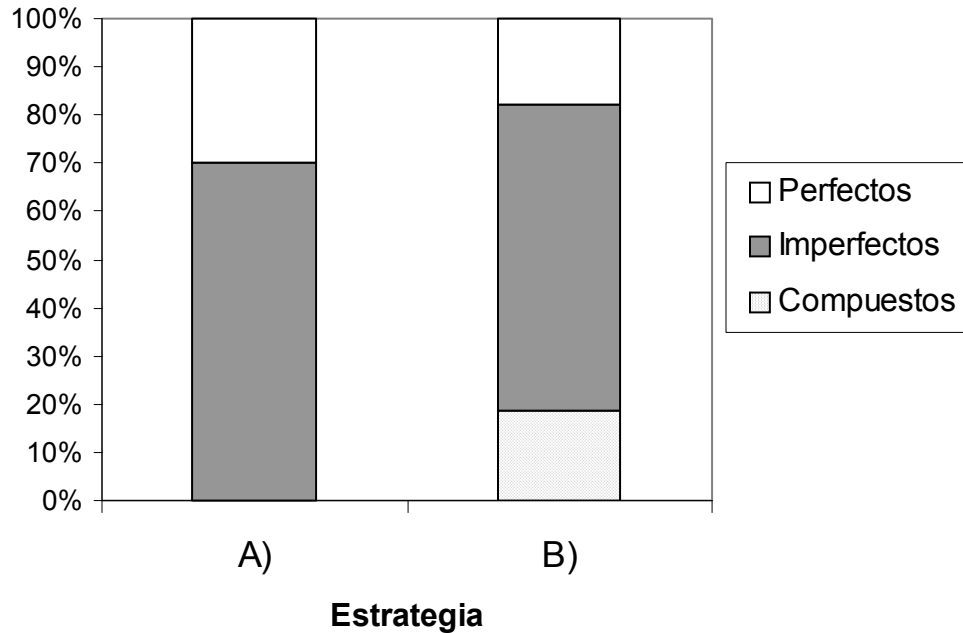


Fig. I.5 Perfección de las regiones microsatélites en *L. vannamei* en las estrategias A y B.

Además de las regiones microsatélites encontradas, también se identificó una región minisatélite en la clona *Pvan1895* (Apéndice XVII), en donde se observa una secuencia de 43 pb repetida en tandem 6 veces.

1.4.2 Análisis de secuencias y diseño de iniciadores

En las 55 clonas (13 estrategia A y 40 estrategia B) con regiones microsatélites, se lograron diseñar iniciadores para 31 microsatélites (Apéndice XVIII), siguiendo el criterio de diseñar *iniciadores* solo para aquellos microsatélites que tuvieran más de tres repeticiones sin importar su perfección.

En las cinco clonas previamente señaladas ricas en regiones microsatélites de gran extensión, fue recomendable diseñar *iniciadores* no solamente para toda la secuencia clonada sino para las diferentes regiones microsatélite incluidas, con la finalidad de obtener productos de *PCR* de no más de 500 pb, ya que productos mas grandes son difíciles de analizar en los geles de poliacrilamida. De esta manera, estas regiones microsatélite de una misma clona se distinguen por las letras **a**, **b** y **c** posteriores a la clave de la clona (Apéndice XVIII).

En la mitad de las secuencias con microsatélites (16) fue difícil diseñar *iniciadores* con características óptimas. En una de estas secuencias (*Pvan0040*), los dos *iniciadores* diseñados presentaron una temperatura de alineamiento muy baja (T_m alrededor de 40° C), además de un bajo porcentaje de GC. En quince de estas secuencias el diseño de al menos uno de los *iniciadores* se vio forzado debido a que las regiones microsatélite estaban cercanas al punto de inserción con el plásmido, o estas mismas se prolongaban imperfectamente a lo largo de toda la secuencia, por lo que la secuencia de los iniciadores incluye ciertos nucleótidos repetidos.

En diez de las clonas con microsatélites de gran número de repeticiones o compuestos fue imposible diseñar al menos uno de los *iniciadores* para su amplificación (Apéndice XIX), debido a que la región microsatélite iniciaba muy cercana al punto de inserción en el plásmido o cercana a la región de Bagshaw y Buckholt (1997), no habiendo suficiente secuencia de ADN de camarón. Para una secuencia en particular de gran número de repeticiones (*Pvan1405*), solo había una región de 20 pb (entre la secuencia del plásmido y el microsatélite) disponible para diseñar el *iniciador* F, por lo que su temperatura de alineamiento ($T_m = 34.98^\circ \text{C}$) fue muy baja lo cual no garantiza una elevada especificidad y por ende amplificación del producto deseado. Por tanto los *iniciadores* de este microsatélite no fueron sintetizados.

Por lo tanto, de los 31 pares de *iniciadores* diseñados, se sintetizaron 24, ya que siete (*Pvan1003c*, *Pvan1211*, *Pvan1341*, *Pvan1535*, *Pvan1597*, *Pvan1877* y *Pvan1900*) tuvieron un diseño muy forzado. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de estandarizarlos.

1.4.3 Estandarización de amplificaciones de ADN mediante PCR

Durante la estandarización de las amplificaciones los productos resultantes fueron visualizados inicialmente tiñendo con SybrGreen y leyendo en un transiluminador Dark-Reader (Apéndice XIII). Esta técnica permitió identificar si se amplificaban productos alrededor del tamaño esperado, es decir del tamaño de la secuencia clonada. Sin embargo, la resolución fue muy baja, no permitiendo identificar con claridad las diferentes variantes alélicas, además de que el registro fotográfico fue de muy baja calidad. Por lo anterior, en los microsatélites en que la visualización con el método anterior fue de baja calidad se decidió evaluarlos mediante quimioluminiscencia (Apéndice XIV), lo cual implica sintetizar los *iniciadores* R biotinilados en la posición 5' y más tiempo de procesamiento, sin embargo la calidad de las imágenes obtenidas fue muy superior.

Después de probar 24 pares de *iniciadores* del Apéndice XVIII, trece dieron productos mediante *PCR*, de los cuales basándose en el tamaño esperado siete se confirmaron como las regiones microsatélite buscadas, los seis restantes dieron productos inconsistentes generalmente de mucho mayor tamaño al esperado.

Como resultado final de la estandarización, las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo en un volumen de 25 μ l (50 ng de ADN, Tris-HCl 10mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 20 μ M de cada dNTP, 1 unidad de *Taq* polimerasa ROCHE, y 7.5 pmol de cada “iniciador”). Las condiciones finales del *PCR* fueron: 4 min a 94° C, seguidos de 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min de temperatura de alineamiento (Tabla I.3), 1 min a 72 °C , y una extensión final de 5 min a 72 °C.

En la tabla I.3 y Fig. I.6 se presentan los siete microsatélites identificados y amplificados por *PCR* para una muestra de camarones cultivados. De estos, cinco fueron polimórficos (*Pvan0013*, *Pvan0040*, *Pvan1003*, *Pvan1758*, *Pvan1815*), uno monomórfico (*Pvan0014*) y uno presentó un patrón de bandeo difícil de interpretar (*Pvan0020*). Específicamente, en cuanto al número de alelos (n_A), el locus *Pvan0014* presentó uno solo (monomórfico), los locus *Pvan0013*, *Pvan0040*, *Pvan1003* presentaron un

moderado polimorfismo con dos a seis alelos, y los loci *Pvan1758* y *Pvan1815* un mayor polimorfismo con mas de 10 alelos.

Se observó un déficit de heterocigotos ($He > Ho$) en la mayoría de los loci, lo cual puede ser explicado por la presencia de alelos nulos (ver Capítulo II) y un reducido tamaño de muestra, o debido a que los individuos analizados pertenecían a una población cultivada con organismos mezclados de orígenes inciertos.

Las secuencias de las cinco clonas con microsatélites polimórficos y sus “iniciadores” se depositaron en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), estando accesibles para su consulta. En la Tabla I.3 se presentan las claves de acceso del GenBank para cada microsatélite.

Los microsatélites *Pvan1758* y *Pvan1815* presentaron la mayor variabilidad (heterocigosidad y número de alelos) por lo que fueron útiles para evaluar la variabilidad genética en el programa de mejoramiento de camarón blanco (Capítulo III); los tres marcadores polimórficos restantes están siendo evaluados en análisis de variabilidad genética en poblaciones naturales.

Tabla I.3 Microsatélites obtenidos en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. ¹Estrategia a); ² Estrategia b); T_a , temperatura de alineamiento; n , número de individuos; n_A , número de alelos; H_o , heterocigosidad observada; H_e , heterocigosidad esperada.

Locus	Repetición	Secuencia de “iniciador” (5’-3’)	T_a (°C)	n	n_A	Rango tamaño (bp)	H_o	H_e	No. de acceso GenBank
<i>Pvan0013</i> ¹	(TA) ₅ ...(AT) ₄	F: TGCTCTGGTAACGACAAACG R: AGACCTGTGGCGAAGTGC	55	17	2	282-284	0.06	0.50	AY062929
<i>Pvan0014</i> ¹	(CT) ₃ ...(GA) ₄	F: GATCGTGAGATACCCAACTC R: CGAGGGAATAACAGGGTT	55	25	1 ^a	170	0	0	
<i>Pvan0020</i> ¹	(AT) ₈	F: GGGGGTTATCCCCATATAC R: CACGGTTGGGAGGTAAAG	55	30	b				
<i>Pvan0040</i> ¹	(GAAA) ₈	F: TTTACGATCAGATTGTTC R: GAAATAGAAAATAAAGAAC	45	28	6	145-157	0.18	0.42	AY062926
<i>Pvan1003</i> ²	(GT) ₉ ...(AT) ₂ (GT) ₆	F: ATATTTTCATGCGTTCCGAGG R: GACTATCTCACGCGCCTCTC	56	47	3	145-149	0.55	0.46	AY062927
<i>Pvan1758</i> ²	(T) ₁₀ (TC) ₇ ... (T) ₄ (TC)	F: TATGCTCGTTCCCTTTTGCTT R: TTGAAGGAAAAGTGTGGGG	55	45	14	163-189	0.49	0.72	AY062928
<i>Pvan1815</i> ²	(T) ₇ (CT) ₂ (CTTT) ₄ ... (CT) ₆	F: GATCATTCGCCCCCTCTTTT R: ATCTACGGTTCGAGAGCAGA	55	38	12	126-141	0.53	0.80	AY062925

^a Locus monomórfico.

^b Patrón de bandeo difícil de interpretar.

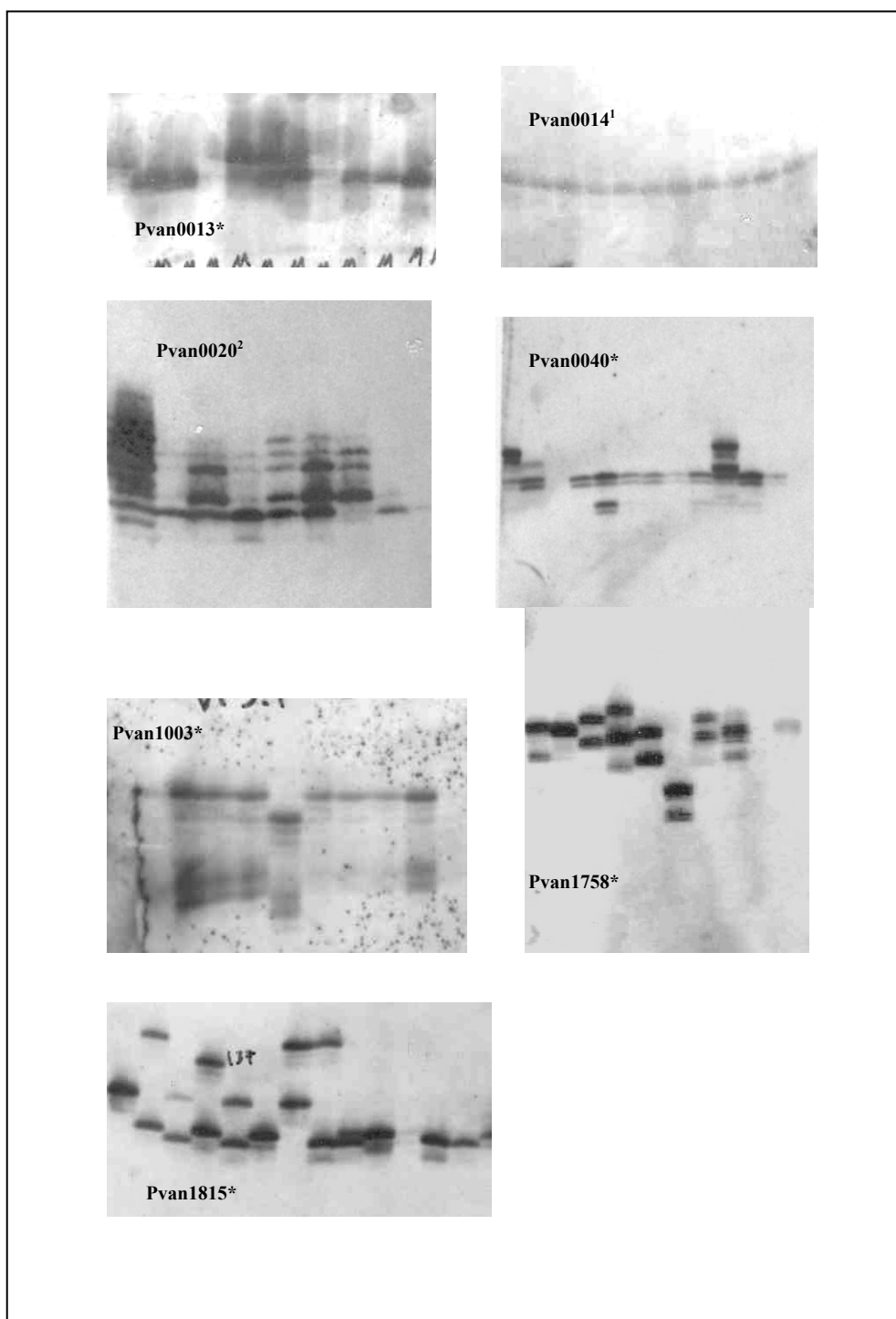


Fig. I.6 Patrones electroforéticos en los 7 microsatélites amplificados en *L. vannamei*. * Loci polimórficos, en donde se observaron mas de un alelo (banda) y es claro distinguir organismos homocigotos (una sola banda) y heterocigotos (dos bandas). ¹Locus monomórfico, una sola banda en todos los organismos y por tanto homocigotos. ²Patrón de bandeo difícil de interpretar.

I.5 Discusión

I.5.1 Éxito en la identificación de microsatélites

En el presente estudio, se secuenciaron aproximadamente 31,121 pb, que representan el 0.0014 % del genoma del camarón blanco *L. vannamei*, de acuerdo con un estimado previo del tamaño del genoma de peneidos de 2.3×10^9 pb (Chow et al., 1990). El éxito en el aislamiento de microsatélites en esta especie, fue similar al obtenido en otros peneidos, basándonos en el número de clonas secuenciadas y los microsatélites finalmente amplificados por PCR (Tabla I.4). Esto es que a partir de una genoteca de 2,000 clonas, y después de secuenciar 90 de éstas, 53 presentaron un total de 119 regiones microsatélites amplificándose por PCR 7 de éstos. En *L. vannamei*, existe otro trabajo en el que se obtuvo un mayor número de microsatélites (94) debido a que se probaron hasta 8 sondas, se secuenciaron más del triple de las secuencias que en el presente estudio, además de que se diseñaron *iniciadores* también para los microsatélites de tan solo 3 repeticiones (Meehan et al., 2003).

Tabla I.4 Éxito en la identificación de microsatélites para diferentes especies de peneidos

Especie	No. de clonas	Estrategia	Clonas secuenciadas		Clonas con microsatélite		Regiones microsatélites identificadas		Microsatélites amplificados por PCR		% de éxito*		Referencia
<i>Litopenaeus vannamei</i>	2,000	Secuenciado directo	22		13		20		4		59.09	} Presente estudio	
		Hibr. con (CT) ₁₀ y (GT) ₁₀	68	90	40	53	99	119	3	7	58.82	58.89	
	1,479	Hibridación con 8 sondas	251		173		573		94		68.92		Meehan et al., 2003
<i>Penaeus monodon</i>	18,000	Hibr. (GT) _n					97		2		—		} Tassanakajon et al., 1998
	2,520	Hibr. (CT) _n					16						
		Secuenciado directo	83		49		99		10		59.04		} Xu et al., 1999
	1,000	Hibr. con (CA) ₁₅ y (CT) ₁₅	30								31.11		
	11,000	Hibr. con 8 sondas de tri y tetranucleótidos	60		28		30		3				
<i>Penaeus setiferus</i>	4,000	Hibr. (GT) ₁₅	55		27		39		6		49.09		Ball et al., 1998
<i>Farfantepenaeus notialis</i>	1,600	Hibr. con 6 sondas	89				15		7		—		Robainas et al., 2002
<i>Litopenaeus schmitti</i>	910	Hibr. con 4 sondas	30		10		16		2		33.33		Espinosa et al., 2001

* % de éxito = (clonas con microsatélite / total de clonas secuenciadas)100.

En varios de los estudios con especies como *P. setiferus*, *F. notialis* y *L. schmitti* a partir de genotecas con 910 a 4,000 clonas se han logrado amplificar de 2 a 7 microsatélites. El camarón tigre *P. monodon*, es la especie en la que mas se han realizado este tipo de estudios, habiendo al menos tres equipos trabajando en la identificación de microsatélites (Tabla I.4). Para ésta última especie se ha obtenido un menor rendimiento en la identificación de microsatélites, ya que a partir de genotecas mas grandes, con 1,000 a 18,000 clonas, se han logrado amplificar mediante PCR únicamente de 2 a 10 microsatélites. En dos de estos estudios se comenta que el principal problema no es la ausencia de regiones microsatélites en el genoma del camarón tigre, sino al contrario son tan largas debido a un elevado número de repeticiones que es difícil de diseñar *iniciadores* (Tassanakajon et al., 1998; Brooker et al., 2000). En esta misma especie, Xu et al. (1999) solventaron el problema diseñando *iniciadores* en las regiones microsatélites a partir de tres repeticiones, los cuales comúnmente no son considerados en la mayoría de los estudios, incrementando así el número de microsatélites amplificados.

En nuestra experiencia, con el secuenciado directo sin hibridar de tan solo 22 clonas logramos amplificar cuatro microsatélites (Tabla I.4); sin embargo, uno de estos no dio patrones de bandeo claros, otro fue monomórfico y los dos restantes presentaron un bajo polimorfismo. Respecto a la estrategia de secuenciado después de hibridar, pareciera que el rendimiento fue menor ya que después de secuenciar 68 presuntas clonas positivas solamente se obtuvieron 3 microsatélites, no obstante, dos de estos presentaron el mayor número de alelos (mayor polimorfismo), además de que fueron los únicos microsatélites útiles para evaluar variabilidad genética en el programa de mejoramiento genético de camarón (Capítulo III). En ambas estrategias existe un efecto azaroso en cuanto a si los microsatélites identificados serán polimórficos o no.

Por otro lado a pesar de que con el secuenciado después de hibridar se identificaron microsatélites con mayor número de repeticiones, al momento del diseño de *iniciadores* para la amplificación por PCR con ambas estrategias se obtuvieron microsatélites de poco número de repeticiones (<20). Por tanto, hasta al momento parece que en *L. vannamei* al igual que lo reportado para *P. monodon*, la principal limitante para obtener marcadores microsatélites ha sido el diseño de *iniciadores* y estandarización de las amplificaciones mediante PCR, sobre todo en las regiones microsatélites de gran número de repeticiones.

Por lo anterior, es importante no descartar las regiones microsatélites de pocas repeticiones, ya que estas son potencialmente polimórficas.

En nuestro caso, otro de los pasos críticos para la identificación de los microsatélites fue la hibridación con sondas marcadas, la cual no fue muy exitosa debido a que solo el 35.29 % (24 de 68) de las presuntas clonas positivas presentaron las regiones buscadas, (CT)_n y (GT)_n, a pesar de que se manejaron condiciones astringentes de temperatura (65° C). En el resto de los estudios con peneidos, aún cuando no lo remarcan en sus resultados, se puede observar que tampoco se obtuvo una elevada eficiencia en la hibridación, ya que el número de clonas con microsatélites es muy inferior al de las clonas secuenciadas (Tabla I.4), además de que no especifican si las regiones microsatélites secuenciadas fueron finalmente las buscadas por hibridación. Si consideramos nuestra información sin las especificaciones anteriores tenemos que el 58.82 % de las clonas secuenciadas en la estrategia B presentaron al menos una región microsatélite no importando si eran las buscadas por hibridación, lo cual está dentro del rango del éxito obtenido en los otros estudios con peneidos (31.11 – 68.92 %) (Tabla I.4).

De acuerdo a nuestros resultados y a lo observado en otros peneidos, para aumentar el éxito en la obtención de microsatélites se recomienda:

- A) Cuando se hagan búsquedas de microsatélites hibridando con sondas, incrementar el número de sondas a probar, pero tener cuidado con la temperatura de hibridación (especificidad) ya que con condiciones muy astringentes es probable que los microsatélites de pocas repeticiones no sean detectados, aunque al otro extremo, bajando la astringencia es probable que se obtengan falsos positivos.
- B) Si se opta por buscar los microsatélites secuenciando clonas al azar sin una previa selección con sondas, tratar de incrementar el esfuerzo, secuenciando un gran número de clonas.
- C) Considerar los microsatélites de pocas repeticiones como potencialmente polimórficos y diseñar *iniciadores* específicos para su amplificación.

Por otro lado, actualmente existen otros métodos para la obtención de microsatélites (revisados por Zane et al., 2002), de los cuales la producción de genotecas enriquecidas con microsatélites ha sido la de mayores rendimientos. En esta técnica, a los fragmentos

de ADN digeridos se les ligan unos adaptadores para amplificarlos y posteriormente seleccionarlos por hibridación con una sonda biotinilada del microsatélite a buscar. De esta manera, por magnetismo o afinidad a la avidina se seleccionan los fragmentos con la región microsatélite, clonando estos únicamente y así obteniendo una genoteca enriquecida. La obtención de microsatélites en *L. vannamei* tendrá que ser evaluada mediante este método tomando en cuenta las consideraciones arriba mencionadas en lo que respecta a la astringencia de las hibridaciones.

1.5.2 Composición, abundancia y distribución de los microsatélites

Asumiendo una distribución uniforme de los microsatélites en el genoma del camarón blanco, observamos una región microsatélite cada 0.25 kb, considerando un total de 29,199 pb secuenciadas y 119 microsatélites identificados. Xu et al (1999) estimaron una abundancia similar mediante el secuenciado directo al azar de una genoteca de *P. monodon*, considerándola como una abundancia elevada. Sin embargo en la misma especie cuando se han usado sondas marcadas para la identificación de microsatélites su frecuencia ha sido menor (1/120 kb) (Brooker et al., 2000). Lo anterior obedece a que al manejar mayor astringencia en la hibridación se reduce el número de microsatélites identificados, sobre todo los de un menor número de repeticiones (Xu et al., 1999). En nuestro caso aún cuando se hicieron hibridaciones, muchas de las presuntas clonas positivas no presentaron las regiones buscadas pero si otros microsatélites de pocas repeticiones, incrementándose así el número de microsatélites identificados.

Con respecto a la abundancia y distribución de los microsatélites en cuanto al tamaño de la parte repetitiva, en total se observaron principalmente microsatélites dinucleótidos, 58.82 % (1/0.42 kb), siendo mas del doble de los trinucleótidos, 27.73 % (1/0.88 kb), seis veces mas que los tetranucleótidos, 9.25 % (1/2.7 kb), y catorce veces mas que los > pentanucleótidos, 4.2 % (1/5.84 kb). Para *P. monodon*, realizando secuenciado directo al azar se obtuvieron abundancias y distribuciones aproximadas a las que obtuvimos en *L. vannamei*, para di- 67 % (1/0.3 kb) , tri- 20 % (1/1.0 kb), tetra- 9 % (1/2.1 kb) y hexa-nucleótidos 3 % (1/6.2 kb) (Xu et al., 1999).

Específicamente para las regiones microsatélites de dinucleótidos en el genoma del camarón blanco, el microsatélite (CT)_n fue el mas abundante seguido de (GT)_n, coincidiendo con lo reportado por Meehan et al. (2003) para esta misma especie, además de que la secuencia CT fue un motivo de otras regiones mas grandes como tri-, tetra- y pentanucleótidos. En contraste, el dinucleótido (GT)_n ha sido mas abundante en otras especies de peneidos como *L. schmitti* (Espinosa-López et al., 2001), y *P. monodon*, aunque para esta última especie la frecuencia de (CT)_n ha sido reportada ligera o significativamente inferior (Xu et al., 1999; Brooker et al., 2000), además de que existe un reporte en el que el dinucleótido CT fue mas abundante (Wuthisuthmethavee, 2000). Tales variaciones en composición y abundancia de estos dinucleótidos para una misma especie son debidas a que en estos estudios se manejaron diferentes estrategias que incluyen el secuenciado de clonas al azar, la hibridación con diferentes sondas o el uso de genotecas enriquecidas, además de diferente número de clonas secuenciadas, aunado también al factor azaroso.

Comparando con otros organismos, como humanos y ratas, se ha observado que las repeticiones de TG/CA son las más comunes, siendo el doble de las repeticiones AT, y hasta tres veces mas frecuentes que las repeticiones de CT/AG (Beckman y Weber, 1992). De igual manera, en *Drosophila melanogaster* el microsatélite mas común es el dinucleotido TG/CA (Schug et al., 1998), mientras que en plantas los microsatélites CT y AT son mas comunes que los de TG (Hancock, 1998). En el grupo de los peces teleósteos el microsatélite mas abundante ha sido TG/CA (Edwards et al., 1998; Nugroho y Taniguchi, 1999), además de observarse regiones microsatélites muy grandes debido a un gran número de repeticiones, en algunos casos hasta del doble del tamaño de las reportadas para mamíferos (Brooker et al., 1994). El origen, así como importancia tal vez “funcional” de estas diferencias en composición de microsatélites entre diferentes taxas no es entendido del todo, sin embargo ya se han observado ciertas regiones de CT/AG que se conservan en mamíferos distantemente relacionados (Stallings, 1995), así como posibles asociaciones de los microsatélites TG/CA con papeles funcionales en la recombinación genética o la modulación de la transcripción (Stallings et al., 1991).

Como nuestro trabajo se enfoca en el desarrollo de marcadores moleculares es importante mencionar que el microsatélite mas abundante en el camarón blanco *L. vannamei* es el

dinucleótido CT/AG, por lo que si se quiere intensificar la búsqueda de microsatélites es posible que se obtenga un mayor número dirigiendo los esfuerzos hacia este dinucleótido, usando genotecas enriquecidas o hibridando con sondas para (CT)_n.

Con respecto a los microsatélites trinucleótidos, los mas abundantes fueron los que poseían motivos de TA: (TAA)_n 18.52 % y (ATT)_n 11.11 %, y motivos de CT: (CTT)_n 18.52 %, (TTC)_n 11.11 %, (CGT) 7.41 % y (CAT)_n 3.7 %.. Para esta misma especie se han observado resultados muy similares, en donde los trinucleótidos mas abundantes han sido (ATT)_n (n=37), (TAT)_n (n=11), (CAT)_n (n=6), (CCT)_n (n=10) entre otros (Meehan et al., 2000).

1.5.3 Elevada presencia del microsatélite (CCTAA)_n

Tanto con el secuenciado directo como con la búsqueda después de hibridar, encontramos muchas clonas con el mismo microsatélite (CCTAA)₁₂₋₁₄. Esta región previamente reportada (PVS1) es un satélite/microsatélite de 160-180 pb y representa 7 % del genoma del camarón (Bagshaw y Buckholt, 1997). En nuestra genoteca parcial, 43.33 % de las clonas secuenciadas (39 de 68) presentaban la región PVS1, estimándose una distribución de 1/0.8 kb. En la fig. I.4, los pentanucleótidos de 10-20 repeticiones corresponden a esta región.

Mas recientemente en otro estudio con *L. vannamei* se observó una frecuencia similar de esta región, reportada como (TAACC/GGTTA)_n, 50.8 % (1/1.19 kb) en clonas secuenciadas al azar (Alcivar-Warren et al., 2003). Los mismos autores comentan que esta región TAACC ha sido previamente reportada en insectos asociada a regiones teloméricas, y análisis preliminares mediante hibridación *in situ* por fluorescencia “FISH” en cromosomas de *L. vannamei* parecen indicar que para esta especie ocurre lo mismo (X. Guo y A. Alcivar-Warren, *com. pers.*). Resultados preliminares usando *iniciadores* que flanquean la región repetitiva de TAACC, han demostrado que este microsatélite puede ser amplificado en ADN de varias especies de peneidos, incluyendo *L. vannamei* y *P. monodon* (Alcivar-Warren, et al. 2003), además de que las amplificaciones parecen ser específicas para cada especie convirtiéndose en un marcador

molecular potencialmente útil para determinar el origen de camarones congelados en el mercado, así como asistir en pruebas de parentesco y pedigrí . Cabe comentar que en todas nuestras secuencias con esta región (CCTAA)_n , las regiones flanqueantes eran exactamente las mismas, puesto que forman parte de la región satélite, por lo que si se diseñaban *iniciadores* estos tenderían a alinearse en todas las regiones PVS1 del genoma del camarón, obteniéndose productos de muy diferentes tamaños, lo cual podría dar patrones de bandeo no muy claros. En contraste, algunas de las clonas con la región TAACC obtenidas en *L. vannamei* por Alcivar-Warren et al. (2003), presentaron regiones únicas que permitieron diseñar *iniciadores* para hacer amplificaciones mas restringidas (*Z. Xu com. pers.*).

A nivel práctico la elevada presencia de la región PVS1 en el genoma del camarón blanco, reduce la posibilidad de encontrar nuevos microsatélites cuando se hacen secuenciados al azar o hibridaciones con baja astringencia, ya que al parecer la sonda (CT)_n se puede hibridar a la región microsatélite (CCTAA)_n. Por lo anterior proponemos la construcción de genotecas cortando con enzimas de restricción que no reconozcan ninguna secuencia de la región PVS1 (p. ej. *HaeIII*, *AluI*, *HincII*, cortando el vector con *SmaI*), de esta manera se reducirá su incidencia, aumentando la posibilidad de encontrar nuevas regiones microsatélite.

1.5.4 Identificación de una región minisatélite

Para nuestro conocimiento el minisatélite observado en la clona *Pvan1895* representa el primer reporte de estas regiones en peneidos. Esta región tiene una secuencia de corte para *Sau3AI*, por lo que el inserto en la clona inicia y termina con GATC. Tradicionalmente los minisatélites por su gran tamaño no son evaluados mediante productos de PCR sino mediante una hibridación con ADN genómico digerido con enzimas de restricción, lo que se conoce como “huella de ADN” (del inglés *DNA fingerprinting*). Esta técnica por el solo hecho de implicar una transferencia de ADN a una membrana para hibridar con la sonda-minisatélite y posteriormente visualizar por métodos radioactivos (o no radioactivos) resulta mas tardada y costosa, sin embargo para análisis de parentesco puede ser de gran utilidad (Bruford et al., 1998). Por tanto su

posible uso deberá de ser evaluado a futuro, así como su localización cromosómica con fines de mapeo.

1.5.5 Perspectivas para el uso de los microsatélites identificados y amplificados por PCR

De los siete microsatélites exitosamente amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), solo seis fueron interpretables, en el sentido de identificar claramente tanto organismos homocigotos (una sola banda-alelo) como heterocigotos (dos bandas-alelos), sin observarse bandas extras confusas.

Los microsatélites de bajo polimorfismo (*Pvan0013*, *Pvan0040*, *Pvan1003*) están siendo evaluados en un estudio de variabilidad genética poblacional (Valles-Jiménez et al., *datos no publicados*), en tanto que los dos mas polimórficos (*Pvan1758*, *Pvan1815*), coincidentemente de repeticiones (CT)_n, fueron evaluados en subsecuentes generaciones de un programa de crianza de camarón blanco (Capítulo III). Estos dos últimos no resultaron ser lo suficientemente polimórficos por si solos o combinados para asignar parentesco dentro del programa de crianza, sin embargo queda pendiente esta aplicación en poblaciones mas variables, además de reforzar la asignación de parentesco de manera combinada una vez que se identifiquen mas marcadores.

Cuando los microsatélites estandarizados fueron analizados en una muestra de individuos de una granja se observó un déficit de heterocigotos en la mayoría de los microsatélites (Tabla I.3), la cual puede ser explicada por la presencia de alelos nulos y un tamaño reducido de muestra o porque se usaron individuos de un stock poblacional entremezclado de origen incierto.

I.6 Conclusiones

1. Se conformó una genoteca parcial *Sau3A1* de 2000 clonas bacterianas con ADN de *Litopenaeus vannamei*, de las cuales se secuenciaron 90 y un 58.89 % mostró regiones microsatélites. Lo anterior representa una abundancia de un microsatélite cada 0.25 kb considerando un total de 29,199 pb secuenciadas.
2. La elevada presencia de una región previamente reportada de un satellite/microsatélite (PVS1) en las clonas (43.33 %) y por ende en el genoma de *L. vannamei* (1/0.8 kb) disminuyó la probabilidad de identificar nuevas regiones microsatélites
3. Se observaron principalmente microsatélites dinucleótidos, 58.82 % (1/0.42 kb), siendo mas del doble de los trinucleótidos, 27.73 % (1/0.88 kb), seis veces mas que los tetranucleótidos, 9.25 % (1/2.7 kb), y catorce veces mas que los > pentanucleótidos, 4.2 % (1/5.84 kb)
4. El microsatélite (CT)_n fue el mas abundante seguido de (GT)_n,
5. En cuanto al rendimiento final en la obtención de microsatélites y amplificación de ADN por *PCR*, después de secuenciar 90 clonas, identificar 119 regiones microsatélites en 56 de éstas, y evaluar 24 pares de *iniciadores* se lograron amplificar siete microsatélites, de los cuales seis presentaron claros patrones de bandeo.
6. Se obtuvieron cinco microsatélites polimórficos por lo que tienen un elevado potencial para la evaluación de variabilidad genética en poblaciones naturales de *L. vannamei*. Los dos mas polimórficos (*Pvan1758* y *Pvan1815*) fueron aplicados para evaluar variabilidad genética en generaciones cultivadas consecutivamente (Capítulo III).

I.7 Recomendaciones

Generalizando de lo antes expuesto, para la identificación de microsatélites en *L. vannamei* se recomienda (Fig. I.7):

1. Para obtener un ADN libre de pigmentos y por ende de mayor pureza, es importante remover inicialmente estructuras quitinadas (cutícula), además de agregar CTAB.
2. Identificar microsatélites a partir de genotecas construidas a partir de la digestión con enzimas de restricción que no reconozcan la región PVS1 (p. ej. *HaeIII*, *AluI*, *HincII*, cortando el vector con *SmaI*). Al momento de digerir el ADN, una incubación previa a 65° C ayuda a su desempaquetamiento, facilitándose la acción de las enzimas de restricción.
3. Si consideramos la problemática existente para el diseño de *iniciadores* en regiones microsatélite con muchas repeticiones, las cuales son fácilmente encontradas por hibridación, y si consideramos que los microsatélites son abundantes en esta especie (1/ 250 pb), la estrategia de secuenciado al azar es una buena opción para la obtención de microsatélites de pocas repeticiones.
4. En caso de que no se cuenten con los recursos para secuenciar un gran número de clonas, se recomienda secuenciar las clonas resultantes de una hibridación con astringencia moderada con sondas (CT)₁₀, (TAA)₁₀, y (CTT)₁₀, las cuales son regiones abundantes en *L. vannamei*.
5. Diseñar *iniciadores* en las regiones flanqueantes de microsatélites de pocas repeticiones (>3).

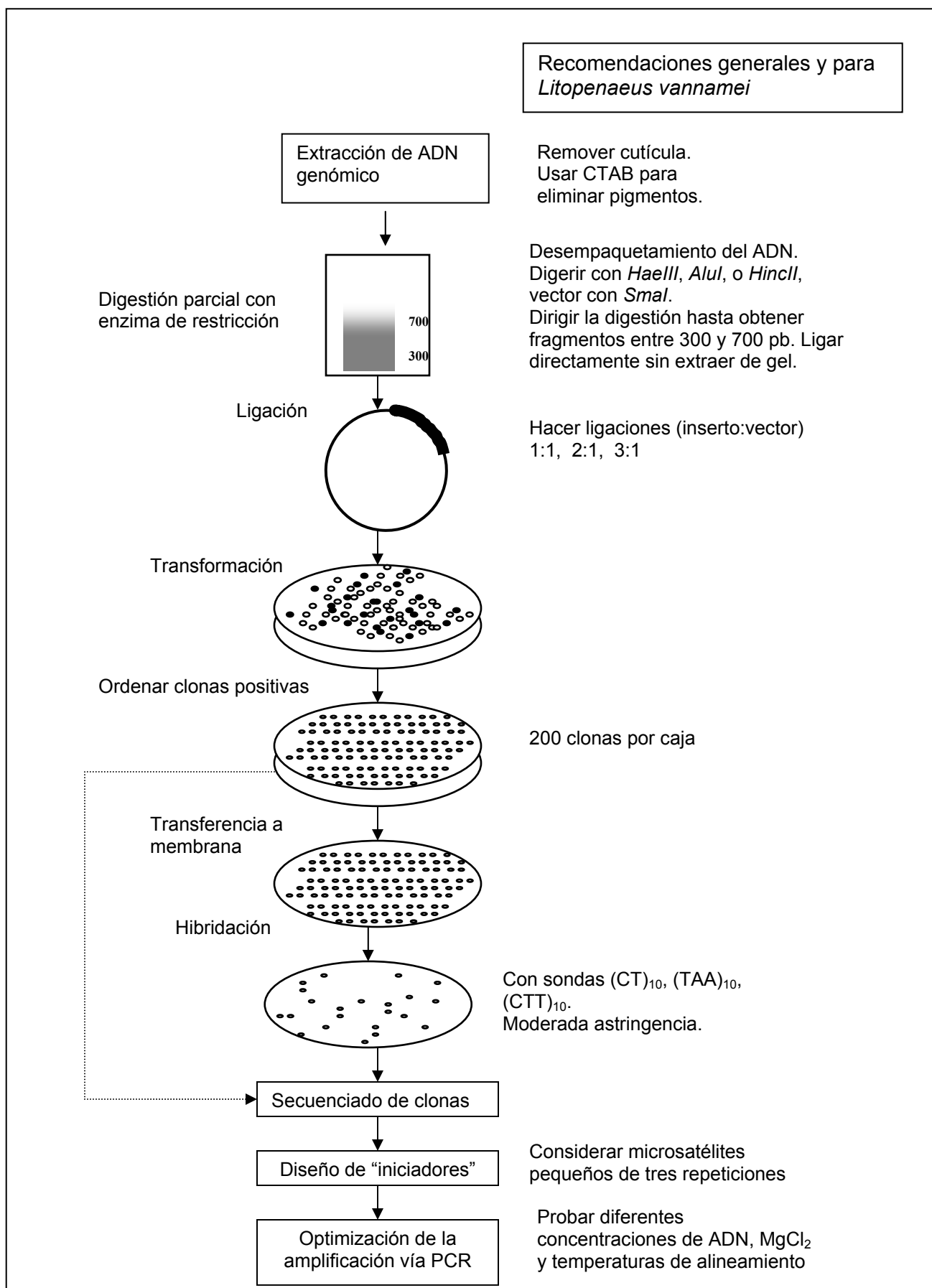


Fig. I.7 Esquema general de la identificación de microsatélites a partir de genotecas parciales, puntualizando en las recomendaciones para *L. vannamei*.

Capítulo II

Optimización de la amplificación por *PCR* y determinación de la herencia mendeliana de los microsatélites *Pvan1758* y *Pvan1815*

II.1 Introducción

La identificación y caracterización de un microsatélite en una especie no garantiza su utilidad posterior, ya que antes hay que diseñar *iniciadores* (del inglés *primer*) en las zonas flanqueantes y verificar si es posible su amplificación mediante “la reacción en cadena de la polimerasa” (del inglés *PCR*) , para ello es necesario hacer diferentes variaciones a la reacción (concentración de ADN y $MgCl_2$ principalmente) y a las condiciones termocíclicas (temperatura de alineamiento, duración y número de ciclos), además de verificar si los productos obtenidos pueden ser interpretados en términos genéticos, es decir identificar genotipos.

Los microsatélites evaluados en geles de acrilamida son analizados por su patrón de bandeo en donde lo ideal es observar una sola banda para los homocigotos y dos bandas para los heterocigotos; sin embargo en muchos casos se observan otras bandas además de las esperadas. Las bandas extras mas comunes son las conocidas como bandas “repetitivas” (en inglés *stutter bands*), las cuales son varias bandas de decreciente intensidad situadas por debajo de la banda principal y son subproductos de la amplificación (Schlotterer, 1998). Esto ocurre principalmente en los microsatélites de elevado número de repeticiones.

Otras bandas extras muy comunes son los productos sin desnaturalizar. Comúnmente los microsatélites se corren en geles bajo condiciones desnaturalizantes, por lo que se analizan los productos desnaturalizados (una sola hebra), con la finalidad de eliminar productos híbridos (heteroduplex) de ambos alelos en los individuos heterocigotos los cuales se pueden generar durante los últimos ciclos del *PCR* (Schlotterer, 1998) . Cuando los productos no son completamente desnaturalizados se observan las bandas desnaturalizadas las cuales son interpretadas y un poco mas abajo las bandas sin desnaturalizar y el heteroduplex que deben de ser ignorados. De esta manera cada banda se interpreta como un alelo, en donde los individuos con una sola banda corresponden a un genotipo de homocigotos y los de dos bandas a heterocigotos.

En lo que respecta a la nomenclatura de los microsatélites, comúnmente se denotan los diferentes alelos por el tamaño del producto de *PCR* referenciados a una secuencia de ADN de tamaño conocido, y para denotar un genotipo ambos alelos se escriben separados por una diagonal; por ejemplo para un homocigoto el genotipo será *130/130* y para un heterocigoto *139/130*.

Una vez que se ha estandarizado la amplificación de un microsatélite y se han interpretado genéticamente sus variantes, si se cuenta con familias es posible verificar si presenta una herencia mendeliana, es decir si es heredado de padres a hijos segregándose en base a lo esperado por las leyes de Mendel. Es importante verificar si los microsatélites se ajustan a una herencia mendeliana sobre todo cuando van a ser usados para comparar la composición genética de organismos en cultivo por varias generaciones (Capítulo III) o cuando se pretende usarlos para determinar parentesco y dar seguimiento de pedigrees (Moore et al., 1999).

Se asume que los microsatélites potencialmente se ajustarán a una segregación mendeliana, ya que son codominantes es decir se observan ambas variantes heredadas por cada padre, y no están ligados al sexo (en tanto no estén en cromosomas sexuales). En la Tabla II.1 se presentan diferentes cruza y sus progenies y las segregaciones esperadas en base a Mendel, considerando un diferente número de alelos presente por familia, el cual

puede ir de un solo alelo en el caso de que ambos padres sean homocigotos para el mismo alelo (Cruza 1), hasta cuatro alelos diferentes, en el caso de que los padres sean heterocigotos para alelos diferentes (Cruza 7). La nomenclatura utilizada con fines de simplificación y claridad esta en base a letras y no como la numérica manejada para microsatélites.

Tabla II.1 Proporciones genotípicas en la progenie de diferentes cruza en base a una segregación mendeliana considerando un diferente número de alelos presente en la familia. En los casos de mas de dos alelos solo se ejemplifica con una de las posibles combinaciones de padres.

Cruza	No. alelos	Genotipos parentales		Genotipos en la progenie								Proporción mendeliana
				A/A	A/B	B/B	A/C	A/D	B/C	B/D		
1	1	A/A	A/A	1								1
2	2	A/A	A/B	1/2	1/2							1:1
3	2	A/A	B/B	1							1	
4	2	A/B	A/B	1/4	1/2	1/4						1:2:1
5	3	A/A	B/C	1/2		1/2					1:1	
6	3	A/B	B/C	1/4		1/4	1/4	1/4				1:1:1:1
7	4	A/B	C/D				1/4	1/4	1/4	1/4		1:1:1:1

En caso de no observarse una herencia mendeliana, se puede sospechar la presencia de alelos “nulos”, un aumento o disminución de repeticiones por mutación, o que exista una presión selectiva sobre el microsatélite. Un alelo nulo es esperado cuando los *iniciadores* diseñados fracasan al amplificar el microsatélite en ciertos individuos debido a deleciones o mutaciones puntuales en el sitio de alineamiento de uno de los *iniciadores* para ciertos alelos (Schlotterer, 1998). En peneidos, específicamente para *Litopenaeus vannamei*, solo existe un reporte en el que se han detectado alelos nulos al comparar una progenie con sus presuntos padres (Wolfus et al., 1997). Sin embargo existen varios estudios

poblacionales con peneidos en los que se sospecha la presencia de alelos nulos ya que observan un déficit de heterocigotos posiblemente ocasionado por la no detección de ciertos alelos en los heterocigotos y por ende un registro de homocigotos mayor a lo esperado (Ball et al., 1998, Bierne et al., 2000, Xu et al., 2001).

En el presente Capítulo se estandarizaron las amplificaciones de los microsatélites *Pvan1758* y *Pvan1815* identificados *de novo* (Capítulo I), interpretando alelos y genotipos para los patrones de bandeo observados. Además se evaluó si ambos microsatélites se ajustaban a una segregación mendeliana al evaluar la progenie de tres familias y sus respectivas madres y la posible presencia de alelos nulos. Tales evaluaciones nos permitieron aplicar con confianza estos microsatélites para evaluar la variabilidad genética en un programa de cultivo de camarón por tres generaciones (Capítulo III).

II.2 Objetivos particulares

1. Optimizar las condiciones de amplificación por *PCR* para los microsatélites *Pvan1758* y *Pvan1815*, hasta interpretar correctamente los patrones de bandeo en términos genéticos (variantes alélicas).
2. Determinar si existen alelos nulos en ambos microsatélites.
3. Determinar si los microsatélites utilizados (*Pvan1758* y *Pvan1815*) se ajustan a una herencia mendeliana, al evaluar su segregación alélica en la progenie de tres familias.

II.3 Materiales y Métodos

II.3.1 Optimización de las amplificaciones de los microsatélites Pvan1758 y Pvan1815.

Se trabajó con una muestra de veinte organismos de camarón blanco de una población cultivada en Los Melagos, Son. (*G0*; ver Capítulo III). El ADN fue extraído con el método tradicional de fenol-cloroformo modificado de García et al. (1994) (Apéndice I). Se determinó la concentración del ADN mediante espectrofotometría usando dos equipos alternativos (Beckman DU 640 y Lambda-Bio 20 Perkin Elmer). Los dos loci microsatélites polimórficos identificados previamente en este trabajo de tesis (Capítulo I), *Pvan1758* y *Pvan1815* fueron amplificados mediante la “reacción en cadena de la polimerasa” (del inglés Polymerase Chain Reaction, *PCR*) . Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 PE en reacciones de un volumen final de 12.5 μ l.

Inicialmente se hicieron pruebas variando la cantidad del templado agregado (20, 50 y 100 ng), con las siguientes condiciones constantes Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM (reactivos incluidos en el buffer 10 X), dNTP 20 μ M cada uno, 0.5 unidades de Taq polimerasa (Roche), y 3.75 pmol de cada *iniciador*. Posteriormente, se hicieron pruebas a diferentes temperaturas de alineamiento con un gradiente de 45 a 60°C. Por último se hicieron ensayos a diferentes concentraciones de MgCl₂ (1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM), aumentando la dosis de Buffer 10 X. Las condiciones finales con las que se amplificaron todas las muestras se encuentran en el Apéndice XX. Los *iniciadores* en reversa se encontraban biotinilados en su extremo 5'. Las condiciones termocíclicas para la amplificación se encuentran en el apéndice XX.

Los productos de PCR fueron corridos por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, 7.5 M urea (Apéndice XII) y transferidos a una membrana moderadamente cargada

Nytran N (Scheleicher & Schuell) y visualizados por quimioluminiscencia usando el Kit de detección Phototope-Star (New England Biolabs), y exponiendo en películas de rayos X (Kodak X-Omat) (Apéndice XIV). Se asignó el tamaño de los alelos usando una escalera de secuencia del vector pUC19 obtenida con el kit de secuenciado SequiTherm Cycle (Epicentre Tech.) usando un *iniciador* M13 biotinilado.

II.3.2 Análisis de la herencia mendeliana de los loci-microsatélites

Para determinar si los alelos se heredaban de manera mendeliana en ambos microsatélites (*Pvan1758* y *Pvan1815*), se evaluaron los genotipos de 20 individuos de 1 g de la progenie de tres familias de la G1 (*F7*, *F37* y *F66*) (ver Capítulo III), clasificándolos por clases genotípicas y sus frecuencias. Además se determinó el genotipo de las madres. Los padres no fueron muestreados ya que las familias fueron producidas por desoves masivos, en donde se desconoce qué macho se apareó con cada hembra. Con toda esta información se infirió qué proporción mendeliana era la esperada y se hicieron pruebas de chi-cuadrada usando las frecuencias observadas y esperadas de cada clase genotípica. La ecuación usada con sus respectivos grados de libertad (g.l) (Hartl y Clark, 1997) fue:

$$\text{chi-cuadrada} = \sum_{i=1}^k (O - E)^2 / E \qquad \text{g.l.} = k-1$$

Donde *O* es el número observado de individuos en cada clase genotípica, *E* es el número esperado de individuos en la misma clase genotípica y *k* es el número de clases genotípicas.

II.4 Resultados

II.4.1 Amplificación de los microsatélites

Pese a que en el Capítulo I de esta tesis ya se habían logrado amplificar los microsatélites *Pvan1758* y *Pvan1815*, fue necesario hacer mas pruebas para su estandarización una vez que se hicieran amplificaciones masivas de las muestras. La amplificación de los microsatélites es muy sensible a las concentraciones de ADN en la reacción (Susol et al., 2000), en donde un exceso tiende a inhibir la reacción. Nuestras pruebas arrojaron que con 50 ng por reacción (concentración final en la solución 4 ng/μl) se obtenían patrones claros y constantes entre muestras, aunque hubo ciertas variaciones en intensidad de las bandas, las cuales se asumieron a diferencias en lecturas entre los espectrofotómetros usados.

Por otro lado, ciertas muestras amplificaban muy poco a concentraciones de 1.5 mM de $MgCl_2$, por lo que al incrementarse a 3.0 mM se observó una mayor concentración de productos de PCR. Cabe aclarar que ciertos alelos del locus *Pvan1815* no amplificaban a 1.5mM de $MgCl_2$, lo cual traía consigo que erróneamente se consideraran individuos homocigotos para el otro alelo si amplificado, en tanto que eran realmente heterocigotos. Lo anterior se solucionó al reducir la astringencia de la reacción aumentando la concentración de $MgCl_2$ a 3.0mM. En la fig. II.1 se presenta parte de la progenie de la familia *F37* para el locus *Pvan1815* en productos obtenidos con 1.5mM y 3.0 mM de $MgCl_2$, en donde se ve claramente como ciertos individuos parecen homocigotos *130/130*, pero al aumentar la concentración de sales se observa el alelo *133*, teniendo así el genotipo *133/130*. La presencia del alelo *133* se observaba en la madre (no mostrada en la fig. II.1) por lo que se sospechaba que en la progenie también debería de estar presente (análisis de herencia mendeliana, Tabla II.2).

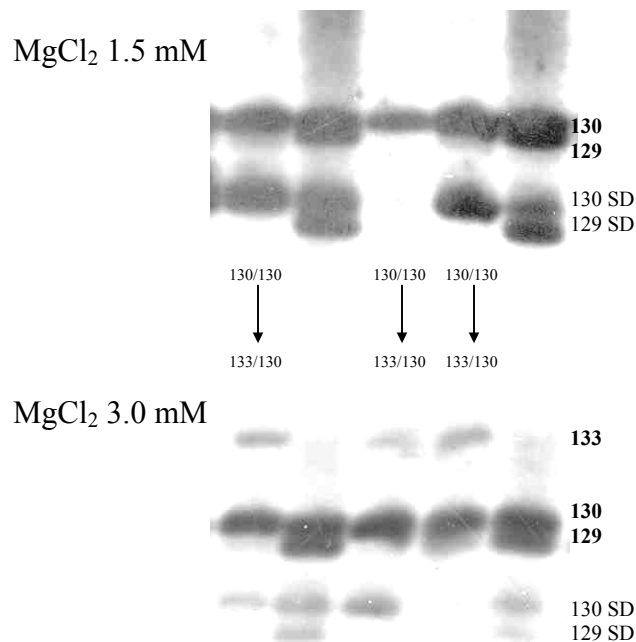


Fig. II.1 Diferencias en la amplificación del locus *Pvan1815* en función de la concentración de MgCl₂. SD: Productos sin desnaturalizar

En la mayoría de nuestros registros finales de los microsatélites en películas de rayos X, se tuvieron las siguientes consideraciones al tomar las lecturas. En los corrimientos de ambos microsatélites se observaban los productos desnaturalizados (que son los que se leían) y un poco mas abajo los productos sin desnaturalizar. Lo anterior inicialmente trajo consigo ciertas dificultades en la interpretación de los patrones de bandeo, pero posteriormente ignorando los productos sin desnaturalizar fue fácil tomar lecturas confiables (Fig. II.2 y II.3). En algunos casos en los organismos heterocigotos se observaba una quinta banda situada entre los dos productos sin desnaturalizar correspondiente al producto híbrido (heteroduplex) de los mismos (individuos 1 y 2, Fig. II.2).

Es probable que la desnaturalización parcial de las muestras se haya dado debido a que no se agregó suficiente formamida a los productos finales de *PCR*, ya que se les adicionaba un cuarto de su volumen de gel de tinción (el cual incluye la formamida), mientras que lo

recomendable es incluir un volumen similar. Lo anterior se hizo para aumentar la cantidad de ADN cargado en gel ya que en las primeras pruebas la señal detectada fue muy baja. Otra peculiaridad observada, es que en algunos casos en los heterocigotos ambos alelos no presentaban la misma amplificación, es decir se observaba una banda mas marcada que otra. En la fig. II.2 para el locus *Pvan1758* en todos los individuos el alelo mas pequeño (174) se amplificó mas que el otro alelo (banda mas ligera). Esta amplificación diferencial en heterocigotos es debida a una amplificación preferencial de los alelos más pequeños y se cree que es debida a que los alelos mas grandes se realinean más rápido ya que contienen más unidades repetitivas, lo cual reduce la eficiencia de la reacción de *PCR* (Fisher et al., 2000).

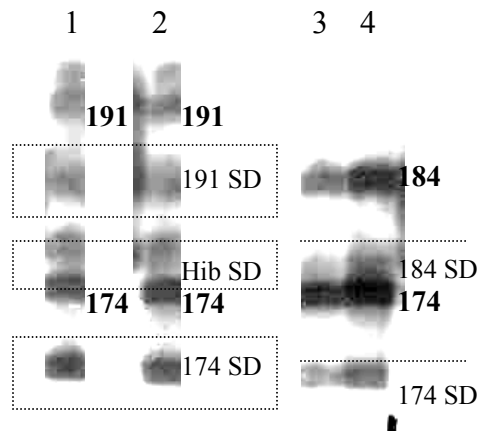


Fig. II.2 Patrones de bandeo observados en el microsatélites *Pvan1758* y su correspondiente interpretación como genotipos: 1) 191/174, 2) 191/174, 3) 184/174, 4) 184/174. Las bandas extras corresponden a productos sin desnaturalizar (SD), además de observarse productos híbridos (Hib) de ambos alelos (individuos 1 y 2).

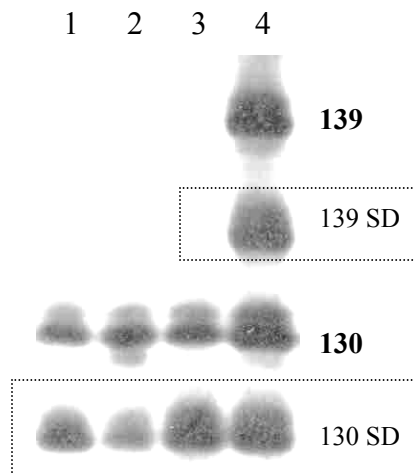


Fig. II.3 Patrones de bandeo observados en el microsatélites *Pvan1815* y su correspondiente interpretación como genotipos: 1) 130/130, 2) 130/130, 3) 130/130, 4) 139/130. Las bandas extras corresponden a productos sin desnaturalizar (SD).

II.4.2 Herencia mendeliana de los loci microsatélites

Las tres familias evaluadas (*F7*, *F37*, y *F66*) se ajustaron a una herencia mendeliana para ambos microsatélites (Tabla II.2). El genotipo de los machos fue inferido del genotipo de la progenie y de las hembras. En las tres familias el locus *Pvan1758* presentó una proporción mendeliana 1:1 en el genotipo de las progenes, y como las hembras presentaron un genotipo homocigoto, los machos fueron inferidos como heterocigotos. Para el locus *Pvan1815* las tres familias también presentaron una proporción mendeliana 1:1, pero en este caso las hembras fueron heterocigotas y los machos se infirieron como homocigotos.

Tabla II.2 Frecuencias genotípicas de los microsatélites en las tres familias G_I y los valores de chi-cuadrada para las proporciones mendelianas esperadas.

Locus	Familia	Genotipo parental		No. observado de individuos en cada clase genotípica		Proporc. esperadas	n	Chi-cuadrada
		Hembra	Macho*					
<i>Pvan1758</i>	7	184/184	191/174	184/174 7	191/184 11	1:1	18	0.88
	37	186/186	190/184	190/186 7	186/184 8	1:1	15	0.07
	66	184/184	187/184	187/184 7	184/184 11	1:1	18	0.88
<i>Pvan1815</i>	7	139/130	129/129	139/129 8	130/129 9	1:1	17	0.06
	37	133/129	130/130	133/130 7	130/129 13	1:1	20	1.80
	66	132/129	130/130	132/130 7	130/129 11	1:1	18	0.88

* Inferido de los genotipos de la progenie y de la hembra.

Valor de Chi-cuadrada ($P < 0.05$): 3.84 para g.l. = 1.

II.5 Discusión

II.5.1 Tendencia hacia alelos nulos en el locus Pvan1815

En el locus *Pvan1815* es muy probable que existan alelos nulos, ya que en las pruebas preliminares pudimos observar que a concentraciones de 1.5 mM de $MgCl_2$ el alelo 133 y en algunos casos el 129 y 130, no eran registrados y solamente a mayores concentraciones de sales (3.0 mM) el alelo se hacía evidente, aunque con menor intensidad al alelo previamente detectado. De esta manera todas las muestras se amplificaron a 3.0 mM para ambos loci reduciendo el riesgo de no registrar algún alelo. Sin embargo debido a que en ambos microsatélites observamos en muestras posteriores (Capítulo III) que en ciertos individuos uno de los alelos fue sobre-amplificado, no podemos descartar que el caso extremo haya ocurrido, cuando solamente uno de los alelos es detectado como una banda muy ligera y el otro este presente pero en tan bajas cantidades que no sea detectado para su registro.

En nuestro caso, pudimos deducir la presencia de un alelo con problemas para su amplificación ya que contábamos con el registro de la madre (en donde si se alcanzó a amplificar ligeramente), y al no observarlo en su progenie (20 individuos) se sospechó su presencia. Existen otros reportes en peneidos en donde se sospechó la presencia de alelos nulos debido a un déficit de heterocigotos (Wolfus et al., 1997, Ball et al., 1998, Bierne et al., 2000, Xu et al., 2001). En *Penaeus stylirostris* se confirmó la presencia de alelos nulos, solucionando el problema al rediseñar unos de los iniciadores para amplificar por *PCR* (Bierne et al., 2000). Específicamente para *L. vannamei*, Wolfus et al. (1997) detectaron un alelo nulo al observar que la progenie de dos presuntos padres homocigotos, no fue completamente heterocigota para la combinación de los alelos paterno y materno, es decir observaron individuos homocigotos para ambos alelos. Sin

embargo no lograron amplificar los alelos nulos pese a diversas modificaciones en el *PCR*.

En estudios posteriores con el microsatélite *Pvan1815* y sobre todo en aquellos poblacionales en donde no se cuenta con padres y progenies, será necesario tomar las consideraciones aquí planteadas para evitar un exceso de alelos nulos, lo cual se puede solucionar tal como en nuestra experiencia, disminuyendo la astringencia en la reacción de *PCR*, favoreciendo así el alineamiento de los *iniciadores* y la acción de la *taq* polimerasa. Aunque se debe de tener cuidado de no llegar al extremo en el que se obtengan productos inespecíficos.

II.5.2 Herencia mendeliana

De diez estudios con microsatélites recién identificados en peneidos para ser usados principalmente para estudios poblacionales (Wolfus et al., 1997; Ball et al., 1998; Moore et al., 1999; Bierne et al., 2000; Brooker et al., 2000; Pogsomboon et al., 2000; Supungul et al., 2000; Espinosa-López et al., 2001; Xu et al., 2001, Robainas, 2002) solamente en tres de estos se evaluó el ajuste a una segregación mendeliana, pudiendo validar su utilidad para análisis de diversidad genética en programas de crianza (Wolfus et al., 1997), dar seguimiento de pedigríes (Moore et al., 1999) y descartar la presencia de alelos nulos para un déficit de heterocigotos en una población silvestre (Supungul et al., 2000).

En nuestro estudio, las tres familias analizadas para ambos loci mostraron un ajuste a una herencia mendeliana resultante de la cruce de un homocigoto con un heterocigoto, en donde se observa en la progenie una similar proporción de solo dos genotipos. En todos los casos, a excepción de uno, se observaron progenies compuestas por dos diferentes heterocigotos, con un alelo en común, lo cual trae consigo una suma total de tres alelos por familia, tal como en la cruce 5 de la Tabla II.1. La excepción fue la familia 66 para el locus *Pvan1758*, en donde la progenie se segrega en un heterocigoto y un homocigoto

para uno de los alelos del primero, siendo en total dos alelos tal como en la cruza 2 de la Tabla II.1.

Teniendo como referencia las posibles cruzas presentadas en la Tabla II.1, la presencia de tres alelos en las progenies para ambos loci (dos diferentes heterocigotos) en la mayoría de nuestros casos puede considerarse como un indicativo de una mediana variabilidad genética, si consideramos que la mas baja variabilidad en una misma familia puede ser de un solo alelo (Cruza 1) en donde toda la progenie es homocigota, seguida de dos alelos (Cruzas 2-4) y la mas elevada determinada por cuatro alelos (Cruza 7) en donde en la progenie se observan cuatro diferentes heterocigotos.

Cuando se analizan exclusivamente las progenies sin considerar el genotipo de la madre es posible inferir el tipo de segregación y posible ajuste mendeliano además de los genotipos de los padres. Sin embargo no se puede determinar cual de los padres será el homocigoto o el heterocigoto, además de que no es posible detectar la presencia de alelos nulos, como en el caso de la familia 37 para el locus *Pvan1815*, en donde inicialmente el alelo 133 no fue detectado en la progenie y se sospechó su presencia una vez que se observó en la madre. Por tanto para verificar si un microsatélite recién identificado presenta una segregación mendeliana es necesario analizar una progenie y al menos uno de los padres.

II.6 Conclusiones

1. En ambos microsatélites se interpretaron correctamente diferentes variantes alélicas y genotipos individuales, considerando la presencia de bandas extras correspondientes a productos sin desnaturalizar.
2. En el locus *Pvan1815*, se observó una tendencia hacia la presencia de alelos nulos, lo cual se resolvió al manejar condiciones menos astringentes en el *PCR* (mayor concentración de $MgCl_2$).
3. Ambos loci-microsatélites analizados (*Pvan1758* y *Pvan1815*) se ajustaron a una herencia mendeliana, al evaluar su segregación alélica en la progenie de tres familias, corroborando con el genotipo materno y logrando inferir el genotipo paterno. Lo anterior aumenta la confiabilidad en el uso de estos microsatélites para evaluaciones de variabilidad genética y seguimiento de pedigríes.

II.7 Recomendaciones

1. En cuanto a la interpretación de los microsatélites en los geles de acrilamida, para eliminar completamente los productos sin desnaturalizar (bandas extras) y hacer mas claras las lecturas será necesario desnaturalizar completamente las muestras, lo cual se puede lograr al aumentar la cantidad de formamida en las muestras listas para cargarse en el gel. Lo ideal es una proporción 1:1 de productos de *PCR* y “tinte de cargado”, y no la proporción 4:1 manejada (ver Apéndice XII).
2. Para determinar si un microsatélite se ajusta a una herencia mendeliana es necesario analizar los genotipos de al menos 20 individuos de una progenie y compararlos con el genotipo de alguno de los padres, infiriendo el genotipo del otro padre. Sin embargo lo ideal sería contar con el genotipo de ambos padres, por lo que en el caso particular del camarón blanco es necesario realizar apareamientos pareados y no masivos o recurrir a la inseminación artificial, lo cual permitirá muestrear con total certeza a ambos padres. Por otro lado para aplicar estos marcadores en otros estudios genéticos, tal como el mapeo genético es necesario contar con ambos padres (ver Perspectivas generales del trabajo).
3. La presencia de alelos nulos, la cual es muy común en microsatélites, solo puede ser corroborada al evaluar el ajuste mendeliano. Por lo que es altamente recomendable en especies cultivadas el conformar varias familias y muestrear padres y progenes para realizar estos estudios. En un microsatélite en el que se han detectado alelos nulos y se ha logrado resolver el problema al manejar diferentes condiciones de *PCR* se tendrá una mayor confianza en su aplicación en diferentes estudios genéticos (ver Perspectivas generales del trabajo).

Capítulo III

Monitoreo de variabilidad genética en tres generaciones de un programa de mejoramiento genético de *Litopenaeus vannamei*

III.1 Introducción

El camarón es el recurso acuacultural mas importante en México, con 47,465 toneladas cultivadas en el 2001 valuadas en 2, 738 millones de pesos (SAGARPA, 2002); siendo el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* la especie mas importante. Desde 1998, con el apoyo del sector productivo (Acuacultores de La Paz, SA) y del gobierno, en el CIBNOR se han llevado a cabo diversos estudios sobre la genética del camarón blanco con fines de incrementar su producción. Estas investigaciones incluyen el establecimiento de un “pie de cría” para iniciar un programa de selección, así como la estimación de parámetros genéticos para crecimiento y supervivencia (Perez-Rostro et al., 1999; Perez-Rostro e Ibarra, 2003a y b) y el desarrollo de marcadores moleculares (Capítulo I) para evaluar variabilidad genética en poblaciones silvestres y cultivadas.

En los programas de cultivo, el monitoreo de la variabilidad genética con marcadores moleculares a lo largo de generaciones es recomendable para determinar si existen cambios en dicha variabilidad debidos a deriva genética, endogamia, y/o selección (Allendorf and Ryman, 1987). Varios autores han reportado claras evidencias de pérdida de variabilidad genética en poblaciones cultivadas después de varias generaciones; Sbordoní et al. (1986) observó una progresiva reducción de la heterocigosidad de una F_1 a una F_6 en una población cultivada de *Penaeus japonicus* debido al efecto inicial de un

cuello de botella, estimando que el número efectivo de padres podría haber sido de tan solo cuatro. La pérdida de variabilidad genética en poblaciones cultivadas ha sido también reportada para *Penaeus stylirostris* (Bierne et al., 2000), *Penaeus monodon* (Xu et al., 2001) y *Litopenaeus vannamei* (Garcia et al., 1994; Wolfus et al., 1997) debidas al uso de un bajo número de reproductores efectivos e inadecuadas estrategias de apareamiento, conduciendo a un mayor efecto de la deriva genética y endogamia.

En contraste, Sunden y Davis (1991) observaron en una población de *L. vannamei* solamente una ligera reducción en variabilidad de alozimas al comparar con una población silvestre, sin haber indicios de endogamia o reducción en el tamaño efectivo poblacional. Sin embargo, ya que la variabilidad por alozimas en crustáceos es usualmente inferior que la observada con marcadores de ADN (Benzie, 2000), estos resultados podrían haber sido diferentes al usar marcadores mas variables como los microsatélites, es decir detectar pérdidas de variabilidad.

Al momento de establecerse un pío de cría, Allendorf y Ryman (1987) sugieren que para evitar una pérdida significativa de variabilidad genética deben de tomarse en cuenta las siguientes consideraciones: a) comenzar con una población fundadora de elevada variabilidad; b) usar al menos 200 organismos fundadores (100 machos y 100 hembras); c) mantener un tamaño efectivo poblacional grande en cada generación; d) mantener una proporción de sexos 1:1; y e) aparear organismos no emparentados.

En el CIBNOR se inició un programa de mejoramiento genético de *L. vannamei*, estableciendo un pío de cría dándole seguimiento de pedigrí lo cual permitió hacer evaluaciones del desempeño por familias (Ibarra, 1999). Desde el comienzo, este programa siguió las consideraciones antes expuestas, además de la introducción de nueva variabilidad de la misma población fundadora en el pío de cría al producir la segunda generación. El propósito de este estudio fue monitorear la variabilidad genética desde la población fundadora hasta una segunda generación, para establecer si los niveles de variabilidad eran los adecuados para proseguir con un programa de selección a largo plazo.

III.2 Objetivos particulares

1. Determinar los niveles de variabilidad genética (heterocigosidad y número de alelos) en el programa después de tres generaciones, comparando con la variabilidad reportada en otras poblaciones silvestres y cultivadas.
2. Definir si existen cambios en variabilidad genética en base a valores estimados de número de alelos, frecuencias alélicas y heterocigosidad a lo largo de las tres generaciones (G_0 , G_1 , G_2).
3. Determinar si la variabilidad genética en la G_2 presenta niveles apropiados para iniciar un programa de selección genética.

III.3 Materiales y Métodos

III.3.1 Colecta de muestras y establecimiento de generaciones (G_0 - G_2)

El programa de mejoramiento genético del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* comenzó en el CIBNOR de la Paz, B.C. S. en el 2000, usando como organismos fundadores a los pertenecientes a una población sometida a domesticación conocida como “Melagos” (línea MV). Esta población fue importada de Venezuela en 1997. El programa de crianza esta basado en el establecimiento de múltiples familias y seguimiento de pedigrís con animales marcados con elastómeros. Perez-Rostro e Ibarra (2003a y b) describen detalladamente el marcaje con elastómeros y el manejo de las familias en el programa de cultivo.

El presente estudio abarcó solamente el muestreo de una de las líneas de producción de este programa de cultivo, resumiéndose en la fig. III.1 las familias producidas en cada generación y que dejaron descendencia a la segunda generación (G_2). Inicialmente, en cuatro estanques de maduración se colocaron reproductores MV es decir de la población fundadora (G_0), en una proporción sexual 1:1. Las hembras a las que los machos les adhirieron su espermatóforo fueron individualmente separadas para liberar los huevos fertilizados y así establecer las familias de hermanos completos que conformarían la primera generación (G_1). Los pleópodos de todas las madres y de cuatro de sus hijos de 9 g de cada familia fueron muestreados para análisis genéticos. Los machos de la G_0 no fueron muestreados ya que la fertilización fue natural, sin tener la certeza de cual macho fue el padre de cada familia. Sin embargo, se sabe que solamente se tuvieron familias de hermanos completos ya que un macho no puede fertilizar mas de una hembra durante una sola noche (Ilie Racotta, *com. pers.*).

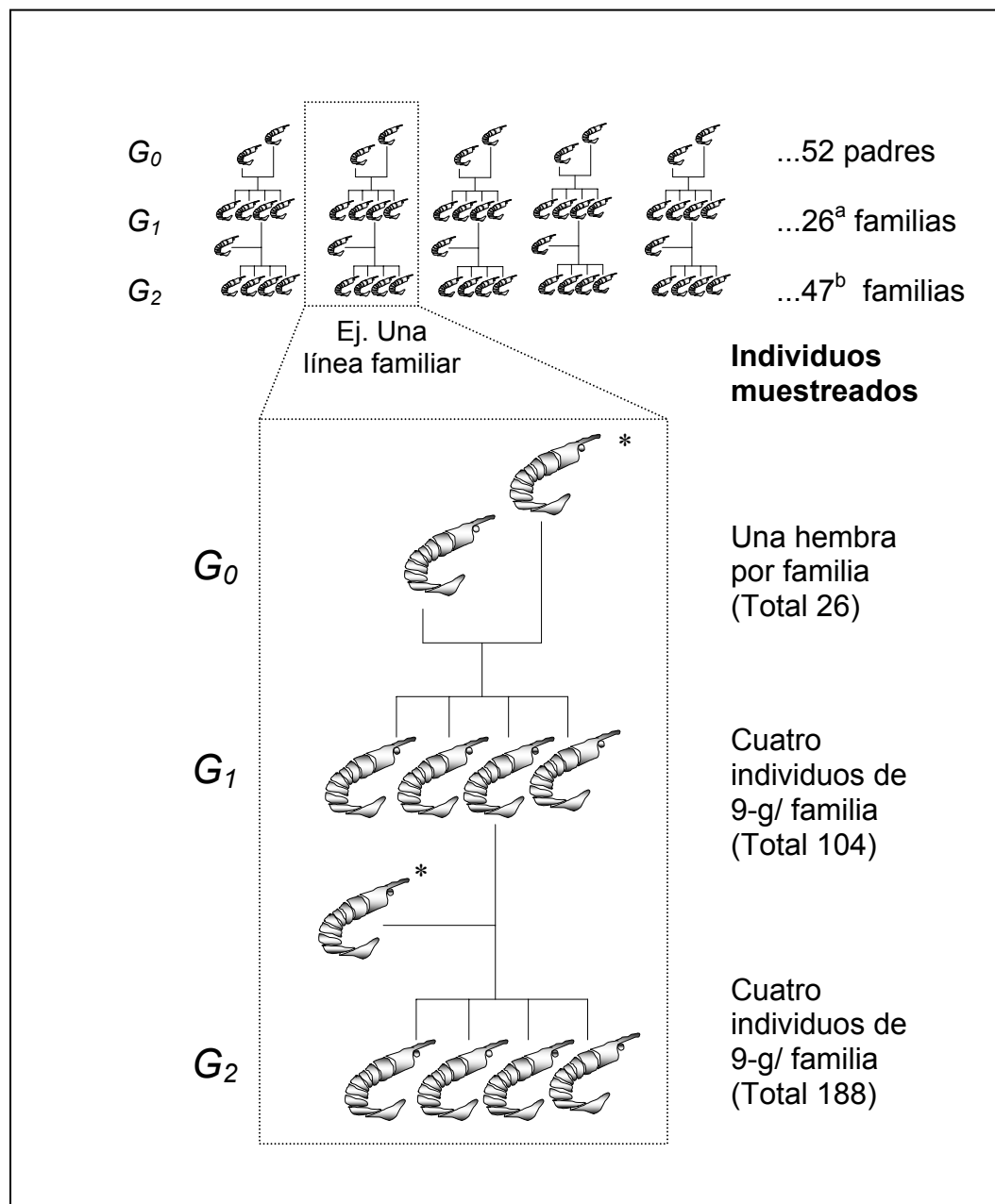


Fig. III.1 Diagrama descriptivo de las líneas familiares del programa de camarón blanco en el CIBNOR seguidas generacionalmente (G_0 , G_1 , G_2) en este estudio. * Machos MV. ^aFamilias de hermanos completos no emparentadas. ^bFamilias emparentadas y no emparentadas.

Un año después, las hembras de la G_1 fueron apareadas con machos derivados de la línea fundadora MV, pero mantenidos en una granja comercial diferente a la usada para producir la G_0 . En esta ocasión en los tanques de maduración se colocaron una a once hembras de las familias de la G_1 , y su contribución a la progenie fue variada. Por ejemplo, treinta y cuatro de las familias de la G_2 estuvieron relacionadas a nivel de primos con al menos otra familia de la misma G_2 , y únicamente se produjeron trece familias no emparentadas. Se muestrearon los pleópodos de cuatro organismos de 9 g de cada una de las familias producidas en la G_2 , para análisis genéticos. Todas las muestras de la G_0 , G_1 , y G_2 fueron preservadas en alcohol al 75 %.

III.3.2 Amplificación de los microsatélites.

El ADN fue extraído con el método tradicional de fenol-cloroformo modificado de García et al. (1994) (Apéndice I). Los microsatélites fueron amplificados y visualizados siguiendo las especificaciones del Capítulo II (Apéndices XX, XII, y XIV)

III.3.3 Análisis de variabilidad genética

Se evaluó si existían cambios en la variabilidad genética a través de las subsecuentes generaciones estimando la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e), el número de alelos (n_A) y el número de alelos efectivos (n_e) para cada microsatélite, usando el programa POPGENE versión 1.32 (Yeh et al., 1999).

Se determinó si existían cambios significativos en la heterocigosidad observada (H_o) mediante una prueba exacta de Fisher usando una tabla de contingencia de 2 X 2 en donde se compararon el número observado de homocigotos y heterocigotos entre generaciones consecutivas. Los cambios en frecuencias alélicas entre generaciones consecutivas fueron evaluados mediante pruebas de heterogeneidad usando tablas de contingencia R x C y estimaciones de Monte Carlo del valor exacto de p . Los análisis

anteriores fueron realizados en el programa StatXact 4 para Windows (Cytel Software Corporation, 1999).

Se evaluó una posible asociación estrecha entre los alelos de cada locus debido a un cuello de botella previo por domesticación, mediante un análisis de desequilibrio de ligamiento usando el programa POPGENE.

III.4 Resultados

III.4.1 Heterocigosidad

Los resultados de variabilidad genética para las tres generaciones (G_0 , G_1 , y G_2) en términos de heterocigosidad y número de alelos se encuentran en la Tabla III.1. La heterocigosidad (H_e and H_o) para ambos loci-microsatélites, así como el valor promedio se situó alrededor del 70 %. No se observaron diferencias significativas en heterocigosidad observada (H_o) entre generaciones consecutivas (G_0 - G_1 , G_1 - G_2) (Tabla III.2).

Tabla III.1 Variabilidad genética en las generaciones consecutivas (G_0 , G_1 y G_2) del programa de cultivo de camarón blanco.

		G_0	G_1	G_2
<i>Pvan1758</i>	n	24	100	182
	H_o	0.71	0.74	0.71
	H_e	0.76	0.71	0.70
	n_A	8	10	10
	n_e	3.96	3.44	3.28
	$f(\text{MC})$	0.44	0.45	0.41
	MC	(184)	(184)	(184)
<i>Pvan1815</i>	n	25	99	171
	H_o	0.60	0.67	0.73
	H_e	0.79	0.72	0.73
	n_A	7	8	10
	n_e	4.36	3.55	3.67
	$f(\text{MC})$	0.30	0.44	0.36
	MC	(129)	(129)	(129)
Promedio	n	23	99.5	176.5
	H_o	0.65	0.71	0.72
	H_e	0.77	0.72	0.71
	n_A	7.5	9	10
	n_e	4.16	3.50	3.47
	$f(\text{MC})$	0.37	0.45	0.39

n , número de individuos; H_o , heterocigosidad observada; H_e , heterocigosidad esperada; n_A , número de alelos; n_e , número efectivo de alelos; $f(\text{MC})$, frecuencia del alelo mas común.

Tabla III.2 Análisis de heterogeneidad para comparaciones pareadas de heterocigosidad observada (H_o) y frecuencias alélicas entre generaciones consecutivas.

Comparación pareada	Valores de Probabilidad	
	<i>Pvan1758</i>	<i>Pvan1815</i>
H_o		
G_0-G_1	0.7988	0.6389
G_1-G_2	0.6784	0.3346
<i>Frecuencias alélicas</i>		
G_0-G_1	0.1904	0.0028*
G_1-G_2	0.0014*	0.0215*

* Significante ($P < 0.05$)

III.4.2 Número de alelos

Se observaron diferencias en el número de alelos (n_A) y el número efectivo de alelos (n_e) entre generaciones, con un rango de valores de 7.5-9.0 y 3.47-4.16, respectivamente (Tabla III.1). El número de alelos (n_A) en ambos loci se incrementó en la G_2 debido a la ganancia de alelos raros provenientes de los reproductores machos MV introducidos al programa. Comparando la G_0 inicial con la G_2 para el locus *Pvan1758*, se observó la pérdida de dos alelos (185 y 186), sin embargo se ganaron cuatro alelos raros (179, 188, 190, y 193) (Fig. III.2a). Para el locus *Pvan1815*, se ganaron tres alelos raros (128, 135, y 136) de G_0 a G_2 (Fig. III.2b). Sin embargo, el número promedio de alelos efectivos (n_e) disminuyó un 16.6 % de G_0 a G_2 (Tabla III.1).

En el locus *Pvan1758* en las tres generaciones se observaron los mismos alelos más comunes (174, 184, 187, y 191) (Fig. III.2a), de los cuales el alelo 184 fue el principal, con una frecuencia alrededor de 0.40 (Tabla III.1). En el locus *Pvan1815* se observaron tres alelos principales en todas las generaciones (129, 130, y 139) y un cuarto: 133 para G_0 , y 132 para G_1 . Para la G_2 , ambos alelos (132 y 133) presentaron la misma frecuencia

(Fig. III.2b). El alelo mas común en las tres generaciones fue 129, con una frecuencia alrededor de 0.40 (Tabla III.1).

III.4.3 Heterogeneidad para frecuencias alélicas

Los resultados del análisis de heterogeneidad para frecuencias alélicas se encuentran en la Tabla III.2. Para el locus *Pvan1758* se observaron diferencias significativas entre G_1 y G_2 . Estas diferencias se debieron a un incremento significativo del alelo 174 y a un decremento del alelo 191 en la G_2 (Fig. III.2a). Para el locus *Pvan1815*, se observaron diferencias significativas entre las generaciones consecutivas (G_0 - G_1 , G_1 - G_2). Las diferencias entre G_0 y G_1 se debieron a un incremento de los alelos 129 y 132, y a un decremento en el 133, en tanto que entre G_1 y G_2 se observó un incremento en el alelo 130 y un decremento en el alelo 129 (Fig. III.2b).

No se observó desequilibrio de ligamiento significativo entre los alelos principales de cada locus.

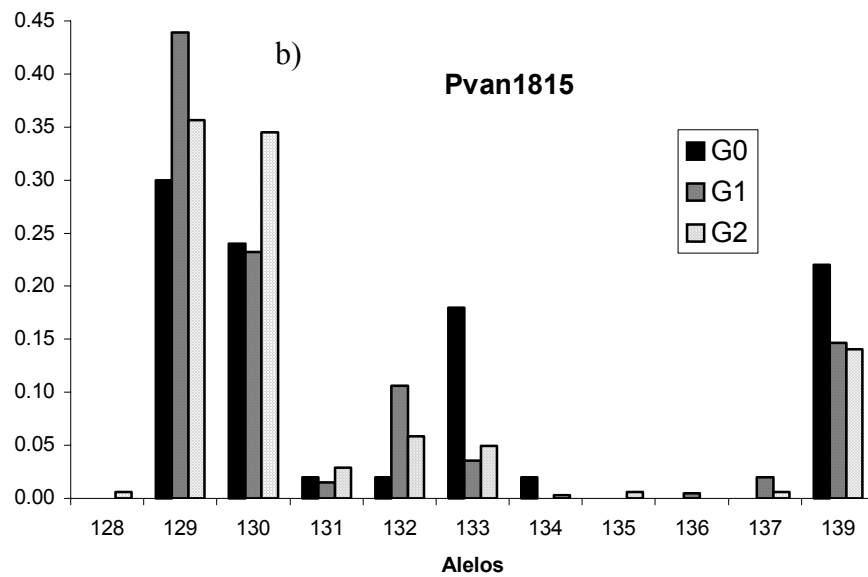
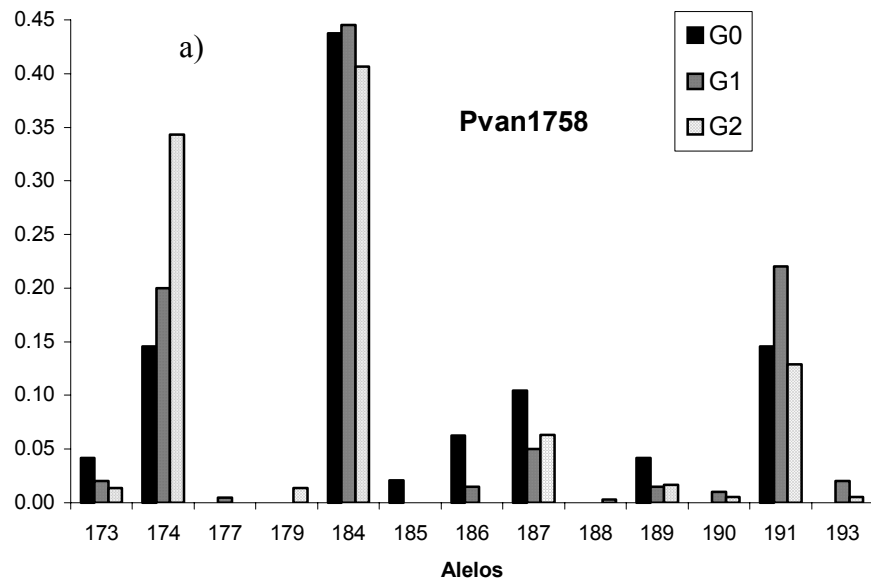


Fig. III.2 Frecuencias alélicas para los dos loci-microsatélites a lo largo de las generaciones

III.5 Discusión

III.5.1 Variabilidad genética: Heterocigosidad y número de alelos

La cantidad de variabilidad genética a lo largo de las generaciones expresada en heterocigosidad ($H_o = 0.65-0.72$; $H_e = 0.71-0.77$) se presentó dentro del rango de lo previamente reportado para peneidos. Benzie (2000) realizó una revisión de los estudios sobre variabilidad genética en poblaciones de diferentes especies de peneidos, observando que en las poblaciones silvestres para todos los microsatélites reportados en cuatro especies la heterocigosidad observada (H_o), fue de 0.425 a 0.964 (promedio 0.666), siendo inferior que la heterocigosidad esperada (H_e), que fue de 0.890 a 0.959 (promedio 0.927). En la misma revisión, Benzie (2000) observó que la heterocigosidad observada (H_o) en poblaciones cultivadas de camarones fue de 0.45 a 1.00 (promedio 0.594) y de igual manera fue inferior a la heterocigosidad esperada (H_e), 0.388 - 0.960 (promedio 0.674).

Un estudio mas reciente (Bierne et al., 2000) reportó valores inferiores de heterocigosidad en microsatélites ($H_o = 0.32-0.48$; $H_e = 0.46-0.61$) en cuatro muestras de una población cultivada por 22 a 24 generaciones de *Penaeus stylirostris*. De esta manera en nuestro programa con *L. vannamei* después de dos generaciones cultivadas, la heterocigosidad se mantuvo por arriba de los valores reportados para camarones cultivados, además de observarse un valor aproximado al de las poblaciones silvestres.

Sin embargo, la heterocigosidad por si sola es una medida imperfecta de la variabilidad, por lo que es importante complementar con un análisis del número y composición de los alelos. La heterocigosidad *per se* es insensible a el número de alelos, ya que se pueden obtener altos valores con tan solo dos alelos (Beardmore et al., 1997). De esta manera, una evaluación genética apropiada debe considerar ambos estimadores para evitar el

riesgo de llegar a conclusiones basadas en un solo estimador. Butler y Cross (1996) evaluaron sucesivas clases anuales de dos líneas de trucha arcoiris, observando que la heterocigosidad promedio para 23 loci de aloenzimas no difirió significativamente, pero las frecuencias alélicas en la mayoría de los loci polimórficos variaron significativamente. Varios alelos raros que estuvieron presentes en el primer año se perdieron al segundo año, ilustrando que la diversidad alélica fue un indicador mas sensitivo de la pérdida de variabilidad genética que la heterocigosidad. Reportes mas recientes en otras especies de peces han demostrado que la diversidad alélica se redujo sustancialmente en líneas cultivadas sin observarse diferencias significativas en heterocigosidad al comparar con poblaciones silvestres (O'Connell and Wright, 1997; Norris et al., 1999; Desvignes et al., 2001; Perez-Enriquez et al., 1999).

Para nuestro conocimiento, en peneidos solo existe un estudio previo donde se evalúa la diversidad genética de generaciones cultivadas consecutivamente. Sbordoni et al. (1986) evaluó 20 loci de aloenzimas en *P. japonicus*, observando un reducción progresiva de la heterocigosidad de 0.102 a 0.039 al comparar muestras de la F_1 a la F_6 . Además de estimar que el número efectivo de padres contribuyendo en cada generación pudo haber sido de tan solo cuatro individuos, a pesar de que el número de parejas mantenidas en los tanques de reproducción varió de 50 a 300.

Específicamente para microsatélites en peneidos existen tres estudios que reportan un reducido número de alelos en poblaciones cultivadas (Wolfus et al., 1997; Bierne et al., 2000; Xu et al., 2001). Tales pérdidas de variabilidad genética fueron atribuidas al efecto de la deriva genética, cuellos de botella, y endogamia debido a un reducido tamaño efectivo poblacional (N_e). En un estudio con microsatélites en una población de *L. vannamei* cultivada por siete generaciones (Wolfus et al., 1997), se observaron tan solo 4 alelos (1.6 alelos efectivos), mientras que en la población silvestre mas variable 22 alelos (12.4 alelos efectivos). Wolfus et al. (1997) estimaron que esta población endogámica pudo haberse originado de la contribución genética de tan solo dos individuos. En un estudio de una población cultivada de *P. stylirostris* por 22-24 generaciones (Bierne et

al., 2000) se observaron de 2 a 4 alelos en tres microsatélites, estimándose una $N_e = 13.6$, inferior al tamaño poblacional censado que fue de 20 a 100.

Xu et al. (2001) evaluaron seis poblaciones de *P. monodon*, observando un rango de alelos de 6 a 14 en tres microsatélites “pequeños” (aquellos con menos de 20 repeticiones), mientras que en microsatélites “grandes”, de 46 a 54 alelos por locus. Además observaron una reducción en el número promedio de alelos por locus en los microsatélites “pequeños” de 7.3-9.3 a 3.67, en una población específica cultivada en comparación con las poblaciones silvestres. Los microsatélites evaluados en el presente trabajo de tesis (*Pvan1758* y *Pvan1815*) pueden ser considerados como “pequeños”, además de que el número promedio de alelos en la G_0 y G_2 (7.5 y 10) fue menor al reportado en poblaciones silvestres, pero superior a lo observado en las poblaciones endogámicas antes citadas. En esta línea de cultivo particular de nuestro programa de crianza, el tamaño efectivo poblacional ($N_e = 52$ en G_1 , y $N_e = 94$ en G_2), fue superior al manejado en esos estudios reflejándose en un mayor número de alelos.

A pesar de que el número efectivo de alelos (n_e) se mantuvo a través de las generaciones, cuatro alelos principales no debería de ser considerado como un valor elevado de variabilidad. Cabe aclarar que los reproductores de la línea Melagos (MV), los cuales fueron usados como población fundadora, tienen un origen incierto, además de que se desconoce el número de generaciones en cautiverio y las estrategias de apareamiento seguidas, por lo que se sospecha de cierta pérdida de variabilidad en el manejo previo de esta línea de camarón. Clifford III (1997) menciona que la línea de Venezuela, de la cual se origina la línea MV, representaba la 15ª generación en aquel entonces, derivándose originalmente de poblaciones silvestres de Panamá y Colombia, y de una cultivada de Estados Unidos.

Basándonos en los estudios antes citados, la variabilidad genética observada en la G_2 , expresada en términos de heterocigosidad, es tan variable como la reportada para poblaciones silvestres, y expresada en número de alelos es superior a la de las poblaciones cultivadas. Sin embargo el número de alelos presenta una tendencia a

permanecer de tres a cuatro alelos en ambos loci, sospechando así un previo manejo endogámico en la línea MV fundadora.

III.5.2 Diferencias en frecuencias alélicas entre generaciones

Los cambios en frecuencias alélicas entre G_0 - G_1 y G_1 - G_2 en el locus *Pvan1815* y entre G_1 - G_2 en el locus *Pvan1758* fueron probablemente ocasionados por la contribución genética de los machos MV. Debido a que los machos en la G_0 no fueron muestreados ya que no se podía saber cuales de ellos ($n = 104$) fertilizaron a las 26 hembras que dejaron descendencia, su contribución a la variabilidad genética de la G_0 no es considerada.

De esta manera, en el locus *Pvan1815* la frecuencia de los alelos 129 y 132 en la G_0 podría haber sido subestimada, en tanto que la del alelo 133 sobrestimada. Además G_0 es una muestra pequeña ($n = 26$), y así sujeta a un mayor efecto azaroso de muestreo. Esto fue observado cuando la variabilidad genética de todas las hembras reproductoras ($n = 104$) manejadas en los estanques de desove fue comparada con la obtenida de las hembras efectivas (G_0), encontrándose diferencias significativas en las frecuencias de los alelos 129, 130, y 133. Debido a que solo evaluamos el 50 % de la variabilidad, esto sugiere que la composición genética de la G_0 , si los machos hubieran sido incluidos, podría haber mostrado diferentes frecuencias alélicas

Para el caso de las diferencias en frecuencias alélicas entre G_1 - G_2 se pueden seguir las mismas consideraciones. En este caso se observaron diferencias en frecuencias alélicas en los alelos 174 y 191 para el locus *Pvan1758* y 129 y 130 para el locus *Pvan1815*. Estos cambios en frecuencias pueden ser explicados por la contribución paterna de los reproductores-macho MV usados para establecer la G_2 , sugiriendo que los machos MV tenían una frecuencia superior (174 y 130) o inferior (191 y 129) de estos alelos. Además debemos de considerar que la introducción de variabilidad en el programa de crianza corresponde al 50 %, ya que todos los machos usados para la producción de la G_2 eran de la línea MV.

En este estudio, la estrategia de (a) usar un número efectivo de reproductores grande ($G_1 = 52$, $G_2 = 94$), (b) similares proporciones de reproductores machos y hembras, (c) apareamiento de individuos no emparentados, y (d) apareamiento de las familias G 's con machos MV, nos permitió obtener una línea del pie de cría con 47 familias no emparentadas cercanamente y con una variabilidad genética mantenida a lo largo de las generaciones. Sin embargo, esta variación genética expresada en número de alelos no es tan elevada como la deseada para iniciar un programa de selección a largo plazo. Como se notó anteriormente cuatro alelos efectivos en un microsatélite “pequeño” puede indicar que cierta reducción en variabilidad ya existía en la línea fundadora MV, lo cual puede ser corregido durante las primeras etapas del programa, introduciendo otros organismos de diferente origen. Para incrementar la variación genética a la G_3 , varios individuos del programa fueron apareados con reproductores de una línea colombiana. Un análisis preliminar de los reproductores colombianos ($n = 23$) reveló valores superiores de variabilidad ($n_A = 10$, $n_e = 6.85$, $H_o = 0.74$, $H_e = 0.87$), diferentes frecuencias alélicas, y dos alelos exclusivos en ambos microsatélites que permitirán la distinción entre líneas (Fig. III.3).

El monitoreo de la variabilidad genética demostró ser útil y deberá continuar en este y otros programas, especialmente antes y después de que la selección sea aplicada. La inclusión de otros marcadores genéticos será útil, no solamente para complementar las evaluaciones de variabilidad genética, sino también para el seguimiento de pedigrís y posible asociación con características importantes a nivel de producción (QTLs).

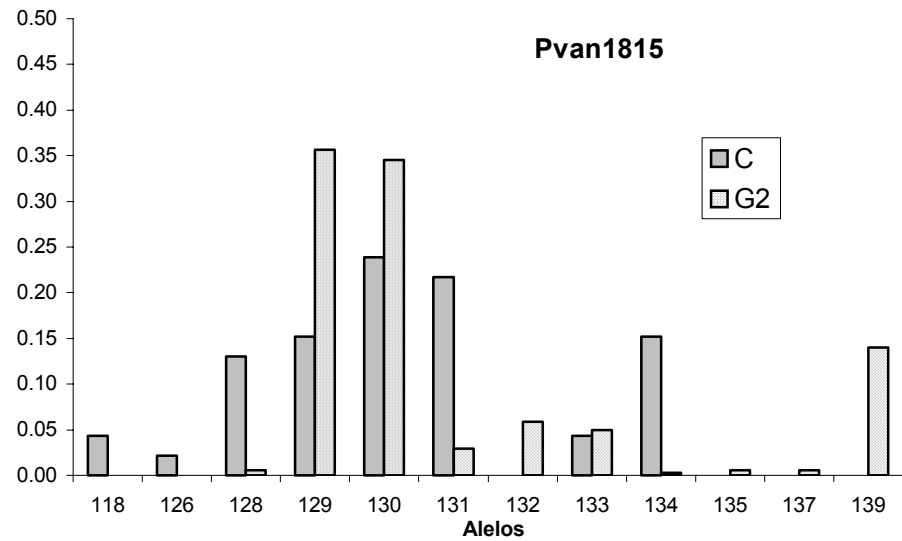
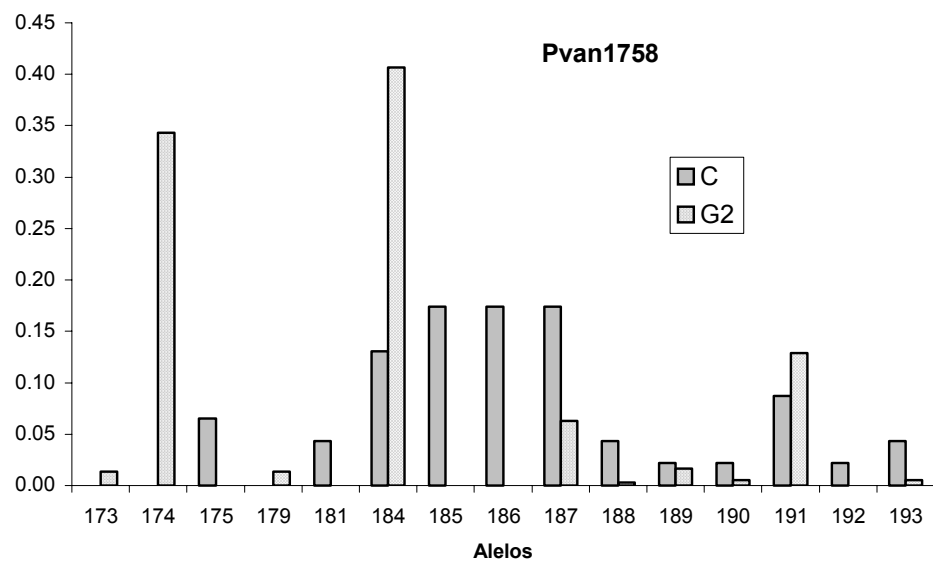


Fig. III.3 Frecuencias alélicas para los dos loci-microsatélites en la segunda generación (G2) y en una muestra de una línea colombiana (C).

III.6 Conclusiones

1. La variabilidad genética evaluada en términos de heterocigosidad, tanto observada (H_o) como esperada (H_e) no cambió significativamente a lo largo de las generaciones ($H_o = 0.65 - 0.72$; $H_e = 0.77 - 0.71$) situándose alrededor del valor observado (H_o) promedio reportado para especies silvestres (0.666) y por arriba del reportado en especies cultivadas (0.594) (Benzie, 2000).
2. La variabilidad genética evaluada en número de alelos (n_A) mostró un ligero aumento debido a la ganancia de alelos raros, en tanto que en el número de alelos efectivos (n_e) se observó una reducción del 16.6 %, debido al aumento de ciertas variantes alélicas en la G_2 . El número de alelos ($n_A = 7.5 - 10$) y el número efectivo de alelos ($n_e = 4.16 - 3.47$) se situó por debajo de lo observado en poblaciones silvestres pero por arriba de lo reportado en poblaciones cultivadas.
3. Se observaron diferencias en frecuencias alélicas en generaciones consecutivas en uno (G_0 - G_1) o ambos loci (G_1 - G_2), debido al aumento y disminución de ciertas variantes alélicas, lo cual puede ser atribuido a la contribución de los machos MV, que en la G_0 no fue incluida y en la G_2 representó una nueva introducción de variabilidad.
4. A pesar de unos niveles de variabilidad genética aceptables en términos de heterocigosidad, los cambios en el número de alelos efectivos (n_e) muestran una tendencia previa a permanecer 3 a 4 alelos en ambos loci, lo cual parece indicar que la población fundadora MV ya mostraba una reducción de variabilidad genética. Por lo anterior es recomendable antes de continuar con un programa de selección introducir variabilidad cruzando con otra población mas variable. Una línea colombiana resultó presentar niveles de variabilidad superiores y se incluyó para la producción de la G_3 .

III.7 Recomendaciones

1. Las estimaciones de variabilidad genética deben de considerar ambos estimadores genéticos, heterocigosidad y número de alelos, ya que uno solo puede llegar a sobreestimar la variabilidad genética. Se pueden obtener valores elevados de heterocigosidad con dos o mas alelos, y de igual manera un número elevado de alelos puede ser independiente del número de homocigotos y heterocigotos.
2. Para dar un mejor seguimiento de la variabilidad genética dentro del programa se deben de estandarizar los muestreos preferentemente a una misma edad y etapa de cultivo. En nuestro caso la G_0 fue una muestra diferente a las de G_1 y G_2 , por obvias razones, ya que en la primera se contó inicialmente con los organismos solo a partir de la talla de reproductores, momento en el que se muestrearon, y en las siguientes generaciones se muestreó a los organismos en crecimiento en la etapa de pre-adultos (9 g). Tanto en G_1 como en G_2 no se muestrearon a nivel de reproductores ya que al igual que en la G_0 los reproductores machos no podían ser muestreados (complicaciones prácticas por desoves masivos en los que se reutilizaban a los padres).
3. La principal crítica en cuanto al análisis en pre-adultos es que debido al gran número de familias se analizaron solamente 4 individuos por cada una de ellas, lo cual podría ser un tamaño insuficiente como para detectar todos los genotipos posibles de cada familia (ver tabla II.1), subestimándose así la variabilidad genética. Por tanto sería recomendable incrementar al doble (8 organismos) para que se tenga una mayor probabilidad de observar todos los genotipos, lo cual inevitablemente aumentaría considerablemente el tamaño de la muestra. Otra alternativa, sería muestrear a nivel de reproductores, tanto hembras como machos, pero solamente aquellos que dejaran progenie a la siguiente generación. Por tanto sería necesario que los desoves fueran pareados (en recipientes separados) o por inseminación artificial, en donde se tendría la certeza de saber quien es el padre. Con estos muestreos se estimaría la variabilidad genética a

partir de los organismos que efectivamente contribuyen a la siguiente generación es decir a partir del tamaño efectivo poblacional (N_e), lo cual sería una muestra de un tamaño mas reducido y más rápida de analizar.

Perspectivas generales del trabajo

1. Identificación de microsatélites.

La identificación de marcadores moleculares tipo microsatélites en el genoma del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) a partir de una genoteca parcial permitió amplificar por *PCR* un reducido número de microsatélites, por debajo de lo observado en otras especies de peces y otros vertebrados (Zane et al., 2002). Lo anterior se debió a que el genoma de peneidos es rico en amplias regiones repetitivas (Xu et al., 1999; Brooker et al., 2000), al nivel de no permitir el desarrollo de iniciadores en las zonas flanqueantes. Aunado a lo anterior en *L. vannamei*, se observó una misma región altamente repetitiva la cual disminuyó la eficiencia en la identificación de nuevas regiones microsatélites. Por esto mismo se deben de considerar los microsatélites de pocas repeticiones (3 a 10 repeticiones) y no solamente aquellos de múltiples repeticiones (> 20) para el diseño de *iniciadores*.

Por otro lado debido al bajo rendimiento del método tradicional se han ideado actualmente otros protocolos para la identificación de microsatélites. El más novedoso de estos, se basa en la producción de genotecas enriquecidas con microsatélites. Con este método selectivamente se transforman clonas solamente con ADN rico en el microsatélite escogido, por tanto a diferencia del método tradicional, el “tamizado” se hace antes de producir la genoteca, asegurando que la mayoría de las clonas posean microsatélites (Zane et al., 2002). Específicamente para *L. vannamei* se podría generar una genoteca enriqueciendo con las regiones aquí identificadas como más abundantes (CT, TAA, y CTT).

2. Análisis de variabilidad genética en poblaciones naturales.

Para estudios de variabilidad genética en poblaciones naturales se asume que las diferentes variantes de un marcador estarán presentes de una generación a otra y su

ausencia o aparición, así como cambios en frecuencias serán explicadas por otros fenómenos (deriva genética, migración, selección, mutación, etc.), de aquí que se aumente la confiabilidad de su aplicación una vez que se comprueba su herencia mendeliana. Actualmente existen diversos trabajos en peneidos que han demostrado la utilidad de los microsatélites para establecer diferencias genéticas entre poblaciones naturales y cultivadas. Se ha observado que los microsatélites son variables aún en poblaciones con bajos niveles de variación por aloenzimas y ADN mitocondrial, y por tanto permiten observar diferencias y estructuras poblacionales antes no detectadas, como es el caso de los peneidos (Garcia et al., 1994; Garcia y Benzie, 1995; Wolfus et al., 1997; Benzie, 2000; Brooker et al., 2000; Supungul et al., 2000; Zu et al., 2001). Actualmente los microsatélites son el marcador mas utilizado en peneidos junto con otro marcador, los *AFLPs* (polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados) (Moore et al., 1999). Los estudios de variabilidad genética poblacional utilizando mas de un marcador vendrán a reforzar los resultados obtenidos o esclarecer dudas relativas al uso de uno solo de estos.

3. Análisis de variabilidad genética en programas de cultivo y de mejoramiento genético.

En general la variabilidad genética observada en poblaciones domesticadas ha sido inferior a la observada en poblaciones naturales de peneidos (Benzie, 2000). En nuestro caso las evaluaciones de variabilidad genética a lo largo de las generaciones permitió establecer que desde el *stock* fundador hasta una segunda generación en cautiverio, no se presentó una considerable disminución de la misma. El número de alelos y el cambio en las frecuencias alélicas resultaron ser estimadores mas sensibles que la heterocigosidad para evaluar cambios en la composición genética. Los cambios más notables se debieron al aumento de ciertos alelos en la última generación, debido a la introducción de variabilidad por parte de nuevos padres. Los cambios mínimos en variabilidad genética son un reflejo de que en el programa de crianza se tuvo cuidado al evitar el apareamiento de familias emparentadas, además de que cada familia tuvo prácticamente la misma representatividad, debido a que se ajustó a un mismo número de descendientes y de reproductores al conformar la siguiente generación. Lo anterior no ocurre a nivel de

producción en las granjas camaronícolas, por lo que es posible que se tengan pérdidas de variabilidad genética de manera acelerada al cruzar individuos altamente emparentados y favorecer por misma selección a las familias más exitosas. Planteando lo anterior resulta interesante el realizar evaluaciones genéticas con estos marcadores en otros *stocks* domesticados derivados del mismo *stock* fundador de este estudio. Así mismo, continuar con el monitoreo de variabilidad genética dentro del programa de mejoramiento, sobre todo una vez que se inicie la selección genética.

4. Genotipificación y seguimiento de pedigrees

Resultó ventajoso el poder verificar si los dos microsatélites más polimórficos se ajustaban a una herencia mendeliana, ya que permitió identificar alelos nulos y descartarlos. Para la validación de la herencia mendeliana es necesario no solamente evaluar las frecuencias genotípicas en una progenie, sino que también es necesario evaluar el genotipo de alguno de los padres. Muchas de las aplicaciones de los microsatélites se basan en que estos sean heredados de padres a hijos observándose las variantes maternas y paternas por lo que el análisis mendeliano valida la utilidad de estos marcadores para estudios posteriores.

Por obvias razones para que un microsatélite sea aplicado en el seguimiento de pedigrees, así como en el esclarecimiento de parentesco es necesario tener la certeza de que se están heredando y ajustando a lo esperado por Mendel. Además deben de presentar suficiente polimorfismo para que sea posible genotipificar cada organismo o familia, distinguiéndola del resto, es decir que cada individuo tenga un genotipo particular que lo distinga del resto. En varias especies de animales terrestres domesticadas, así como últimamente en peces, el uso de los microsatélites se ha centrado mucho en el establecimiento de pedigrees y esclarecer problemas de parentesco en programas de mejoramiento genético. Cuando se esta creciendo o cultivando a varios organismos comúnmente se mantienen mezclados todos los organismos producidos en un mismo corral o contenedor, con la idea de economizar y evitar diferencias ambientales. Sin embargo en muchos casos al momento de tener los sementales o reproductores para producir la siguiente generación es difícil de conocer el grado de parentesco entre los

individuos. Como es sabido, todo criador debe de evitar al máximo el apareamiento entre organismos muy emparentados para mantener cierta variabilidad genética y evitar deficiencias productivas causadas por endogamia. De esta manera tomando una muestra de ADN de los organismos, obviamente sin sacrificarlos, es posible establecer que organismos pertenecen a familias diferentes y realizar apareamientos tratando de reducir la consanguinidad. Actualmente existen compañías que brindan el servicio de confirmación de parentesco usando marcadores moleculares para diferentes tipos de ganados y organismos silvestres (ImmGen, Inc., Genetic Identification Services). El uso de los microsatélites en la asignación de parentesco ha sido exitosamente probado en varios organismos marinos. Ferguson y Danzmann (1998) hicieron un análisis de pedigrí en una granja comercial de trucha arcoiris, logrando un 90 % de asignamiento de progenie a padres dentro de 135 familias. En una población cultivada de brema roja (*Pagrus major*) Pérez-Enriquez et al. (1999) determinaron efectivamente el pedigrí de más del 73 % de la progenie de 91 organismos (de 250 supuestos reproductores). Estoup et al. (1997) evaluaron la utilidad de 8 microsatélites en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) para determinar parentesco en poblaciones cultivadas. Wolfus et al. (1997) verificaron la herencia mendeliana de un microsatélite dentro de 14 familias de camarón blanco *P. vannamei*, en donde lograron demostrar que todas las progenies eran descendientes de sus presuntos progenitores.

En nuestro caso particular para el camarón blanco del programa de cultivo, para poder dar un seguimiento de pedigrís con los dos microsatélites manejados será necesario identificar al menos dos mas con similar variabilidad, o uno altamente polimórfico; ya que con cuatro alelos principales para ambos loci no se tuvieron suficientes combinaciones que permitieran distinguir entre familias.

5. Mapeo genético.

Una vez que se han identificado múltiples marcadores es posible determinar como están ordenados a nivel de ADN, es decir que marcador está antes y que tan cercanos están. Este mapa genético servirá para asociar a los marcadores entre ellos y con ciertas características cuantitativas, formándose así grupos de ligamiento que se encuentran en

un mismo cromosoma. Para lograr lo anterior es necesario establecer las frecuencias de recombinación de los alelos de diferentes marcadores al estudiar pedigríes completos de familias, es decir al conocer los genotipo de los abuelos y los padres es posible determinar la frecuencia de recombinación de dos locus en una progenie.

Actualmente se están desarrollando mapas genéticos en base a microsatélites para diversas especies acuícolas, como el salmón del Atlántico, trucha arcoiris, trucha café (Bartley, 1997), camarón japonés (Moore et al., 1999) y camarón blanco (Alcivar-Warren et al., 1997). De igual manera en Estados Unidos se concluyó un proyecto de cinco años para desarrollar un mapa genético para cinco especies importantes a nivel de acuicultura (bagre, trucha, tilapia, camarón blanco y ostión). Estos mapas serán usados para identificar y seleccionar genes o secuencias que controlan características económicamente importantes en cada una de las especies (USDA Regional Project Number: NE-186).

El mapeo genético del camarón blanco deberá de abordarse en base a marcadores tan variables como los microsatélites, *AFLPs* y regiones de genes codificantes actualmente reportadas para la especie. Por lo que la parte primordial seguirá siendo la identificación de múltiples marcadores polimórficos en *L. vannamei*, así como la conformación de una familia con un pedigrí completo que incluya al menos tres generaciones.

6. Asociación de los marcadores con características productivas (QTLs)

Por último, los marcadores moleculares pueden ser estudiados junto con otros caracteres importantes a nivel de producción (crecimiento, resistencia), tratando de encontrar asociaciones que permitan definir “loci de características cuantitativas” (*QTL*) (Falconer y Mackay, 1996).

Por razones obvias el mayor avance en la obtención de *QTLs* se tiene en organismos terrestres, ya que se trata de especies que han sido domesticadas hace cientos de años, siendo que en las especies acuícolas apenas se está intensificando su cultivo.

A pesar del atraso que se tiene en especies acuícolas con respecto a las terrestres, se predice un gran avance en los años venideros ya que estas presentan una mayor fecundidad y ciclos de vida mas cortos. El hecho de que se tengan mas crías por

apareamiento permite buscar con mayor confianza las asociaciones entre marcadores y caracteres cuantitativos, además de tener un mayor poder estadístico. Por ejemplo para los estudios con ganado vacuno una hembra solamente tiene una cría, de allí que para hacer las asociaciones sea necesario reproducir a la misma hembra varias veces y además trabajar con varias familias, lo cual implica varios años para poder evaluar a las crías en estado adulto. Contrariamente en las especies acuícolas se pueden tener cientos de crías en estado adulto en periodos muy cortos de tiempo. La aplicación de los marcadores moleculares dentro de un programa de mejoramiento genético es lo que se conoce como “Selección asistida por marcadores” mejor conocida por sus siglas en inglés MAS (Marker Assisted Selection) (Simm, 1998). En esta se pretende que los reproductores o progenies en los primeros estadios de crecimiento sean seleccionadas en base a un marcador molecular que este asociado con un mayor desempeño. En estos casos se eliminarán los organismos que porten marcadores que actúen en detrimento de la producción (los mas pequeños, los menos resistentes). La ventaja del MAS es que no será necesario crecer a los organismos para darse cuenta de si tienen buen o mal desempeño, sino desde tallas pequeñas con un análisis de ADN serán seleccionados. Por otro lado también se podrán eliminar organismos que aunque son resistentes a una enfermedad, son portadores del gen “susceptible” y lo pueden transferir a su descendencia, lo cual será fatal para su progenie si se aparean con otro organismo resistente que acarrea el gen “susceptible”.

En el ganado vacuno en ciertas líneas Holstein se esta mejorando la calidad de la leche (rendimiento de proteína y relación proteína-grasa) mediante el uso de dos *QTLs*. Se tiene estimado que usando *QTL* y otros métodos de mejoramiento el incremento anual en la producción de leche será arriba del 30 % (Simm, 1998).

Recientemente una compañía porcícola ha identificado un *QTL* relacionado con el tamaño de la camada (número de crías). El uso de tal marcador ha sido patentado y con licencia exclusiva para dicha compañía (Haley, 1995).

Para el caso de especies acuícolas, específicamente en peces es donde se tiene el mayor avance. Para la trucha arcoiris se esta desarrollando un mapa genético para localizar *QTL* para crecimiento, tiempo de desove, y tolerancia a temperaturas elevadas (Ferguson y

Danzmann, 1998) en tanto que en el salmón del Atlántico se han obtenido marcadores asociados a resistencia a enfermedades (Ferguson y Danzmann, 1998).

Específicamente para camarón, ejemplos de características cuantitativas de índole productiva que sería importante asociar a marcadores moleculares podrían ser tasa de crecimiento, eficiencia en la conversión alimenticia, resistencia a enfermedades, y capacidad reproductiva (número de desoves, tiempo para el primer desove, reservas energéticas en huevo).

Referencias

- Alcivar-Warren, A., Garcia D.K., Dhar A.K., Wolfus G.M., Astrofsky, K.M. 1997. Efforts toward mapping the shrimp genome: A new approach to animal health. Proceedings to the third Symposium on Diseases in Asian Aquaculture.
- Alcivar-Warren, A., Meehan, D., Xu, Z., Bell, K., 2003. TAACC, a telomere-associated pentanucleotide of insects, is present at high frequency in the genome of marine shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Abstract). Plant and Animal genome XI Conference, January 11-15, 2003, San Diego, CA. p.236.
- Allendorf, F. W., Ryman, N. 1987. Genetic management of hatchery stocks. In: *Population Genetics and Fishery Management*. Ryman, N., and Utter, F. (eds.). Seattle. University of Washington Press. 141-159
- Armour, J.A.L., Alegre, A.A., Miles, S., Williams, L.J., Badge, R.M. 1999. Minisatellite and mutation processes in tandemly repetitive DNA. In: *Microsatellites, Evolution and applications*. Goldstein, D.B., Schlötterer, C. (eds). Oxford University Press. 24-33 pp
- Bagshaw, J.C., Buckholt, M.A. 1997. A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp. *Penaeus vannamei*. *Gene* 184, 211-214
- Ball, A.O., Leonard, S., Chapman, R.W. 1998. Characterization of (GT)_n microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Molecular Ecology* 7, 1247-1263.
- Bartley, D. 1997. Biodiversity and genetics. In: *Review of the state of world aquaculture*. FAO Fisheries circular No. 886 FIRI/C886 (Rev. 1). Rome.
- Beardmore J.A., Mair, G.C., Lewis, R.I. 1997. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquaculture Research* 28, 829-839.
- Beckman, J.S., Weber, J.L. 1992. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, 12, 627-631
- Benzie, J. A. H., Ballment, E, Frusher, S.1993. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. *Aquaculture* 111, 89-93.
- Benzie J.A.H. 2000. Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquaculture Research* 31, 95-119.

- Bierne, N., Beuzart, I., Vonau, V., Bonhomme, F., Bedier, E., AQUACOP, 2000. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-popagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 194, 203-219.
- Bouchon D., Souty-Grosset, C., Raimond, R. 1994. Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *P. Japonicus* Bate. *Aquaculture* 127, 131-144.
- Brooker, A. L., Cook, D., Bentzen, P., Wright, J.M., Doyle, R.W. 1994. Organization of microsatellites differs between mammals coldwater teleost fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51, 1959-1965.
- Brooker, A.L., Benzie, J.A.H., Blair, D., Versini, J.J. 2000. Population structure of the giant prawn *Penaeus monodon* in Australian waters, determined using microsatellite markers. *Marine Biology* 136, 149-157.
- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y., Burke, T. 1998. Multi-locus and single-locus DNA fingerprinting. In: Hoelzel, A.R. (Ed), *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, 287-336.
- Butler A., and Cross, T.F. 1996. Genetic differences between successive year classes of two strains of reared rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research* 27, 643-649.
- Cavalli-Sforza, L.L. 1998. The DNA revolution in population genetics. *Trends in Genetics* 14, 60-65.
- Chambers, G.K., MacAvoy, E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 126, 455-476.
- Chow, S., Dougherty, W.J., Sandifer, P. 1990. Meiotic chromosome complements and nuclear DNA contents of four species of shrimps of the genus *Penaeus*. *Journal of Crustacean Biology* 10, 29-36.
- Clifford III, H. 1997. Shrimp farming in Venezuela. *World Aquaculture* March, 60-61
- Cruz, P., Mejia-Ruiz, C.H., Perez-Enriquez, R., and Ibarra, A.M. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Molecular Ecology Notes* 2, 239-241.
- Cytel Software Corporation. 1999. StatXact 4 For Windows. Cytel Software Corporation, Cambridge MA.

- Desvignes, J.F., Laroche, J., Durand, J.D., and Bouvet, Y. 2001. Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites. *Aquaculture* 194, 291-301.
- Edwards, Y.J., Elgar, G., Clark, M.S., Bishop, M.J. 1998. The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analyses. *Journal Molecular Biology* 278, 843-854.
- Ellegren, H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics* 16, 551-558.
- Espinosa-Lopez, G., Jager, M., Garcia-Machado, E., Borrel-Pichs, Y., Corona-Rodriguez, N., Robainas-Barcia, A., Deutsch, J. 2001. Microsatellites from the White Shrimp *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Decapoda). *Biotechnología Aplicada* 18, 232-234.
- Estoup, A., Turgeon, J. 1996. Microsatellite markers: Isolation with non-radioactive probes and amplification. Laboratoire de Génétique des Poissons. <http://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm>
- Estoup, A., Gharbi K., SanCristobal M., Chevalet C., Haffray P., Guyomard, R. 1997. Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55, 715-725.
- Falconer, D.S, Mackay, T.F.C. 1996. *Introduction to quantitative genetics*. Longman group LTD, 4 ed. 464 pp.
- Ferguson, M., Danzmann, R.G. 1998. Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 55, 1553-1563.
- Fisher, P.J., Turic, D., Williams, N.M., Owen, M.J. 2000. DNA pooling: Strategies for microsatellite-based association studies. In: *SNP and Microsatellite genotyping. Markers for genetic analysis*. Worthington J., John, S. (eds). Eaton Publishing. Natick, MA. 67-79.
- Garcia, D. K., Faggart, M. A., Rhoades L., Alcivar-Warren A. A., Wyban J.A., Carr W. H., Sweeney, Ebert, K.M. 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 270-280.
- Garcia, D.K., Benzie, J.A.H. 1995. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture* 130, 137-144.

- García, D. K., Dhar, A.K., Alcivar-Warren, A. 1996. Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5, 71-83.
- Goldstein, D.B., Schlötterer, C. 1999. *Microsatellites, Evolution and applications*. Oxford University Press. New York. 352 pp.
- Haley, C. 1995. Livestock QTLs-bringing home the bacon. *Trends in Genetics* 11, 488-492.
- Hancock, J.M., 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: *Microsatellites, Evolution and applications*. Goldstein, D.B., Schlötterer, C. (eds). Oxford University Press. 1-9
- Hedgecock, D., Malecha, S.R. 1991. Prospects for the application of biotechnology to the development and improvement of shrimp and prawns. In: *Shrimp culture in North America and the Caribbean*. Sandifer, P. A. (ed). World Aquaculture Society, Vol. 4. 161-200.
- Ibarra, A.M. 1999. Steps towards the implementation of a genetic improvement program for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) in Mexico. In: Cabrera T.D., Jory D., Silva M. (eds.). *Memorias del Congreso de Acuicultura 99: Acuicultura en Armonía con el Ambiente*, Tomo II. Puerto La Cruz, Venezuela, 17-20 Noviembre 1999. 279-286.
- Lift, M., Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44, 397-401.
- Lester, L.J. 1983. Developing a selective breeding program for penaeid shrimp mariculture. *Aquaculture* 33, 41-50.
- Norris, A.T., Bradley, D.G., and Cunningham, E.P. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture* 180, 247-264.
- O'Connell, M., and Wright, J.M. 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, 331-363
- McCarty, C. 1998. *Chromas 1.45*. Free program at: <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>
- McPherson, M.J., Møller, S.G. (2000). *PCR*. BIOS Scientific Publishers. 276 pp.
- Meehan, D., Xu, Z., Zuniga, G., Alcivar-Warren, A. 2003. High frequency and large number of polymorphic simple sequence repeats in cultured shrimp, *Penaeus*

(*Litopenaeus*) *vannamei* (Abstract). Plant and Animal genome XI Conference, January 11-15, 2003, San Diego, CA. 236.

- Moore, S.S., Whan, V., Davis, G.P., Byrne, K., Hetzel, D.J.S., Preston, N. 1999. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 173, 19-32
- Moxon, E.R., Wills, C. 1999. DNA microsatellites: Agents of evolution? *Scientific American* January, 72-77.
- Nugroho, E., Taniguchi, N., 1999. Isolation of greater Amberjack microsatellite DNA and their application as genetic marker to species of genus *Seriola* from Japan. *Fisheries Science* 65, 353-357.
- Palumbi, S., Benzie, J. 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 1, 27-34.
- Perez-Enriquez, R., Taniguchi, N. 1999. Genetic structure of red sea bream (*Pagrus major*) population off Japan and the southwest Pacific, using microsatellite DNA markers. *Fisheries Science* 65, 23-30.
- Perez-Enriquez, R., Takagi M., Taniguchi, N. 1999. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture* 173, 413-423.
- Perez-Rostro, C.I., Ramirez, J.L., and Ibarra, A.M. 1999. Maternal and cage effects on genetic parameter estimation for Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei* Boone). *Aquaculture Research* 30, 681-693.
- Perez-Rostro, C.I., Ibarra, A.M. 2003a. Heritabilities and genetic correlations of size traits at harvest size in sexually dimorphic Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) grown in two environments. *Aquaculture Research* 34, 1079-1085.
- Perez-Rostro, C.I., Ibarra, A.M. 2003b. Quantitative genetic parameters estimates for size and growth rate traits in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone 1931) when reared indoors. *Aquaculture Research* (in press).
- Pongsomboon, S., Whan, V., Moore, S.S., Tassanakajon, A. 2000. Characterization of tri- and tetranucleotide microsatellites in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *ScienceAsia*, 26, 1-8.
- Robainas, A., Monnerot, M., Solignac, M., Dennebouy, N., Espinosa, G., Garcia-Machado, E. 2002. Microsatellite loci from the pink shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea, decapoda). *Molecular Ecology Notes* 2, 344-345.

- Rozen, S., Skaletsky, H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386 (Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html.)
- SAGARPA, 2002. Anuario estadístico de pesca 2001. Mexico, D.F.:Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sbordoni, V., De Matthaeis, E., Cobolli Sbordoni, M., La Rosa, G., Matoccia, M. 1986. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Aquaculture*, 57, 239-251.
- Schlötterer, C., 1998. Microsatellites. In: *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Hoelzel, A.R. (ed). IRL Press, Oxford, 237-261.
- Schug, M.D., Wetterstrand, K.A., Gaudette, M.S., Lim, R.H., Hutter, C.M., Aquadro, C.F. 1998. The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology* 7, 57-69.
- Simm, G. 1998. *Genetic improvement of cattle and sheep*. Farming Press. New York. 433 pp
- Stallings, R.L., Ford A.F., Nelson, D., Torney, D.C., Hildebrand, C.E., Moyzis, R.K. 1991. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10, 807-815.
- Stallings, R.L. 1995. Conservation and evolution of (CT)_n/(GA)_n microsatellite sequences at orthologous positions in diverse mammalian genomes. *Genomics* 25, 107-113.
- Strassmann, J. E., Solis C. R., Peters, J. M., Queller, D.C. 1996. Strategies for finding and using highly polymorphic ADN microsatellite loci for studies of genetic relatedness and pedigrees. In: *Molecular Zoology: Advances, strategies, and protocols*. Ferraris, J.D. y S. R. Palumbi (ed). Wiley-Liss, Inc. 163-180.
- Sunden, S.L.F., Davis, S.K., 1991. Evaluation of genetic variation in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. *Aquaculture* 97, 131-142.
- Supungul, P., Sootanan, P., Klinbunga, S., Kamonrat, W., Jarayabhand, Tassanakajon, A. 2000. Microsatellite polymorphism and the population structure of

the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Marine Biotechnology* 2, 339-347.

- Susol, E., Eyre, S., John, S. 2000. High-throughput genotyping of microsatellite markers. In: *SNP and Microsatellite genotyping. Markers for genetic analysis*. Worthington J., John, S. (eds). Eaton Publishing. Natick, MA. 49-66.
- Tassanakajon, A., Amornrat, T., Premruethai, S., Vichien, R., Doug, C., Pedermsak, J., Sirawut, K., Vichai, B. 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7, 55-61.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J., 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 967-981.
- Ueno, S., Yoshimaru, H., Tomaru, N., Yamamoto, S., 1999. Development and characterization of microsatellite markers in *Camelia japonica* L. *Molecylar Ecology* 8, 335-336.
- Weber J.L., May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* 44, 388-396.
- Wolfus, G. M. , Garcia D.K., Alcivar-Warren, A. 1997. Application of the microsatellite technique for analizing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture* 152, 35-47.
- Wuthisuthmethavee, S., Lumubol, P., Rattanamahavichai, N., Toojinda T., Tragoonrung, S., Vanavichit, A., 2000. Development of microsatellite markers and comparison of PCR-based markers for diversification in shrimps (Abstract). Plant and Animal genome VIII Conference, January 9-12, 2000, San Diego, CA.
- Xu, Z., Dhar, AK, Wyrzykowski, J, Alcivar-Warren, A. 1999. Identification and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome. *Animal Genetics* 30, 150-156.
- Xu Z., Primavera, J.H., Pena L.D., Pettit, P., Belak, J., Alcivar-Warren, A. 2001. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* 199, 13-40.
- Yeh, F.C., Yang, R., Boyle, T. 1999. POPGENE, Version 1.31, Microsoft Window-based freeware for Population Genetic Analysis. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>
- Zane, L., Bargelloni L., Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1-16.

APÉNDICE I

Protocolo de extracción de ADN de camarón. Modificado de García y Benzie (1995) y García et al. (1994).

1. Macerar un pequeño fragmento (volumen equivalente a un grano de arroz) de tejido (sin cutícula) con un bisturí.
2. Colocar en un tubo de 1.5 ml y agregar 350 µl de TNES (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 25 mM, SDS 1 %, pH 8). Macerar con un pistilo.
3. Agregar 350 µl de TNES y 3.5 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Incubar con movimiento a 65° C por 1 hora (ej. horno de hibridación).
4. Agregar 70 µl de CTAB 10%. Incubar con movimiento a 65° C por 10 min.
5. Añadir un volumen similar de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar por inversión hasta que desaparezcan las dos fases y se tenga una tonalidad blancuzca (ej. 5 min. en horno de hibridación a temperatura ambiente). Centrifugar a 13,000 por 5 min.
6. Recuperar sobrenadante y repetir el paso anterior.
7. Recuperar sobrenadante y añadir un volumen similar de cloroformo. Mezclar por inversión y centrifugar (13,000 rpm, 5 min.).
8. Recuperar sobrenadante y añadir 1 ml de etanol absoluto mantenido a -20° C. Mezclar invirtiendo los tubos. Incubar 1 hora a -20° C.
9. Centrifugar 10 min. a 13,000 rpm. Tirar el líquido cuidando que el ADN precipitado no se desprenda del fondo.
10. Agregar 500 µl de etanol 70 %. Centrifugar (13,000 rpm, 1 min.). Tirar el alcohol.
11. Secar el ADN precipitado en una centrífuga de vacío "Speed vac" por 20 min a temperatura ambiente.
12. Resuspender el precipitado en 50-100 µl de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4) . Agregar 2 µl de ARNasa (10mg/ml) e incubar a 65 °C por 30 min.
13. Almacenar a 4 °C para uso en el corto o mediano plazo. Almacenar de manera permanente a -20° C.

14. Determinar calidad del ADN corriendo en gel de agarosa al 1 %. Comúnmente una banda conspicua de poco avance sin barridos indica ADN no desnaturalizado de buena calidad.
15. Determinar concentración y calidad mediante espectrofotómetro. Relación 260 nm/280 nm alrededor de 1.8 indica ADN sin impurezas (ARN y proteínas).
16. Hacer diluciones del ADN para amplificar microsatélites mediante PCR. Comúnmente diluciones entre 1:50 y 1:100, nos dieron una concentración final de 50 ng/ μ l.

APÉNDICE II

Reacción de PCR para amplificar RAPDs (Polimorfismos amplificados al azar) (Garcia et al., 1994).

	Cantidad	Concentración final en la sol.
- ADN templado (Sol. 50 ng/μl).....	2 μl.....	(2 ng/μl)
- Primer (Sol. 1.22 μg/μl).....	0.5 μl.....	(0.012 μg/μ)
- Buffer 10x (Tris-HCL + MgCl ₂).....	5.0 μl.....	Tris-HCL 10 mM MgCl ₂ 1..5 mM
- dNTPs mix(10 mM)	1.0.....	(0.2 mM c/dNTP)
- Taq polimerasa (5 unidades/μl).....	0.5 μl.....	(0.05 unidades/μl)
- Agua destilada.....	41.0 μl	
Volumen de la reacción.....	50.0 μl	

Condiciones para la amplificación

40 ciclos de:

94° C 1 min

35° C 1 min 30 seg

72° C 1 min

APÉNDICE III

***Protocolo para la digestión parcial del ADN con la enzima de restricción Sau3A1.
Modificado de Estoup y Turgeon (1996).***

1. Incubar el ADN genómico concentrado a 65 °C por 30 min.(tratamiento que ayuda a desempaquetar el ADN).
2. Preparar la siguiente reacción en un tubo de 500 µl:
 - ADN genómico concentrado (8 a 10 µg).....20 µl
 - Sau3A1.....1.5µl
 - Buffer 10X.(Tris-HCl 100 mM,
MgCl₂ 15 mM, KCl, 500 mM, pH 8.3).....4.0µl
 - H₂O_d.....14.5 µl
 - Volumen final de la reacción.....40.0 µl
3. Preparar simultáneamente una reacción control similar a la anterior solo que sin enzima (Sau3A1). En caso de que se cuente con poco ADN genómico hacer una reacción de menor volumen.
4. En un microondas de uso doméstico calentar a máxima potencia las reacciones 10 segundos y dejar reposar 2 min Repetir el proceso 4 veces.
5. Incubar de 2 a 8 horas a 37 °C.
6. Correr en un gel de agarosa al 1 %, la digestión y el control por aproximadamente 30 a min. a 120 V. Teñir con bromuro de etidio y observar bajo UV.
7. Se considera una digestión parcial adecuada cuando los fragmentos se encuentran principalmente entre 300 y 600 pb. Si el control presenta barridos repetir acortando tiempos de incubación. Si el barrido en las digestiones se concentra por arriba de lo esperado, después del paso 4 incubar 1 hora para después calentar a 65 °C por 20 min. y agregar otra dosis de Sau3A1 (1.5 µl). Repetir a partir del paso 5.
8. Almacenar la reacción a 4 °C hasta la ligación a un plásmido bacteriano.

APÉNDICE IV

Purificación de ADN plasmídico (Minipreps). Sambrook et al. (1989) más modificaciones por Reyna Romero-Geraldo.

1. Bajo una campana de flujo laminar (condiciones estériles) transferir una colonia bacteriana de *E. coli* (p. ej. pBluescript) a 2 ml de medio LB en un tubo de cultivo con la tapadera ligeramente floja. Incubar alrededor de 16 horas a 37 °C con agitación (225 rpm).
2. Recuperar 1.6 ml en un tubo de microcentrifugación y centrifugar a 4° C a 14,000 rpm por 15 min. Decantar el sobrenadante.
3. Lavar en 1ml de sol. I fría (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10mM) invirtiendo el tubo 5 veces (no resuspender). Centrifugar a 4° C a 14,000 rpm por 1 min.
4. Resuspender con agitador de vórtice en 100 µl de sol. I fría.
5. Agregar 200 µl de sol. II (NaOH 0.2 N, SDS 1 %) recién preparada, mezclar por inversión 5 veces. Incubar 5 min. a temperatura ambiente y 5 min. en hielo.
6. Agregar 150 µl de sol. III fría (acetato de potasio 5 M 60 ml, ácido acético glacial 11.5 ml, H₂O 28.5 ml), mezclar por inversión 5 veces. Incubar 15 min. en hielo. Centrifugar a 4° C a 14,000 rpm por 10 min.
7. Recuperar 350 µl de sobrenadante. Agregar 1 ml de etanol absoluto frío (-20° C). Mezclar por inversión e incubar de 30 min. a toda la noche a -20° C, hasta que se forme una nube de ADN.
8. Centrifugar a 4° C, 14,000 rpm por 10 min. Eliminar sobrenadante.
9. Lavar con etanol al 70 % sin resuspender.
10. Secar al vacío el ADN plasmídico precipitado (usar microcentrífuga de vacío a temperatura ambiente).
11. Resuspender en 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4). Agregar 1 µl de ARNasa (2 µg/µl). Incubar 30 min. a 37 °C.
12. Determinar concentración midiendo a 260 nm en espectrofotómetro.

13. Verificar calidad en un gel de agarosa 1 %. Si es necesario verificar el tamaño del plásmido (p. ej. el plásmido pBluescript II SK mide 2961 pb), linearizarlo (ver Apéndice V) digiriendo con una enzima de restricción de corte único.

APÉNDICE V

Digestión con BamHI y Defosforilación del vector para ligación (Soledad Moreno, com. pers.)

1. Digerir el vector plasmídico con la enzima de restricción siguiendo la siguiente reacción:
 - DNA plasmídico concentrado.....15 μ l
 - BamHI.....1 μ l
 - Buffer 10X.....2 μ l
 - H₂O_d.....2 μ l
 - Volumen final de la reacción.....20 μ l
2. Incubar a 37 °C por 1 hora.
3. Inactivar la enzima incubando a 65 °C por 10 min.
4. Agregar a la reacción anterior lo siguiente:
 - Fosfatasa alcalina (20 U/ μ l).....1 μ l
 - Buffer de defosforilación.....4 μ l
 - H₂O_d.....15 μ l
 - Volumen final de la reacción.....40 μ l
5. Incubar de 20 a 40 min. a 37 °C.
6. Inactivar la fosfatasa con 1/10 del volumen de EDTA 0.2 M (4 μ l) e incubando a 65 °C por 10 min.
7. Llevar a un volumen de 100 μ l con H₂O_d.
8. Lavar con 1 volumen de fenol:cloroformo. Centrifugar 5 min.
9. Separar fase acuosa y agregar 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto.
10. Reposar 15 min. a temperatura ambiente. Reposar 3 min. a -20° C. Centrifugar 10 min.
11. Extraer el sobrenadante, lavar 2 veces con 1 ml de etanol al 70 %.
12. Secar a 37° C y resuspender en 20 μ l de H₂O_d.

APÉNDICE VI

Ligación de las digestiones en un vector plasmídico (Soledad Moreno, com. pers.)

1. Preparar en tubos de 500 µl las siguientes reacciones.

	Proporción inserto/vector	
	2:1	3:1
- DNA digerido (sin purificar).....	6 µl.....	9 µl
- Vector plasmídico (20 ng/µl).....	3 µl.....	3 µl
- Buffer 10X.....	2 µl.....	2 µl
- Ligasa T4(Boehringer).....	1 µl.....	1 µl
- H ₂ O _d	8 µl.....	2 µl

2. Incubar a 16 °C toda la noche.

APÉNDICE VII

Preparación de células competentes y transformación (Sambrook et al., 1989). Realizar bajo condiciones estériles (Campana de flujo laminar)

1. Picar una colonia de la bacteria a transformar (p. ej. XL Blue, DH5 α) con un palillo estéril e inocular en un tubo con 5-10 ml de medio LB. Incubar a 37° C con agitación (250 rpm) por toda la noche (no apretar la tapadera del tubo).
2. Agregar 500 μ l del cultivo anterior a 50 ml de LB (en matraz de 100 ml). Incubar a 37° C con agitación (250 rpm) por 3 horas.
3. Dividir en 2 tubos Falcon TM estériles (25 ml), colocar en hielo por 10 min.
4. Centrifugar los tubos a 4,000 rpm, 10 min a 4° C. Descartar el sobrenadante.
5. Resuspender el precipitado en 10 ml de CaCl₂ 0.1 M frío y estéril.
6. Mantener en hielo 10 min.
7. Centrifugar a 4,000 rpm, 10 min. a 4° C.
8. Invertir el tubo 1 min. (drenar el fluido).
9. Resuspender en 1 ml de CaCl₂ 0.1M frío y estéril.
10. Agregar 200 μ l de la suspensión (células competentes) a tres tubos Eppendorf TM de 1.5 ml.
11. A cada tubo agregar lo siguiente:
 - (1) 10 μ l de ADN ligado (vector e inserto)
 - (2) 10 μ l de vector plasmídico sin inserto (control positivo)
 - (3) 10 μ l de H₂O_d (control negativo)
12. Mezclar lentamente por inversión.
13. Mantener los tubos en hielo por 30 min.
14. Colocar los tubos 90 seg. a 42° C sin agitación.
15. Colocar 30 seg. en hielo.
16. Agregar a cada tubo 800 μ l de medio LB estéril.
17. Incubar 1 hr. a 37° C con agitación.
18. Centrifugar a 3600 rpm, 10 min. a 4° C.

19. Tomar 200 μ l y sembrar en cajas de Petri con medio LB, Ampicilina (0.1mg/ml) , Xgal (0.05 mg/ml), IPTG 0.5mM.
20. Incubar por 12-20 hrs. a 37° C.
21. En las cajas (1) se espera que todas las clonas que crezcan hayan sido transformadas ya que poseen el vector plasmídico con resistencia a la ampicilina, además las clonas azules tendrán solo el vector y las clonas blancas serán las que posean el vector con el inserto ligado. En las cajas (2) se espera que solo crezcan clonas azules (sin inserto). En las cajas (3) no debe de crecer nada.

APÉNDICE VIII

Estimación rápida del tamaño del inserto en clonas bacterianas mediante PCR Modificado de Estoup y Turgeon (1996)

1. Bajo condiciones estériles picar con palillo de dientes una fracción de la clona crecida en caja de Petri (simplemente tocar el centro de la colonia con la punta del palillo) y remojar la punta en 50 µl de H₂O_d estéril en tubo de 500-1500 ml (basta con agitar el palillo uno segundos).
2. Incubar los tubos por 5 min. en agua hirviendo (100° C). Inmediatamente transferir a hielo.
3. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 min. para precipitar la debris celular. Almacenar a 4° C o -20° C.
4. Tomar 2 µl del sobrenadante como templado para la siguiente reacción de PCR. A manera de control es importante amplificar simultáneamente una clona azul sin inserto.

	Cantidad	Concentración final en la sol.
- ADN templado.....	2.0 µl	
- Primer T3 (1 pmol/µl).....	2.5 µl.....	(0.1 pmol/µl)
- Primer T7 (1 pmol/µl).....	2.5 µl.....	(0.1 pmol/µl)
- dNTPs mix(10 mM)	0.5 µl.....	(0.2 mM c/dNTP)
- Buffer 10x (Tris-HCL + MgCl ₂).....	2.5 µl.....	Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1.5 mM
- Taq polimerasa (5 unidades/µl).....	0.25 µl.....	(0.05 unidades/µl)
- Agua destilada.....	14.75 µl	
Volumen de la reacción.....	25.0 µl	

Condiciones para la amplificación

Desnaturalización inicial:

96° C 5 min.

5 ciclos de:

96° C 1 min.

43° C 1 min

72° C 4 min

25 ciclos de:

94° C 1 min.

43° C 1 min.

72° C 4 min.

Extensión final

72° C 10 min.

5. Correr los productos de PCR en un gel de agarosa 1 % (30-60 min., 100 volts) con una escalera de tamaño adecuado. Confirmar la presencia del inserto y estimar su tamaño comparando con la escalera y el control sin inserto, este último de 165 pb.

APÉNDICE IX

Marcaje de sondas con biotina con primers aleatorios con el Kit NEBiot Phototope (New England)

1. Preparar en tubos de 500 µl las siguientes reacciones.

- Sonda (0.1 µg/µl).....10 µl	- Control λ.....2 µl
- H ₂ O libre de nucleasas....24 µl.....	32 µl
2. Desnaturalizar en agua hirviendo por 5 min. Poner en hielo 5 min. Centrifugar un instante.
3. Agregar a cada tubo lo siguiente:
 - 5X labeling mix10 µl
 - dNTPs mix 5 µl
 - Klenow fragment..... 1 µl
4. Incubar a 37° C por 30 min. En teoría se obtendrán 884 ng de sonda marcada.
5. Terminar la reacción agregando 5 µl de LiCl 4 M y 150 µl de etanol, incubar a – 70° C por 30 min., centrifugar y lavar con alcohol al 70 %.
6. Resuspender en 20 µl de TE 1X.
7. Para determinar la calidad de la sonda biotinilada hacer diluciones (10 veces) y poner 1 µl en una membrana junto con el control λ. Seguir el procedimiento del kit Phototope-Star Detection de New England visualizando por quimioluminiscencia (Apéndice XI).

APÉNDICE X

Transferencia de ADN de clonas bacterianas a membrana de nylon

1. La membrana debe de ser manipulada con guantes o pinzas. Etiquetar las membranas con lápiz (num. de placa).
2. Colocar la membrana en la placa (usando pinzas), con la cara adecuada en contacto con las clonas. Marcar la membrana con una punta estéril (3 perforaciones asimétricas). Marcar la caja con plumón en el sitio de las perforaciones. Retirar la membrana (con el simple contacto entre membrana y colonias bacterianas existe transferencia).
3. Colocar la membrana (cara arriba) en contacto con un papel filtro empapado en sol. desnaturalizadora (NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M). Eliminar burbujas. Dejar 5 min.
4. Sumergir la membrana en solución neutralizadora (Tris-HCl 1 M, NaCl 1.5 M, pH 7.5 por 2 a 3 min.
5. Cambiar a otro contenedor con solución neutralizadora (2 a 3 min.)
6. Colocar la membrana en SSC 2X, SDS 0.1%. (SSC 20X: NaCl 3 M, Citrato de sodio 0.3M, pH 7.0). Remover la debris bacteriana con los guantes (paso crítico). 3 min.
7. Sumergir en NH_4OAc 1 M, SSC 1X, 1 min.
8. Remover el exceso de líquido. Colocar la membrana (boca arriba) sobre un papel filtro.
9. Secar a 60° C, aproximadamente 10 a 15 min.
10. Exponer la membrana cara abajo por 1 min. a luz UV.

APÉNDICE XI

Hibridación con sondas biotiniladas visualizando por quimioluminiscencia con el kit Phototope-Star Detection (New England)

1. Humedecer la membrana en SSC 6X (SSC 20X: NaCl 3 M, Citrato de sodio 0.3M, pH 7.0).
2. Colocar la membrana en un tubo de hibridación, para una membrana con área de 53 cm² agregar 5.3 ml de sol. de prehibridación (SSC 6X, Sol. Denhardt 5X, SDS 5 %; en donde Sol. Denhardt 50X: Ficoll 5 g, polivinilpirrolidona 5 g, albúmina sérica de bovino 5 g, diluir a 500 ml) (0.1 ml por cm²). Agitar moderadamente por 1 hora a 68° C.
3. Desnaturalizar la sonda biotinilada. 5 min. en agua hirviendo. Centrifugar brevemente a 14,000 rpm.
4. Hibridar agregando: 5.3 µl de sonda biotinilada (0.1 µl por cm²). Incubar con movimiento (horno de hibridación) de 2 a 16 hrs.
5. Drenar solución de hibridación. Lavar con 10 ml de SSC 2X, SDS 0.1 % por 5 min. a temperatura ambiente.
6. Lavar con 10 ml de SSC 0.1X, SDS 0.1 % a 68° C por 15 min. Repetir (2 lavados).
7. Exponer consecutivamente la membrana a las siguientes soluciones, con agitación moderada (horno de hibridación a temperatura ambiente):

Repeticiones	Solución	Tiempo (min.)	ml/cm ²
1	de Bloqueo	5	0.1
1	Estreptavidina	5	0.05
4	de lavado I	5	0.25
1	Biotin alcalin fosfatasa	5	0.05
1	de Bloqueo	5	0.1
4	de lavado II	5	0.25
1	CDP-Star	5	0.025

8. Colocar la membrana cubierta por plástico dentro de un cassette de revelado (cara arriba). En un cuarto de revelado (oscuridad e iluminación con luz roja) colocar una película (Kodak X-Omat) sobre la membrana. Exponer 4 minutos.
9. Sumergir la película en solución reveladora, el tiempo necesario para revelar nítidamente (10-40 seg.). Enjuagar en agua
10. Sumergir en solución fijadora por 1-3 min.. Enjuagar en agua.

APÉNDICE XII

Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6 % y urea 7.5 M

1. En un vaso de precipitados de 50-100 ml, agregar 30 ml (gel 200 x 450 x 0.4 mm) o 60 ml (gel 340 x 450 x 0.4 mm) de solución stock de acrilamida refrigerada (Urea 7.5 M, acrilamida:bis-acrilamida 19:1 6 %, TBE 1X= Tris-ácido bórico 0.09 M, EDTA 0.002M).
2. Agregar 150-300 μ l de APS 10%, y 15-30 μ l de TEMED, agitar ligeramente.
3. Verter la acrilamida entre los dos vidrios que sirven de molde, ya sea previamente preparado y sellado o deslizando uno de los vidrios conforme se agrega la acrilamida. Colocar el “peine” de manera invertida en la parte superior. Verificar el progreso en la polimerización en el sobrante del vaso de precipitados. El gel de poliacrilamida con las cantidades de TEMED y APS agregadas estará listo en aproximadamente 15 min.
4. Enjuagar con agua corriente la cara exterior de los vidrios y montar adecuadamente en la cámara de electroforesis. Llenar las celdas con solución amortiguadora TBE 1X. Verificar que no existan fugas de amortiguador en ningún componente del sistema.
5. Retirar el peine y enjuagar a presión en el espacio ocupado por este. Colocar el “peine” con los “dientes” hacia abajo hasta que se introduzcan ligeramente en el gel.
6. Conectar a una fuente de poder eléctrico (aprox. 1600 volts) y pre-calentar el gel hasta que alcance los 50-55 °C.

7. En tanto se pre-calienta el gel, agregar a los productos de PCR un volumen de “tinte de cargado” (azul de bromofenol 0.3 %, xilene cianol 0.3 %, formamida 98 %), desnaturalizar el ADN calentando por 5 min a 90° C, colocar en hielo inmediatamente.
8. Colocar 3-4 µl de las muestras en cada carril del gel, reservar 4 carriles para cada base de una escalera de secuenciado (p. ej. SequiTherm Cycle Sequencing Kit-Epicentre Tech.).
9. Correr la electroforesis, hasta que el azul de bromofenol del tinte alcance 30 cm de avance (3 horas y media aproximadamente a 1600-1800 volts).
10. Desmontar el gel. Una vez apoyado de manera horizontal remover un vidrio cuidadosamente. Proseguir con el método elegido para la visualización de los productos.

APÉNDICE XIII

Visualización de microsatélites en geles de poliacrilamida mediante Sybr-Green (FMC BioProducts)

1. En una probeta de 100 ml mezclar 8 μ l de Sybr-Green en 20 ml de agua destilada.
2. En un vaso de precipitados de 125 ml agregar 0.48 gr de agarosa y 20 ml de agua destilada, calentar 1 min en el microondas.
3. Agregar inmediatamente la agarosa a la mezcla de Sybr-Green y verter directamente sobre el área del gel en donde se encuentran los productos de PCR a visualizar, dejando que se forme una delgada película. Esperar 5 min a que la agarosa gelifique.
4. Observar en un transiluminador Dark Reader (Clare Chemical Research). Tomar fotografía digital o colocar una hoja plástica transparente y “calcar” los patrones de bandeo. Esta metodología permite detectar la presencia de productos, pero no tiene la resolución suficiente para determinar diferencias alélicas.

APÉNDICE XIV

Visualización de microsatélites en geles de poliacrilamida mediante quimioluminiscencia con el kit Phototope-Star Detection (New England)

1. Inmediatamente después de retirar uno de los vidrios del molde del gel de poliacrilamida, colocar un fragmento de papel filtro 3M de las dimensiones adecuadas para cubrir el área donde se esperan los productos de PCR. Presionar ligeramente para que se adhiera el gel al papel
2. Cortar cuidadosamente el gel con una navaja de bisturí por el contorno del papel filtro. Retirar el papel filtro junto con el fragmento de gel adherido.
3. Colocar 3 fragmentos de papel filtro (mismas dimensiones que el anterior) humedecidos en TBE 0.5X sobre una superficie plana nivelada.
4. Colocar el papel con el gel hacia arriba sobre los papeles humedecidos. Colocar un fragmento de membrana de nylon (p. ej. *Nytran-N*, *Scheleicher & Schuell*) humedecida en TBE 0.5X con la cara más lisa hacia el gel. Agregar 3 papeles secos y por último una superficie plana (p ej. vidrio) que pese aproximadamente 2 kg.
5. Esperar aproximadamente 40 min. hasta que los papeles superiores a la membrana se encuentren humedecidos. Para garantizar una transferencia de ADN exitosa es importante verificar que la difusión del líquido sea a través de la membrana y no por los bordes, por lo que es recomendable no empapar considerablemente los papeles inferiores sino solamente lo suficiente, de esta manera se verá como aparecen pequeñas zonas húmedas en los papeles superiores.
6. Retirar cuidadosamente la membrana, eliminando cualquier fragmento de gel adherido. Fijar el ADN a la membrana secando completamente en un horno a 70° C, aproximadamente 10 min.
7. Colocar la membrana en un tubo de hibridación y agregar consecutivamente los siguientes reactivos del kit *Phototope-Star Detection (New England)* y subsecuentes lavados. Todo esto en un horno de hibridación con movimiento a temperatura ambiente.

Repeticiones	Solución	Tiempo (min.)	ml/cm ²
1	de Bloqueo	5	0.1
1	Estreptavidina	5	0.05
2	de lavado I	5	0.5
1	Biotin alcalin fosfatasa	5	0.05
1	de Bloqueo	5	0.5
2	de lavado II	5	0.5
1	CDP-Star	5	0.025

8. Envolver la membrana en papel plástico, eliminando burbujas y arrugas.
9. En un cuarto oscuro de revelado fotográfico (luz roja de voltaje adecuado) colocar la membrana en contacto con una película de rayos X (Kodak X-Omat) en un cassette de revelado. Dejar 10-30 min en exposición.
10. Sumergir la película 5-15 seg en sol. reveladora (Kodak GBX), hasta que aparezcan los productos de PCR como bandas con buena resolución. Enjuagar en agua corriente. Sumergir 1 min. en sol. fijadora (Kodak GBX). Enjuagar en agua corriente. Dejar secar.
11. Observar sobre un transiluminador de luz visible.

APÉNDICE XV

Microsatélites previamente reportados al año 1999 que amplifican en L. vannamei

Clave	Microsatélite	Primers	Referencia
<i>L. vannamei</i>			
TU7917R	(CA)		GenBank AF006631
TU5733R	(CA)		GenBank AF006630
TU13224R	(GA)		GenBank AF006629
M1	(TTTC)	F: GTGTGTTGCGGAATCGAA R: CTAACCCAATATCGAATC	García et al., 1996 Wolfus et al., 1997
PVS1	(CCTAA) ₆₋₁₅		Bagshaw y Buckholt, 1997
<i>P. monodon</i>			
TUZXPM4.20	(TA) ₂₈ TG(TA) ₆	F: ATGCTCTAACCACCTCGACCACC R: GCGGCTCAAACATAAACCTACC	Xu et al., 1999
TUZXPM4.45	(CA) ₆ (TA) ₃₁ (TGTA) ₇ (TA) ₂ (TGTA) ₄ (TA) ₂ TG(TA) ₃	F: ATCTCTACCAACCTGTCAGC R: TTAGTGAACCCCTTCGTG	Xu et al., 1999
TUZXPM4.85	(CA) ₄ T(AC)G(CA)(CG) ₃ TA(CA) ₉ TA (CA)T(AC) ₂ GC(AC)T(CG)(CA) ₄₃ T (ACGC) ₂ G(CA) ₁₅ CTT(AC) ₆ TT(AC) ₂ TC(AC) ₃ (GCTCTC) ₂ (GCACTC) ₄	F: CTTCGGCGGAAATATGTG R: TTGTGTTTGTGCGAGTGC	Xu et al., 1999
<i>P. setiferus</i>			
Pse002	(AC) ₅	F: CTGAAATACAACCACTTTGC R: CGGGATTCTGTGCTTGAGGG	Ball et al., 1998
Pse028	(CA) ₂₄	F: GATCCTTCTAGCTAAATGGG R: GATCGAAGGTAACTTTATTATC	Ball et al., 1998
Pse036	(AC) ₃₀	F: GACTTTGTATTTTCATAAACGCTG R: CGCTATATTTTCGCAGTAAGGCTAC	Ball et al., 1998

APÉNDICE XVI

*Microsatélites identificados a partir del secuenciado directo sin hibridar. * Secuencia microsatélite/satélite reportada por Bagshaw y Buckholt (1997).*

Clave clona	Tamaño del inserto	Microsatélite	Categoría
Pvan0003	164	(AGC) ₃ (AGG)(ACG)(AGG)(ACG)(AGG) (TA)G(T) ₅ (TA) ₃ AA(TA)(T) ₃ (TA)	Imperfecto Imperfecto
Pvan0012	407	(CCTAA) _n * (CCTAA) _n *	Imperfecto Imperfecto
Pvan0015	235	(CT) ₃ (GA) ₄	Perfecto Perfecto
Pvan0018	322	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan0020	445	(AT) ₂ (AC) ₂ (AT)(AC)(AT)(AG)(AT)(AC)(AT) ₈	Imperfecto
Pvan0013	530	(TC)(TG)T(TC)(TT)(TC) ₃ (AC)(GT)(TC) ₂ T(AC)(CC) (TC)(CA)(TT)(TC) ₂ (CC)(TC) ₂ C(TC) (TA) ₅ (AT) ₄	Imperfecto Perfecto Perfecto
Pvan0014	571	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan0017	564	(TA)CAG(TA) ₃	Imperfecto
Pvan0022	585	(GCA) ₃ CCT(GCA) (ACG) ₃ (TCG) ₃	Imperfecto Perfecto Perfecto
Pvan0025	419	(TC) ₃ ACGT(TC) ₂ (TA) ₅	Imperfecto Perfecto
Pvan0026	524	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan0030	89	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan0032	249	(CA) ₃ (CCTAA) _n *	Perfecto Imperfecto
Pvan0035	547	(T) ₄ CG(T) ₁₀ TC(T) ₄ (CT)(T) ₂ (CT) ₂ CCAGC(T) ₃ (CT) ₂ (C) ₃ (T) ₃ (CT) ₂ (T) ₂ (CT)(T) ₃ (CT)A(C) ₂ (T) ₂ GCT(C) ₄ A(T) ₃ (CT) ₂ TC(CT)	Imperfecto

Clave clona	Tamaño del inserto	Microsatélite	Categoría
<i>Pvan0038</i>	542	(CCTAA) _n *	Imperfecto
<i>Pvan0040</i>	523	(CCTAA) _n *	Imperfecto
		(GAAA) ₈	Perfecto
<i>Pvan0041</i>	133	(GAAA) ₂ (AA) ₂ (GAA)(GAAAA) ₄ (AA)GAAA	Imperfecto
<i>Pvan0043</i>	296	(TTA) ₂ G(TT)(TTA)T(TTA)AA	Imperfecto
<i>Pvan0045</i>	582	(CCTAA) _n *	Imperfecto
		(TTC)GCT(TTC) ₂ CC(TTC)CTT (TTC)	Imperfecto
pb secuenciadas en total	8,703		

APÉNDICE XVII

*Microsatélites identificados a partir de hibridaciones simultaneas con las sondas (CT)₁₀ y (GT)₁₀. * Secuencia microsatélite/satélite reportada por Bagshaw y Buckholt (1997).*

Clave clona	Tamaño del inserto	Microsatélite	Categoría
Pvan0006	>200	(TTAGG) _n *	Imperfecto
Pvan0034	>426	(T) ₄ CG(T) ₁₁ C(T) ₄ C(T) ₃ (CT) ₂ ...(T) ₃ (C) ₃ (T) ₃ (CT) ₂ (T) ₂ CT(T) ₂ CT	Imperfecto
Pvan0183	>300	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan0202	>200	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan0267	> 530	(TA) ₄ CA(TA)TG(TA)TTCTG(TA)(CA) ₇ AAC (TA)(CA) ₇ ANA(CA) ₄ N(CA) ₂ NAA(CA) ₂ ... (CA) ₂ (CAA)(CA) ₂ CCA(TA)(CA) ₆ NT(TA)A(CA) ₂ ... (AG) ₁₁ AGG(AG) ₃₁ ATTGAT(AG) ₅	Compuesto imperfecto Imperfecto Imperfecto
Pvan0296	> 800	(CT)(CCCTTTT)(CT)(CCT)(CT)(CCCT) ₂ T(CT) ₂ (CCCCT)(CCGCCT)(CCTT)... (GAAA) ₃ GTNAG(GA) ₃ AGGGAT(GAAAA)GAG (GA) ₇ GT(GA) ₂₃ ... (AC) ₁₂ AT(AC) ₄ AA(AC)AA(AC) ₆ AA(AC)AA(AC) ₅ (ACCC)(AC) ₁₂ GC(ACCC)(AC) ₁₂ (ACCC)(AC) ₃ (AGG)AG(AGGG)ACG(AGGG) ₂	Imperfecto Imperfecto Imperfecto Imperfecto Imperfecto
Pvan0389	>520	TAAAA(TAA) ₆ (TCA)(TAA)... (TC)G(TC) ₃ T... (TTTTTC) ₂ (TTC) ₄ (TTTTTC)CTAC(GTT) ₃ (CCT)(GT) (CTT) ₂ GTT(CTT)... ...(AG) ₁₄ GG(AG) ₁₄ ATGGA(AG)G(AG)AA(AG) ₆ CG (AG)GG(AG) ₃ GGG(AG)... TT(CT) ₁₀ TT(CT)TG(CT) ₅	Imperfecto Imperfecto Compuesto imperfecto Imperfecto Imperfecto
Pvan0449	>250	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan0468	161	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan0546	215	(CTAT) ₂ CTGT(CTAT)(CTTAT)(CTAT)(CTGT)	Imperfecto
Pvan0559	>460	(CCT) ₃ (GT) ₂ (CCT)(TTC) ₂ ...(CCT)(CTT)...(CTT) ₂ ...(CCCCCT)...(CCTT)(CT) ₂ GT(CCT)AG(CT) ₂ ... (TA) ₂₉	Imperfecto Perfecto
Pvan0591	186	(CA) ₂ (A) ₂ (CA)(A) ₄ (CA)(A) ₂ (CA) ₂ (A) ₂	Imperfecto
Pvan0764	>660	(TC) ₄ (C) ₄ (TC) ₂ (T) ₂ (TC) ₆ T	Imperfecto

Clave clona	Tamaño del inserto	Microsatélite	Categoría
Pvan0814	166	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan0816	66	(TA) ₃ (CA)A(CA)(CATTT) ₂	Imperfecto
Pvan0983	156	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan0991	638	(ATCATT)GTT(ATCATT)ATTAAT(ATCATT) ₂ ... (ATT) ₃ ...(ATT) ₂ ATC(ATT) ₂ ...(TTA) ₂ TAA(TTA) ₂ TCG(TAA) ₄ (TTA) ₃ ...(TTATCA) ₂ (TTA) ₂ ...(TTA) ₂	Compuesto imperfecto
Pvan1003	>940	(C) ₇ T(C) ₄ TCG(C) ₂ T(C) ₂ (T) ₃ ...(CTT) ₃ (GT) ₉ GC(AT) ₂ (GT) ₆ (TC)T(TC) ₅ (TTA) ₂ ...(ATT) ₂ GTT(ATT) ₃ (ATC) ₅ ...(TTA) ₂ (TA) (TTA)CTA(TTA) ₂ ...(TTA) ₃ ...(TTA) ₂ ..(AAT) ₂ AC (TAA) ₂ ...(ATC) ₂ ...(ATC) ₂ (TG) ₃ (TTGAA) _n *	Imperfecto Imperfecto Imperfecto Compuesto imperfecto Perfecto Imperfecto
Pvan1004	>945	T(A) ₄ T(A) ₄ TGT(A) ₁₆ (TA) ₂₂ (A) ₃ GG(A) ₈ T(A) ₅ T(A) ₄ (TAA) ₁₁ (GA) ₃ ...(ACAG) ₂ (ATAG) ₂ ...(AT) ₃ ...(TAAA)(A) ₄ (TAAA)(A) ₂ (TAAA)A(TAAA) (AG) ₁₀ ...(AG) ₃ AAAC(AG)(AGAT) ₆ (AG) ₈	Imperfecto Perfecto Compuesto imperfecto Compuesto imperfecto
Pvan1019	226	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan1074	249	(ACC) ₃ ...(CGG) ₃	Compuesto imperfecto
Pvan1136	425	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan1145	244	(GC) ₃	Perfecto
Pvan1146	160	(CA) ₃ (T) ₃ (CTT) ₃ TAGA(AT)(AT) ₃ A(AT) ₃ AAT	Compuesto imperfecto
Pvan1155	403	(GAA) ₃ (CTGT) ₄	Perfecto Perfecto

Clave clona	Tamaño del inserto	Microsatélite	Categoría
Pvan1178	171	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan1207	154	(TTAGG) _n *	Imperfecto
Pvan1209	>580	A(AT) ₄ GT(AT) ₄ TT(AT) ₈ (T) ₁₉ (TTC) ₁₂ (TTTC) ₁₃ (TTTTTC) ₂ TTT (AT) ₂₄ (GT) ₅ (TG) ₄ (TA) ₄ ...(TA) ₇ T(TG) ₇ CG(TG) ₇ (TA) ₁₈ (CA) ₄ (TA) (TG)(TA) ₂ (TG)(TA) ₃ (TG) ₆	Compuesto imperfecto Compuesto perfecto Compuesto imperfecto
Pvan1211	463	(GCA) ₅ (GCG)(GCC)(GCA) (CCG) ₆ CCCATG(CCG) ₂ GC TTT(CTTTT)GG(CTTT) ₃ T(CT)(CTTT)(CT)C (CTTTTTT) (CCTAA) _n *	Imperfecto Imperfecto Imperfecto Imperfecto
Pvan1214	287	(TC) ₃ CCTT(TC)TT(TC) ₃ T(TC) ₂ ...(CT) ₃ ...(TCCC) ₃ T (CCTT) ₃	Compuesto imperfecto
Pvan1215	146	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan1341	>280	(GA) ₂ G(GA) ₃ A(GA) ₂ A(GA)A(GA)GC(GA)TGC(GA) G(CA) ₄ ACC(CA) G(GGAAA)A(GGAAA)G(GGAAA)G(GGAAN) (GGAAA)(A) ₁₄ G(GGNAA)(CCCCAA)...(GGNAA) (A) ₉ (GGAAA)G(GGAAN)(AN)(GGAAA)(A) ₇ (CCAAAAA) ₆ (CCTAA) _n *	Compuesto imperfecto Compuesto Imperfecto Imperfecto
Pvan1351	960	C(T) ₇ C(CT) ₆ (T) ₃ (CT)(T) ₂ (CT) ₂₀ (GA) ₄ AA(GA) ₂₀ GG(GA) ₄ CA(GA)CA(GA) ₇ ...(GA) ₄ ... (GA) ₆ ...(GA) ₂ ...(GA) ₂₃	Imperfecto Perfecto Imperfecto
Pvan1365	360	(GC) ₃ (CCTAA) _n *	Perfecto Imperfecto

Clave clona	Tamaño del inserto	Microsatélite	Categoría
Pvan1384	>600	(GAA) ₂ AA(GAA)A (CA) ₃ ... (TTAAA)T(TTAA)T(TTAAA)(TTAAN)(TTAAA) (TTAAN)(TTAA)(TTNAAA)(TNAA)T(TTAAA) ₂ (TTAA) (TTAAA)(TTAA)(TTAAA)(TNAAA)... (AT) ₇ (TAA) ₃ CAA(TAA) ₅ (TAG)...(TA) ₃ CA(TA) ₅ TCA(TA) (TN)(TA) ₄ (TNA) ₃ (TG) ₁₀ (TA) ₄	Imperfecto Perfecto Imperfecto Perfecto Compuesto imperfecto
Pvan1405		(GA) ₃₉ (TTAGG) _n *	Perfecto Imperfecto
Pvan1525		(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan1535	>200	(TTAGG) _n * (GT) ₃ (TAA)(A) ₁₇ (TAA)A(TAA) ₃ TAG(A) ₈ (TAA)(A) ₅ ... (TAA) ₇ A(TAA)A(TAA) ₃	Imperfecto Perfecto Compuesto imperfecto
Pvan1556	222	(C) ₁₂ (CA) ₂ (C) ₃ (CA)(C) ₅ (CA)	Imperfecto
Pvan1595	360	(CAC) ₂ CCG(CAC)(CAAA)(CAC) ₄ (CAA) ₃ TAG(A) ₃ (CAA)(CAG) ₄ (CAA) ₃ (CAG)(A) ₉ (CAC)(CAG)(CAC) (CAT) ₂ AACTGG(CAC)(CAT)(CAC) ₂ (CAT) ₄ (CAAT) (CAA)(CAT) ₄ CAGAT(CAA)(CAT) ₂ (CAGT)(CAT) ₃ C (CAT) ₂ AAT(CAT) ₃ C (CCTAA) _n *	Compuesto imperfecto Imperfecto
Pvan1597	461	(GT) ₃ (CCT) ₄ (CG) ₃ GA(CG) (CCT)(CT)(CCT) ₅ (C) ₅ (CTT) ₂ (C) ₃	Perfecto Perfecto Imperfecto Imperfecto
Pvan1602	369	(TA) ₂ (GATA) ₃ (GA)AA(GA)(GA)AA(GA) ₂	Imperfecto
Pvan1605	>343	(ACG) ₃ (GC) ₃ (CG) ₃	Perfecto Perfecto Perfecto
Pvan1663	>769	(CT) ₃ (AG) ₆ TG(AG) ₅ AGNAGN(AG) ₉ T(AG) ₁₆ AT(AG) ₇ (A) ₂ (AG) ₄ (A) ₂ (AG)(A) ₂ (AG)(A) ₆ (AG) ₃ (A) ₄ (AG) ₂ AT(AG) (AA)(AG) ₂ AT(AG) ₄ (CCTAA) _n *	Perfecto Imperfecto Imperfecto

Clave clona	Tamaño del inserto	Microsatélite	Categoría
Pvan1689	>60	(AT) ₁₉	Perfecto
Pvan1705	393	(GATA)(GAT)(GATA)GTA(GATA)GGAG(GATA) GACA(GATA) ₂ TATG(GAT)GGAGT(GATA)(GAT)	Imperfecto
Pvan1717	169	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan1726	160	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan1735	154	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan1753	170	(CCTAA) _n *	Imperfecto
Pvan1758	>490	(T) ₁₀ (TC) ₇ (CT)...(CCT) ₂ GT(CTTT)(CT) ₂ TAACT (TTA)(T) ₄ (TC) ₄ TT(TC) ₂ TT(TC)...(CT)(TC) ₂ (C) ₃ (CT)(TC)C(TC)C(TC) ₂ (CT)(TC) ₂ C(TC)(C) ₂ (TC)A (C) ₅ (TC) (GC)G(GC) ₃ (TTAGG) _n *	Imperfecto Imperfecto
Pvan1801	201	(TTAGG) _n *	Imperfecto
Pvan1815	292	(TC)(T) ₈ GTNC(T) ₇ (CT) ₂ (CTTT) ₄ GT...(CT) ₂ AT(CT) ₂ C(CT)A(TTC)(CT) ₆ TT(CT)(GC)(TC) ₂ (CCTAA) _n *	Compuesto imperfecto Imperfecto
Pvan1875	159	(TTAGG) _n *	Imperfecto
Pvan1877	>441	(TTA) ₃ TTT(GTA) ₂ (GTG) ₂ CCA(TTA) ₂ CTA(TTA) (CCTAA)(GCTAA)(CCTAA)(CCTCA)(CCTAA) (TCTAA) ₂ (CCTAA)	Compuesto imperfecto Imperfecto
Pvan1895	261	(GATCGAGGTTGAATTCCTTGCTGATTGAAAA CGTTATTTCACT) ₆ (GATC)	Minisatélite perfecto
Pvan1898	>476	(TC) ₂₂ T(TC) ₄ TT(TC)	Imperfecto
Pvan1900	>422	(CAT) ₂ (CGT) ₃ (CAT)CA(CAT) ₄ CACT(CAT)...(CAT) ₂ (CAAT)(CAT)CGTTAA(CAT) ₂ AAT(CAT)(CAGT) ...(CAT) ₃ TAAC(CAT) ₂ CT...(CAT) ₃ ...	Compuesto imperfecto
Pvan1945	228	(GT) ₃ GG(GT) ₂ GA(GT)	Imperfecto
Pvan1969	169	(TTAGG) _n *	Imperfecto
pb secuenciadas en total	20,496		

APÉNDICE XVIII

*Microsatélites y primers diseñados para estandarizar su amplificación. *Diseño de primers forzado.*

Clona	Microsatélite	Primers		Tm °C	% GC	Tamaño del producto (pb)
		Forward:	Reverse:			
<i>Pvan0014</i>	(CT) ₃ ...(GA) ₄	F: GATCGTGAGATACCCAACTC R: CGAGGGAATAACAGGGTT		54.48 54.96	50.00 50.00	170
<i>Pvan0020</i>	(AT) ₂ (AC) ₂ (AT)(AC)(AT)(AG) (AT)(AC)(AT) ₈	F: GGGGGTTATCCCCATATAC R: CACGGTTGGGAGGTAAAG		55.49 56.49	52.63 55.56	181
<i>Pvan0013</i>	(TC)(TG)T(TC)(TT)(TC) ₃ (AC)(G T)(TC) ₂ T(AC)(CC)(TC)(CA)(TT) (TC) ₂ (CC)(TC) ₂ C(TC)(CC)(TT)... (TA) ₅ ...(TTA) ₂ TA...(TTA)(TC)TT (AAT)GCC(AAT) ₂ (TA) ₂ AT(AAC) (ACT)(TAT)(GAT) ₂ (ACT)...(AT) ₄	F: TGCTCTGGTAACGACAAACG R: AGACCTGTGGCGAAGTGC		59.90 59.99	50.00 61.11	282
<i>Pvan0025</i>	(TC)(TG)T(TC)(TT)(TC) ₃ ACGT (TC) ₂ TAC(CC)(TC)CA(TT)(TC) ₂ (CC)(TC) ₂ C(TC)(CC)... (TA) ₅	F: GGCATGTTTTGAGTCTGC R: GACAAAGCCTAACACAGCA		55.04 56.59	50.00 45.00	265
<i>Pvan0040</i>	(GAAA) ₈	F: TTTACGATCAGATTGTTC* C: GAAATAGAAAATAAAGAAC*		46.00 40.76	33.33 21.05	148
<i>Pvan0041</i>	(GAAA) ₂ (AA) ₂ (GAA)(GAAAA) ₄ (AA)GAAA	F: TACACCGTCAGTGCAGTT R: GGAGGAGGGTTTGTTAGC*		53.17 54.64	50.00 55.56	100
<i>Pvan0267</i>	(TA) ₄ CA(TA)TG(TA)TTCTG(TA)(CA) ₇ AAC (TA)(CA) ₇ ANA(CA) ₄ N(CA) ₂ NAA (CA) ₂ ... (CNA)(CA) ₂ (CAA)(CA) ₂ CCA(TA) (CA) ₆ NT (TA)A(CA) ₂ ... (AG) ₁₁ AGG(AG) ₃₁ ATTGAT(AG) ₅	F: TAAGTGTTGCTTACTTGTT R: CCAGAGGTTCTAGAAGAGCA		50.24 54.82	35.00 50.00	>286
<i>Pvan0296</i>	(GAAA) ₃ GTNAG(GA) ₃ AGGGAT (GAAAA)GAG(GA) ₇ GT(GA) ₂₃ ... (AC) ₁₂ AT(AC) ₄ AA(AC)AA(AC) ₆ A A(AC)AA(AC) ₅ (ACCC)(AC) ₁₂ GC (ACCC)(AC) ₁₂ (ACCC)(AC) ₃	F: GCTGGATCAAGAAAGAAAGA* R: GGTTGTGCAAGGTAAGTGTG		54.71 56.66	40.00 50.00	>260
<i>Pvan0389</i>	(AG) ₁₄ GG(AG) ₁₄ ATGGA(AG)G (AG)AA(AG) ₆ CG(AG)GG(AG) ₃ G GG(AG)	F: ACCCTCTCTTTTCCTTTCCGG* R: AAAACGAGAGTGGGAAACGA		59.68 59.71	50.00 45.00	>289
<i>Pvan0764</i>	(TC) ₄ (CC) ₂ (TC) ₂ (TT)(TC) ₆ T	F: CACGGGACACTTAGGCTACC R: ATTGGTTTGTCCACCCTCAA		59.62 60.21	60.00 45.00	279

Clona	Microsatélite	Primers		Tm °C	% GC	Tamaño del producto (pb)
		Forward:	Reverse:			
<i>Pvan1003a</i>	(GT) ₉ GC(AT) ₂ (GT) ₆	F: ATATTTTCATGCGTTCCGAGG R: GACTATCTCACGCGCCTCTC*		59.92 60.13	45.00 60.00	145
<i>Pvan1003b</i>	(TC)T(TC) ₅	F: GCGCTGAGATAGTCTCCTCGG* R: GGCCTCATGAAATCATTAACC*		59.97 60.86	60.00 39.13	180
<i>Pvan1003c</i>	(TTA) ₂ ...(ATT) ₂ GTT(ATT) ₃ (ATC) ₅ ...(TTA) ₂ (TA)(TTA)CTA(TTA) ₂ ...(TTA) ₃ ...(TTA) ₂ ..(AAT) ₂ AC(TAA) ₂ ...(ATC) ₂ ...(ATC) ₂ ... (TG) ₃	F: TCCCTCATCCTTCTCAAGA* R: ATGTGTTACGCTTCGTGGT		59.73 60.44	50.00 50.00	>485
<i>Pvan1004a</i>	T(A) ₄ T(A) ₄ TGT(A) ₁₆ (TA) ₂₂ (A) ₃ G G(A) ₈ T(A) ₅ T(A) ₄	F: TAAAGAACGGCAATGACTG R: CCAGGCTCAAAGGTGGAC		54.85 59.18	42.11 61.11	422
<i>Pvan1004b</i>	(TAA) ₁₁	F: GTCCACCTTTGAGCCTGG* R: TTATGACTTACTGGTCTTGC*		59.18 50.41	61.11 40.00	>281
<i>Pvan1004c</i>	(GA) ₃ ...(ACAG) ₂ (ATAG) ₂ ...(AT) ₃ ...(TAAA)(A) ₄ (TAAA)(A) ₂ (TAA A)A(TAAA)... (AG) ₁₀ ... (AG) ₃ AAAC(AG)(AGAT) ₆ (AG) ₈ . .. GG(AG)AT(AG) ₂ (AGG)(AAG)(AGG)(AG)(AAAG)(AAG)(A) ₄ C GG(AAAG)	F: TACGGTGAAGATGAAGGGGA R: CAGCAGCCTCTCGGAAACT		60.45 60.68	50.00 57.89	357
<i>Pvan1155</i>	(GAA) ₃ ... (CTGT) ₄	F: CTTAGAAACCGCACCAATGT R: GGATGGCAAGCAGACAAGTA		57.76 58.88	45.00 50.00	299
<i>Pvan1209a</i>	A(AT) ₄ GT(AT) ₄ TT(AT) ₈ (T) ₁₉ (TTC) ₁₂ (TTTC) ₁₃ (TTTTC) ₂ TTT	F: GCTCCTTCTGTGTCCATCG R: TTGCCATCGTTATCTACCAAA		59.36 58.17	57.89 38.10	281
<i>Pvan1209b</i>	(AT) ₂₄ (GT) ₅	F: GTTTGGTAGATAACGATGGC R: TGCCTATACATACCTGCAGA*		54.76 55.37	45.00 45.00	>515
<i>Pvan1209c</i>	(AT) ₂₄ (GT) ₅ ... (TG) ₄ (TA) ₄ ...(TA) ₇ T(TG) ₇ CG(T G) ₇ (TA) ₁₈ (CA) ₄ (TA)(TG)(TA) ₂ (T G) (TA) ₃ (TG) ₆	F: GTTTGGTAGATAACGATGGC R: TCCAATACAGAGGCAATGAT*		54.76 55.59	45.00 40.00	>920
<i>Pvan1351a</i>	(T) ₂₅ C(T) ₉ C(T) ₈ ... C(T) ₇ C(CT) ₆ (T) ₃ (CT)(T) ₂ ... (CT) ₂₀	F: AATGTCTCGGGTGGGAGAG* R: TCTCGGTATCGGAGGTGATA		60.06 58.12	57.89 50.00	300
<i>Pvan1351b</i>	(GA) ₄ AA(GA) ₂₀ GG(GA) ₄ CA(GA))CA(GA) ₇ ...(GA) ₄ ...(GA) ₆ ...(GA) 2...(GA) ₂₃	F: TCCGATACCGAGAGCATTTT R: GAGTGTGGCCAGGATGAAAG		59.67 60.66	45.00 55.00	294

Clona	Microsatélite	Primers	Tm °C	% GC	Tamaño del producto (pb)
		Forward: Reverse:			
<i>Pvan1211</i>	(GCA) ₅ (GCG)(GCC)(GCA) (CCG) ₆ CCCATG(CCG) ₂ GC	F: ATCGTCGTGACCGCGCGA* R: CGGTCCAGTCAGATTTTCGGG	69.86 65.09	66.67 60.00	206
<i>Pvan1341</i>	(GA) ₂ G(GA) ₃ A(GA) ₂ A(GA)A(GA) GCGATGCGAG (CA) ₄ ACC(CA)	F: GATCCACGTGTTCTGTCCAA R: CGCAGAGCGAAGTGTATTTG	59.53 59.63	50.00 50.00	230
<i>Pvan1535</i>	(TAA)(A) ₁₇ (TAA)A(TAA) ₃ TAG(A) ₈ (TAA)(A) ₅ ...(TAA) ₇ A(TAA)A(TA A) ₃	F: GTAATGGCCAATGGTGGTG R: ATCTACGGTGGGTGAACAGG	59.64 59.84	52.63 55.00	298
<i>Pvan1597</i>	(CCT) ₄ (CCCT)...(GGA)(GGGA) (GGAA)(GGGGG)... (CG) ₃ GA(CG)... (CCCT)(CT)(CCT) ₅ (CCCC)	F: ATCACCCCTTAACCTCGGGAGG R: ATCAAGCCGGGAAGAAGG*	60.32 60.15	55.00 55.56	262
<i>Pvan1758</i>	(CCT)A(CCCT)(CCAC)(CCCT) ₂ TTC(CCCT)(CCTT)CT(CCCAT) CT(CCCTT)(CCCC)(GCT)(CC CTTT)(CT) ₂ TCGGGT(CT)(AT)A CTCG(T) ₁₀ (TC) ₇ (CT)...(CCT) ₂ GT (CTTT)(CT) ₂ TAACT(TTA)(T) ₄ (T C) ₄ TT(TC) ₂ TT(TC) (T) ₃ GTNC(T) ₇ (CT) ₂ (CTTT) ₄ GT... (CT) ₂ AT(CT) ₂ C(CT)A(TTC)(CT) ₆	F: TATGCTCGTTCCTTTGCTT R: TTGAAGGAAAAGTGTGGGG	59.85 59.94	45.00 45.00	191
<i>Pvan1815</i>		F: GATCATTCGCCCCTCTTTTT* R: ATCTACGGTTCGAGAGCAGA*	60.40 57.64	45.00 50.00	131
<i>Pvan1877</i>	(TTA) ₃ TTT(GTA) ₂ (GTG) ₂ (CCA)(TTA) ₂ (CTA)(TTA)... (CCTAA)(GCTAA)(CCTAA)(CC TCA)(CCTAA) (TCTAA)(TCTAA)(CCTAA) (GATCGAGGTTGAATTCCTTG CTGATTGAAAACGTTATTTCA CT) ₆ (GATC)*	F: AGGTATGCGCTGACTGAAGG R: ATGGATTCAAGGAAGACCCC*	60.42 60.13	55.00 50.00	290
<i>Pvan1895</i>		F: TCGAGGTTGAATTCCTTGCT R: TGAAATGACGTTTTCAATCAGC	59.81 60.12	45.00 36.36	211
<i>Pvan1898</i>	(TC) ₂₂ T(TC) ₄ TT(TC)	F: CGAAGCACACGGGTACTCT R: GCCTTTGTCTTGGAAGTTGG	60.31 59.71	55.00 50.00	>210
<i>Pvan1900</i>	(CAT) ₂ (CGT) ₃ (CAT)CA(CAT) ₄ C ACT(CAT)...(CAT) ₂ (CAAT)(CAT)CGTTAA(CAT) ₂ AAT(CAT)(CA GT)...(CAT) ₃ TAAC(CAT) ₂ CT	F: TTTCTTGCCAAAAATGAGGA* R: TGATGATGATGGTTGAAGATGA*	58.33 58.93	35.00 36.36	208

APÉNDICE XIX

Microsatélites de gran tamaño en los que no fue posible diseñar primers adecuados.

Clona	Microsatélite	Primer	
		Forward	Reverse
<i>Pvan1559</i>	(TA) ₂₉		N
<i>Pvan1991</i>	(ATCATT)GTT(ATCATT)ATTAAT (ATCATT) ₂ ...(ATT) ₃ ...(ATT) ₂ ATC (ATT) ₂ ...(TTA) ₂ TAA(TTA) ₂ TCG (TAA) ₄ (TTA) ₃ ...(TTATCA) ₂ (TTA) ₂ ... (TTA) ₂	∅	
<i>Pvan1341b</i>	G(GGAAA)A(GGAAA)G(GGAAA) G(GGAAN)(GGAAA)(A) ₁₄ G(GGNA A)(CCCCAA)...(GGNAA)(A) ₉ (GGAAA)G(GGAAN)(AN)(GGAAA) (A) ₇ (CCAAAAA) ₆		B
<i>Pvan1384</i>	(TTAAA)T(TTAA)T(TTAAA) (TTAAN)(TTAAA)(TTAAN)(TTAA) (TTNAAA)(TNAA)T(TTAAA) ₂ (TTAA)(TTAAA)(TTAA)(TTAAA) (TNA...)(AT) ₇ (TAA) ₃ CAA(TAA) ₅ (TAG)...(TA) ₃ CA(TA) ₆ TCA(TA)(TN) (TA) ₄ (TNA) ₃ (TG) ₁₀ (TA) ₄		∅
<i>Pvan1214</i>	(TC) ₃ CCTT(TC)TT(TC) ₃ T(TC) ₂ ... (CT) ₃ ...(TCCC) ₃ T(CCTT) ₃	∅	
<i>Pvan1405</i>	(GA) ₂ GG(GA) ₃₉	TCATATATAAATACGATA ↓ ↔	GAAAATAGATACAGCTTTG
<i>Pvan1595</i>	(CAC) ₂ CCG(CAC)(CAAA)(CAC) ₄ (CAA) ₃ TAG(AAA)(CAA)(CAG) ₄ (CAA) ₃ (CAG)(A) ₉ (CAC)(CAG) (CAC)(CAT) ₂ AACTGG(CAC)(CAT) (CAC) ₂ (CAT) ₄ (CAAT)(CAA)(CAT) ₄ CAGAT(CAA)(CAT) ₂ (CAGT)(CAT) ₃ C(CAT) ₂ AAT(CAT) ₃ C	∅	B
<i>Pvan1602</i>	(TA) ₂ (GATA) ₃ (GAAA)(GA)(GAAA) (GA) ₂	∅	
<i>Pvan1663</i>	(AG) ₆ TG(AG) ₅ AGNAGN(AG) ₉ T(AG) ₁₆ AT(AG) ₇ (AA)(AG) ₄ (AA)(AG)(AA) (AG)(AA) ₃ (AG) ₃ (AA) ₂ (AG) ₂ AT(AG) (AA)(AG) ₂ AT(AG) ₄		B
<i>Pvan1689</i>	(AT) ₁₉	↔	N
<i>Pvan1705</i>	(GATA)(GAT)(GATA)GTA(GATA) GGAG(GATA)GACA(GATA) ₂ TATG(GAT)GGAGT(GATA)(GAT)	∅	

∅ : No se puede diseñar, ya que la región microsatélite esta continua al punto de inserción. ↔ : Unicamente existen alrededor de 20 pb entre la región microsatélite y el punto de inserción. ↓ : Tm y % de GC muy bajo (34.98 y 16.67 respectivamente). N: Región mal secuenciada (llena de Ns). B: Microsatélite continuo a la región microsatélite/satélite reportada por Bagshaw y Buckholt (1997).

APÉNDICE XX

Reacción de PCR para amplificar los microsatélites Pvan1758 y Pvan1815

	Cantidad	Concentración final en la sol.
- ADN templado (Sol. 50 ng/μl).....	1 μl.....	(4 ng/μl)
- Primer F (Sol. 1 pmol/μl).....	3.75 μl.....	(0.3 pmol/μl)
- Primer R biotinilado en 5' (Sol. 1 pmol/μl).....	3.75 μl.....	(0.3 pmol/μl)
- Buffer 10x (Tris-HCL + MgCl ₂).....	2.5 μl.....	Tris-HCL 20 mM MgCl ₂ 3.0 mM
- dNTPs (10 mM)	0.25 μl.....	(0.2 mM c/dNTP)
- Taq polimerasa (5 unidades/μl).....	0.1 μl.....	(0.04 unidades/μl)
- Agua destilada.....	1.15 μl	
Volumen de la reacción.....	12.5 μl	

Condiciones para la amplificación

Desnaturalización inicial:

94°C 4 min

35 ciclos de:

94° C 40 seg

56° C 40 seg

72° C 40 seg

Extensión final:

72° C 5 min