



UNIVERSIDAD ESTATAL

PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

**“ELABORACIÓN DE UN MAPA GENÉTICO DE
LIGAMIENTO PARA EL CAMARÓN BLANCO
Penaeus vannamei EMPLEANDO MARCADORES
CODOMINANTES”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

MARITZA KATTY MEDINA GONZÁLEZ

LA LIBERTAD – ECUADOR

2006

UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

**“ELABORACIÓN DE UN MAPA GENÉTICO DE
LIGAMIENTO PARA EL CAMARÓN BLANCO
Penaeus vannamei EMPLEANDO MARCADORES
CODOMINANTES”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

MARITZA KATTY MEDINA GONZÁLEZ

LA LIBERTAD – ECUADOR

2006

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma al CENTRO NACIONAL DE ACUICULTURA E INVESTIGACIONES MARINAS “M.Sc. Edgar Arellano M.” (CENAIM) y a la UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA (UPSE).

Maritza Katty Medina González

C.I. # 090562626-3

DEDICATORIA

A mis padres: César Medina Domínguez y Elsa González Ramírez.

A mis hermanos y para Nanín, Kevinchú y Fefa

AGRADECIMIENTO

A Dios y a la Virgen María por el don de la vida y por permitirme cristalizar mi anhelo.

Al Centro Nacional de Investigaciones Marinas y Acuicultura “CENAIM” por haberme brindado la beca para obtener la formación profesional en el laboratorio de Genética Molecular.

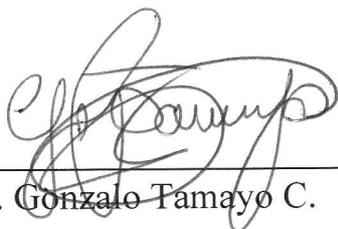
En particular a Franklin Pérez, Ph. Dc. Codirector de tesis, porque con sus ideas científicas profesionales orientó el desarrollo de mis actividades en el Laboratorio.

Al Acuicultor José Melena por sus constructivas sugerencias y por el acceso a mucha información.

A los investigadores, técnicos, operarios y demás personal de “CENAIM” por todo el apoyo y ayuda desinteresada recibida de su parte.

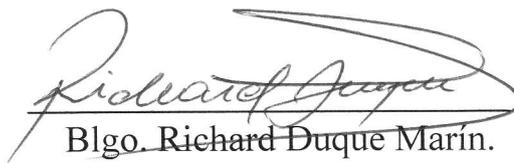
A todos los compañeros de la unidad de genética con los cuales compartí el tiempo que duró el desarrollo de mi tesis.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



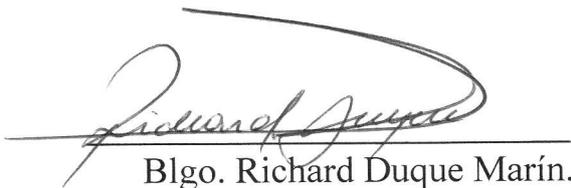
Ing. Gonzalo Tamayo C.

Decano Facultad Ciencias del Mar



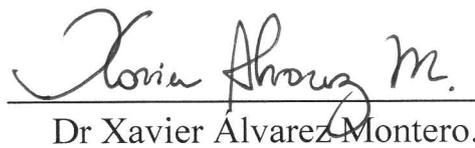
Blgo. Richard Duque Marín.

Director de Escuela Biología
Marina



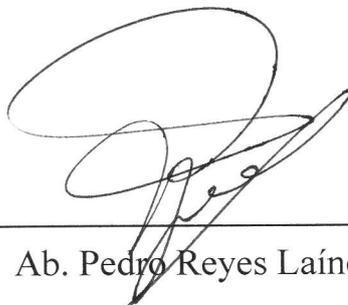
Blgo. Richard Duque Marín.

Tutor



Dr Xavier Álvarez Montero.

Docente de Área



Ab. Pedro Reyes Láinez

Secretario General-Procurador

ÍNDICE GENERAL

Agradecimiento	V
Tribunal de graduación.....	VI
Índice general	VII
Índice de gráficos	XI
Índice de cuadros.....	XII
Glosario	XIII
Abreviaturas	XXV
Resumen	XXVIII
Introducción	1
Justificación.....	3
Objetivo general	6
Objetivos específicos.....	6
Hipótesis.....	7
1. DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA ELABORACIÓN DE UN MAPA GENÉTICO PARA EL CAMARÓN <i>Penaeus vannamei</i>.....	8

1.1.	Genoma del <i>Penaeus vannamei</i>	8
1.2.	Mapeo genético	9
1.2.1.	Mapas de ligamiento	11
1.3.	Marcadores genéticos.....	12
1.4.	Técnicas moleculares para detectar polimorfismo de ADN	13
1.4.1.	La reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	13
1.4.2.	Electroforesis.....	15
1.5.	Marcadores de ADN para análisis genéticos.....	16
1.5.1.	Tipos de marcadores.....	17
1.5.1.1.	Fragmentos de restricción polimórficos (RFLP).....	18
1.5.1.2.	Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP).....	19
1.5.1.3.	ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)	19
1.5.1.4.	Polimorfismo de conformaciones monocatenarias (SSCP).....	20
1.5.1.5.	Sitios etiquetados por la expresión (EST).....	21
1.5.1.6.	Fragmentos polimórficos de ADN amplificados (AFLP).....	22
1.6.	Microsatélites	23
1.6.1.	Aislamiento de microsatélites	25
1.6.2.	Utilidades de los microsatélites.....	26
1.6.3.	Clasificación de los microsatélites	28
1.6.4.	Limitaciones de los microsatélites	29

1.7.	Factores de errores de los microsátélites.....	30
1.7.1.	Alelos nulos.....	30
1.7.2.	Homoplasia.....	31
1.8.	Grupos de ligamientos.....	32
2.	DETERMINACIÓN DE UN MAPA GENÉTICO DE LIGAMIENTO	33
2.1.	Referencia familiar	34
2.2.	Manejo del experimento.....	34
2.2.1.	Extracción de ADN	36
2.2.2.	Purificación con resina	37
2.2.3.	Cuantificación de ADN.....	38
2.2.4.	Evaluación de marcadores.....	38
2.2.5.	Genotipeado	39
2.2.6.	Electroforesis.....	44
2.2.7.	Tinción de plata.....	46
2.2.8.	Documentación.....	48
2.3.	Análisis genéticos.....	48
2.3.1.	Análisis de los geles	49
2.3.2.	Evaluación para verificar segregación mendeliana.....	50
2.3.3.	Análisis de ligamiento	51
2.4.	Construcción del mapa	52

3. ELABORACIÓN DEL MAPA GENÉTICO	53
3.1. Segregación de marcadores	53
3.2. Construcción del mapa	65
4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA ELABORACIÓN DEL MAPA DE LIGAMIENTO	68

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura 1	Esquema de un microsatélite-----	24
Figura 2	Diagrama que muestra el polimorfismo de los microsatélites-----	27
Figura 3	Electroforesis en geles de poliacrilamida con muestras de los parentales y la progenie -----	45
Figura 4	Perfil molecular de bandas de un microsatélite-----	49
Figura 5	Modelo de segregación monomórfico-----	53
Figura 6	Modelos de amplificaciones de microsatélites codificados de acuerdo al formato CP. La muestra antepenúltima corresponde a la hembra y la última al macho .-----	58
Figura 7	Microsatélite considerado como problema asociado a PCR-----	59
Figura 8	Microsatélite en donde se aprecia la presencia de alelo nulo -----	59
Figura 9	Mapa de ligamiento de <i>P. vannamei</i> construido con el método JoinMap.-----	67

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla I	Clasificación de los microsatélites de acuerdo a las diferencias en longitudes.....	28
Tabla II	Lista de primers utilizados para el set de mapeo.....	40
Tabla III	Concentraciones y cantidades de los reactivos utilizados para PCR.....	44
Tabla IV	Protocolo para tinción de geles delgados 0,4 mm (Beidler <i>et al.</i> , 1982)	46
Tabla V	Reactivos utilizados para la tinción de plata en geles de poliacrilamida	47
Tabla VI	Tipo de códigos de segregación para población tipo CP.....	51
Tabla VII	Códigos del genotipo para una población CP, dependiendo del tipo de segregación del locus.....	52
Tabla VIII	Modelos de segregación para genotipos y alelos mediante la prueba estadística de χ^2	55
Tabla IX	Genotipos correspondientes a los marcadores utilizados en la familia mapeada.....	60
Tabla X	Análisis de Chi Cuadrado para alelos y genotipos.....	61
Tabla XI	Grupos de ligamientos estadístico.....	66

GLOSARIO

ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO O ADN.- Molécula que contiene y transmite la información genética. Esta formado por cadenas complementarias de nucleótidos que se enrollan entre sí formando una doble hélice que se mantiene unida por enlaces de hidrógenos entre bases complementarias. Los cuatro nucleótidos que forman el ADN contienen las bases Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) y Timina (T). Dado que en el ADN la A se empareja solo con la T, y la C solo con la G, cada cadena de ADN puede ser empleada como molde para fabricar su complementaria.

ADN COMPLEMENTARIO.- ADN que ha sido sintetizado a partir de esquema de ARN mensajero; con frecuencia la forma de una sola parte de la hélice se usa para probar un mapa físico.

ADN GENÓMICO.- ADN cromosómico nuclear que ha sido aislado directamente de células o tejidos.

ADN REPETITIVO.- Fragmentos de ADN que están repetidos a lo largo del genoma, bien en tándem o bien dispersos. El número de repeticiones (número de copias) es variable.

ALELOS.- Formas alternativas de un locus genético; un único alelo para cada locus se hereda por separado a partir de cada uno de los padres.

ANÁLISIS DE SECUENCIA DE BASES.- Un método para determinar la secuencia de bases.

AMPLIFICACIÓN.- Un incremento en el número de copias de un fragmento específico de ADN, bien mediante un proceso biológico en la célula o mediante técnica de laboratorio.

ARN MENSAJERO.- Molécula de ARN que es el resultado de la transcripción de una secuencia de ADN. El ADN mensajero madura en el núcleo y es exportado al citoplasma para ser traducido en proteína.

AUTORADIOGRAFÍA.- Una técnica que usa film de rayos X para visualizar marcadores moleculares o fragmentos de moléculas, usadas en análisis de longitud y números de fragmentos de ADN, después que son separados en geles mediante electroforesis.

BIBLIOTECA O LIBRERÍA.- Una colección desordenada de clones (ejemplo, ADN clonado a partir de un organismo particular) cuya interrelación de uno con otro puede establecerse por mapeo físico.

CENTIMORGAN.- Unidad usada para expresar distancias en un mapa genético. Es definido como la longitud de un intervalo en el cual hay la probabilidad de 1% de recombinación. En la práctica un cM es equivalente a un Megabase de ADN.

CLONAJE DE ADN.- Producción de múltiples copias idénticas de un fragmento concreto de ADN.

CTAB.- Detergente catiónico fuerte usado para extracción de pleópodos, músculos o post larvas menores a Pl₁₅

CÓDIGO GENÉTICO.- Correspondencia entre los posibles tripletes de ADN (o ARN) y los aminoácidos que codifican.

CROMOSOMA.- Estructura filamentosa autoreplicativa constituida de cromatina.

CROMOSOMAS HOMÓLOGOS.- Son aquellos que contienen información para los mismos caracteres. Se emparejan durante la meiosis y pueden intercambiar segmentos entre ellos.

DELECCIÓN.- Consiste en la pérdida de un fragmento de un cromosoma y por tanto de la información genética que contiene. Puede afectar a un extremo o a una zona intermedia del mismo y según cual sea la longitud del fragmento perdido será mayor o menor la incidencia en el fenotipo del individuo.

DESNATURALIZACIÓN.- De proteínas o de ADN. Proceso por el cual una proteína pierde su forma nativa y en consecuencia cambian muchas de sus propiedades físicas. Una proteína se puede desnaturalizar por calor, cambios en el pH del medio, presencia de diversas sustancias químicas como detergentes, etc. La aplicación en el caso del ADN es la separación de sus dos hebras.

DOMINANTE.- Alelo (o rasgo fenotípico debido al mismo) que se expresa en un individuo heterocigoto.

ELECTROFORESIS.- Un método de separación de moléculas largas (tales como fragmentos de ADN o proteínas) de una mezcla de moléculas similares. Una corriente eléctrica es pasada a través del medio que contiene la mezcla y cada molécula viaja a través del medio, dependiendo de la carga eléctrica y tamaño. La separación esta basada en estas diferencias. Geles de agarosa y acrilamida son los medios comúnmente usados para electroforesis de proteínas o ácidos nucleicos.

ESTERILIZACIÓN.- Muerte o eliminación del medio de cultivo de todos los organismos o seres vivos.

FRECUENCIA DE RECOMBINACIÓN.- Cociente del número de individuos recombinantes encontrados para un marcador genético en una generación dividido por el número total de individuos de esa generación. Se utiliza en estudios de ligamiento para estimar la distancia genética entre dos loci.

FIJACIÓN.- Procedimiento utilizado en histología para provocar la muerte de las células que se someterán a observación, a la vez que se conservan las principales estructura. Existen procedimientos que se basan en la utilización de tratamientos químicos (mediante la acción de un compuesto denominado fijador) y otros en la acción de factores de tipo físico (congelación). Los fijadores en general son coagulantes (alcohol etílico, ácido acético, etc.) utilizados puros o en soluciones diluídas con agua o incluso mixtas. Existen también fijadores que no son sustancias coagulantes como el tetraóxido de osmio o los aldehídos (formol). Estos últimos establecen puentes que unen las moléculas entre sí.

GEL.- Solución rígida y elástica de naturaleza coloidal.

GEN.- Unidad de herencia que ocupa una posición concreta en el genoma (locus) y está constituido por una secuencia de ADN que codifica un ARN funcional.

GENOMA.- Complemento cromosómico básico que contiene toda la información genética del individuo.

GENOMA HAPLOIDE.- El genoma humano contiene, como todos los organismos que se reproducen sexualmente, dos copias de cada gen que reciben de cada uno de sus progenitores. El genoma haploide incluye una sola copia de cada gen.

GENOTIPO.- Conjunto de los alelos de un individuo en uno, varios o todos sus loci.

HERENCIA.- Proceso por el cual determinados rasgos o características se transmite de padres a hijos. Implica la separación y recombinación durante la meiosis y las posibles influencias posteriores sobre el material genético durante la embriogénesis.

HERENCIA MENDELIANA.- Patrón de herencia monofactorial definido por Mendel, puede ser autonómica (dominante o recesiva) o ligada al cromosoma X.

HETEROCIGOCIDAD.- La presencia de diferentes alelos en uno ó más loci, sobre los cromosomas homólogos.

HETEROCIGOTO.- Célula o individuo diploide con alelos diferentes en uno o más loci de cromosomas homólogos.

HOMOCIGOTO.- Célula o individuos con alelos idénticos en uno o más loci de cromosomas homólogos.

INFORMATIVIDAD.- Para un marcador genético, la probabilidad de que un descendiente de una pareja sea informativo, es decir, que se puede deducir el origen parental de cada uno de los alelos de ese locus.

INTRONES.- Secuencia de pares de bases en el ADN que interrumpen la secuencia de proteína codificante de un gen, estas secuencias se transcriben dentro del ARN,

pero se cortan fuera del mensaje, antes de que se trasladen como proteínas, razón por la que también se las conoce como secuencias interpuestas.

IÓN.- Átomo o grupos de átomos portadores de carga eléctrica, ya sea positiva o negativa.

KILOBASE.- Unidad de tamaño de los ácidos nucleicos, correspondiente a una longitud de 1000 nucleótidos. En ADN bicatenario se denomina kilopares de bases (Kbp).

LEYES DE MENDEL.- Principios enunciados por Gregor Mendel en 1865 que describen la herencia cromosómica. Se conocen como principio de uniformidad (1ª Ley), principio de segregación (2ª Ley) y principio de distribución independiente (3ª Ley).

LIGAMIENTO GENÉTICO.- Aquellos genes que se encuentran muy próximos en un cromosoma se suelen transmitir juntos en la descendencia y se dice que se encuentran ligados.

LOD SCORE.- Un estimado estadístico de ligamiento (logarithmic odds ratio) si es probable que dos sitios queden cerca en el mismo cromosoma y por consiguiente son probables de ser heredado juntos. Un LOD score de 3 o más es generalmente tomado para indicar que dos loci están ligados.

LOCUS.- (Plural = loci) Posición que ocupa un gen en un cromosoma, puede estar ocupado por alelos o alternativas de un gen diferente. El uso de locus, a veces está restringido para indicar las regiones de ADN que son expresadas.

MAPA FÍSICO.- Serie ordenada de genes y marcadores genéticos localizados en un cromosoma mostrando las distancias físicas relativas (expresadas en pares de bases). Se construye utilizando métodos físicos: secuenciación, mapa de restricción de clones solapantes, hibridación in situ, estudios de deleciones.

MAPA GENÉTICO.- Es el que tiene una menor resolución, muestra la secuencia y posición de los genes a lo largo de un cromosoma, esta localización es relativa, y se establece según patrones de herencia de los diferentes genes o marcadores de cada cromosoma. El patrón de herencia se refiere al estudio de una secuencia completa de nucleótidos (gen o marcador) en función de como se separa y se recombina en las sucesivas generaciones. Permite identificar una enfermedad hereditaria, aunque no se conozca su base molecular ni el gen responsable, siguiendo la herencia del marcador presente en individuos afectados y que no se encuentra en individuos sanos.

MAPA DE LIGAMIENTOS.- Un mapa de las posiciones relativas de los loci en un cromosoma basándose en las frecuencias con que dichos loci se heredan juntos. Las distancias se miden en centimorgans.

MAPEO.- Término que designa colectivamente los distintos procedimientos (tanto físicos como genéticos) empleados en la construcción de mapas genéticos.

MAPEO DE GENES.- Determinación de la posición relativa de los genes de una molécula de ADN (cromosoma o plásmido) y de la distancia, en unidades de ligamiento o unidades físicas entre ellos.

MARCADOR GENÉTICO.- Locus genético con alelos fácilmente detectables, bien porque producen un fenotipo característico o porque pueden estudiarse por métodos nucleares.

MARCADORES POLIMÓRFICOS.- Variaciones en la secuencia de ADN que se transmite de generación en generación de forma mendeliana. Permiten diferenciar alelos en un locus determinado de cromosomas homólogos. Sirven para estudiar los modelos de transmisión de los diferentes genes por el método indirecto del análisis de ligamiento genético. Cada individuo presenta millones de polimorfismos en su genoma.

NUCLEÓTIDO.- Molécula constituida por una base nitrogenada, una pentosa y un grupo de ácido fosfórico. Es la unidad básica de la que se compone un ácido nucleico.

OLIGONUCLEÓTIDO.- Secuencia lineal de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, habitualmente no mayor de 50 nucleótidos.

PAR DE BASES.- Dos nucleótidos complementarios en una molécula de ADN bicatenario.

PEDIGRÍ.- Diagrama que representa la descendencia de unos ancestros, estableciendo la relación entre los diferentes miembros de la familia. Se elabora siguiendo un sistema de símbolos aprobado por convención.

POLIMORFISMO.- Locus genético que está presente en dos o más alelos distintos de forma que el alelo más raro tiene una frecuencia mayor o igual al 1 % (0.01) en la población general. Un polimorfismo puede ser transitorio o estable.

POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN.- Variación existente entre individuos en tamaños de fragmentos de ADN cortados por enzimas de restricción específicas; las secuencias polimórficas que resultan de RFLPs se usan como marcadores en mapas genéticos ya sean físicos o de ligamiento. Los RFLPs generalmente son originados por una mutación en un sitio de corte.

PRIMERS.- Pequeña cantidad de nucleótidos a partir de la cual el ADN polimerasa inicia la síntesis de una nueva molécula de ADN.

RAPD O ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR.- Tipo de marcador genético que puede generarse mediante PCR. Hace posible localizar gran número de marcadores moleculares.

RECOMBINACIÓN.- Intercambio de material genético producido por sobrecruzamiento durante la meiosis y, en ocasiones, durante la mitosis.

RECOMBINANTE.- Individuo con combinaciones de alelos distintas a las encontradas en sus ancestros, como resultado de una recombinación en una de las meiosis progenitoras.

SECUENCIAS DE MARCA EXPRESADA.- Sitio de marca de secuencia procedentes a partir de cADN.

SEGREGACIÓN.- Proceso de separación de los alelos de un locus durante la meiosis: al separarse los dos cromosomas homólogos de un par, cada alelo pasa a un gameto distinto. En sentido más amplio se aplica a la separación de alelos y su distribución a células hijas diferentes, que se produce tanto en la meiosis como en la mitosis.

SOBRECruzAMIENTO O ENTRECruzAMIENTO (CROSSING OVER).-

La ruptura durante la meiosis de un cromosoma materno y de uno paterno, el intercambio de secciones de materiales correspondientes de ADN y el reencuentro de los cromosomas. Este proceso puede resultar en un intercambio de alelos entre cromosomas.

VNTR.- Acrónimo inglés de “Variable number of tandem repeats”. Locus cuyos alelos difieren por tener un número variable de repeticiones en tándem. Son muy polimórficos, por lo que se utilizan como marcadores en estudios de ligamiento y en la determinación de identidad en medicina legal.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico.
AFLP	Amplified fragment length polymorphism.
bp	Pares de bases.
cADN	ADN complementario.
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide.
DNTPs	Dinucleótido trifosfato.
ESTs	Secuencia de Etiquetas Rápidas.
g	Gramo.
IHHNV	Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus.
L	Litro.
M	Molar.
mL	Mililitro.
mM	Milimolar.
m.u.	Unidad de mapa.
ng	Nanogramo.
nm	Nanometro.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
QTLs	Quantitative trait loci.
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar.
RFLP	Fragmentos de restricción polimórficos.

SSCP	Polimorfismo de conformaciones monocatenarias.
TAE	Solución amortiguadora de tris base , ácido acético, EDTA.
TE	Solución amortiguadora de tris ácido clorhídrico, EDTA.
TBE	Solución amortiguadora de tris base, ácido bórico, EDTA.
TSV	Taura Syndrome Virus.
μ	Micra.
WSSV	White Spot Syndrome Virus.
χ²	Chi cuadrado

La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es "¡Eureka!" (¡Lo encontré!) sino "Es extraño" Isaac Asimov (1920-1996).

RESUMEN

Se construyó un mapa genético de ligamiento de baja densidad para el camarón blanco *Penaeus vannamei*. Los datos de segregación de la progenie fueron estudiados en 120 microsátélites. Los análisis de ligamiento fueron hechos con Joinmap 3.0 usando el parámetro cross-pollination. Un total de 46 marcadores fueron asignados a 12 grupos de ligamientos, cubriendo 255 cM. Este mapa posibilitará la rápida construcción para la próxima generación de un mapa de ligamiento de alta densidad.

SUMMARY

A genetic map of binding of low density was built for the shrimp white *Penaeus vannamei*. The data of segregation of the offspring were studied in 120 microsátélites. The binding analyses were made with Joinmap 3.0 using the parameter cross-pollination. A total of 46 markers was assigned to 12 groups of bindings, covering 255 cm. This map will facilitate the quick construction for the next generation of a map of binding of high density.

INTRODUCCIÓN

La camaronicultura en América Latina y especialmente en Ecuador ha sido una de las actividades económicas de mayor crecimiento productivo y económico durante los últimos 15 años, siendo el camarón blanco *Penaeus vannamei* una de las principales industrias pecuarias del Ecuador con exportaciones que sumaron 800 millones de dólares en 1998. A inicios de 1999 se detectó formalmente la presencia del virus de la mancha blanca (WWSV por sus siglas en inglés) causando estragos en la industria camaronera. Cabe mencionar que esta actividad iniciaba apenas la recuperación de los daños causados por otros síndromes tales como el Síndrome de Taura (TVS por sus siglas en inglés) que atacó entre 1994 y 1995, y del Síndrome de la gaviota (1990-1991).

Las enfermedades virales desde la década de los 90 hasta la fecha, han hecho que la producción decline marcadamente lo que ha conducido a la búsqueda de alternativas para reducir costos en los métodos convencionales de mejoramiento y acelerar los procesos de selección.

Para incrementar la eficiencia de selección, particularmente de características genéticas tales como resistencia a enfermedades, eficiencia de conversión alimenticia y procesos de producción, son necesarios marcadores de ADN ligados a características (Waldbieser *et al.*, 2001). Los marcadores moleculares correlacionados

con loci genéticos que controlan características económicas son necesarios para facilitar el desarrollo de raza superior (Liu *et al.*, 2003). Para ubicar esos marcadores y determinar su utilidad en relación a caracteres de interés comercial es necesario la construcción de mapas genéticos (Moore *et al.*, 1999).

Los mapas de ligamiento han llegado a ser herramientas poderosas en los estudios genéticos de muchas especies de animales de importancia económica tales como: Atlantic salmon (Moen *et al.*, 2004); catfish (Liu *et al.*, 2003; Waldbieser *et al.*, 2001); tilapias (Lee *et al.*, 2005; Kocher *et al.*, 1998); carpa común (Tanck *et al.*, 2001); Rainbow trout (Sakamoto *et al.*, 2000; Rexroad *et al.*, 2001); Cattle (Bishop *et al.*, 1994); *Crassostrea gigas* (Hubert y Hedgecok 2004); *Seriola* (Ohara *et al.*, 2005).

En comparación con otras especies, los mapas genéticos en especies penaeidos tienen un desarrollo retrasado si se los compara con otras especies de similar importancia debido básicamente a la falta de investigación en esta área. Sin embargo en los últimos años se ha reportado la generación de mapas en: *P. vannamei* (Pérez *et al.*, 2004), *P. monodón* (Wilson *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003) y *P. japonicus* (Moore *et al.*, 1999).

El mapa inicial del genomio del camarón blanco *P. vannamei* se construyó con marcadores dominantes, utilizando la técnica de Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLPs por sus siglas en inglés) y la estrategia de Pseudocruce de prueba, obteniéndose mapas correspondientes al padre y a la madre (Erazo. 2002).

La desventaja de estos marcadores es que la información no puede ser transferida más allá de la familia que fue mapeada. Si se quieren ubicar genes en otro set de mapeo es necesario generar nueva información genética y el investigador no podrá determinar si las áreas de interés de un mapa son las mismas de otro mapa.

Los mapas de mayor resolución son aquellos que implican la secuenciación completa del genoma de una especie, sin embargo este objetivo no es realizable a corto plazo en *P. vannamei* debido a la carencia de marcadores polimórficos (Liu, 2003).

Este trabajo generó un mapa genético de ligamiento a partir de una familia de camarones usando marcadores codominantes tipo microsatélite basado en secuencias de cADN e intrones en *P. vannamei*, desarrollados por CENAIM, (como parte del marco lógico – año 2004) y otros investigadores, el mismo que será utilizado a futuro para la detección de quantitative trait loci (QTLs por sus siglas en inglés) y marcadores que ayuden en selección asistida de caracteres de interés comercial en camarón blanco.

JUSTIFICACIÓN

La aplicación de la genética al manejo de poblaciones naturales o cultivadas de especies marinas ha experimentado en los últimos años un importante incremento a partir de la utilización de los loci microsatélites (Chambers y MacAvoy 2000).

Los microsatélites son marcadores de selección utilizados en un amplio rango de aplicaciones como: mapeo genético, identificación de individuos y estudios de poblaciones (Beckman y Soller 1990). Los microsatélites son secuencias neutrales, codominantes y altamente póliformicas, reproducibles y abundantes en el genomio y pueden ubicarse tanto dentro y fuera de los genes (Toth *et al.*, 2000).

Los altos niveles que estos exhiben en cuanto a polimorfismo y números en los genomas de todas las especies, además de su amplia distribución en cuanto a localización geonómica, han contribuido a que prácticamente en todos los trabajos que abordan estudios sobre conservaciones biológica, ecología, conducta, rendimientos de poblaciones cultivadas, entre otros, hayan sustituido a las enzimas como marcadores genéticos de elección.

Los microsatélites han sido descritos para varias especies tales como: Atlantic salmon (Slettan *et al.*, 1997), catfish (Liu, 2003), *Penaeus monodon* (Xu *et al.*, 2001, 1999; Wuthisuthmethavee *et al.*, 2003), carpa común (Tanck *et al.*, 2001), Rainbow trout (Rexroad *et al.*, 2001), tilapias (Kocher *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2005) catfish (Liu *et al.*, 1999), *Paralichthys olivaceus* (Coimbra *et al.*, 2003), *Penaeus setiferus* (Ball *et al.*, 1998; Ball y Chapman 2003), *Litopenaeus schimitti* (Maggioni *et al.*, 2003), *Penaeus vannamei* (Bagshaw y Buckholt 1997; Cruz *et al.*, 2003), *Penaeus stylirostri* (Vonau *et al.*, 1999).

Un nuevo tipo de marcadores basados en secuencias ESTs (por sus siglas en inglés: Secuencia de Etiquetas Rápidas) han sido desarrollados para emplearlos en mapeo genético (Tong y Chu 2002). Los ESTs, son moléculas cortas de ARN mensajero (ARNm) representantes de genes expresados en un momento dado y en un tejido específico de donde previamente se aislaron (Mejía, 2002). La caracterización de ESTs es una vía conveniente y rápida para identificar nuevos genes al igual que para mapear genes (Liu *et al.*, 1999) y para selección asistida por marcadores.

Los mapas genéticos son utilizados para determinar la posición de los genes responsables de un carácter determinado. La mayoría de caracteres de interés comercial en mejoramiento genético están controlados por múltiples genes, razón por la que se los conoce como QTLs. (Moore, 1999).

Gracias al rápido avance de la genética molecular, ahora es posible generar y usar información de marcadores para mapear loci (pl de locus: Posición fija en un cromosoma ocupada por un gen dado o por uno de sus alelos) de caracteres cuantitativos o QTLs. Una vez identificados los QTLs con mayor efecto en el genoma, estos pueden ser utilizados para seleccionar individuos con características deseables a una muy corta edad y así incrementar la eficiencia de los programas de selección familiar (Davis y Hetzel 2000).

En USA, Colombia y Ecuador se han iniciado programas de crianza comercial para *P. vannamei*, mientras que para *P. monodón* han sido reportados programas de cría

comercial sin éxito, sin embargo todos los programas de cultivo de camarones pueden beneficiarse de el uso de marcadores moleculares y mapas de ligamiento (Pérez *et al.*, 2004).

OBJETIVO GENERAL

Elaborar un mapa de ligamiento de baja densidad en camarón blanco *Penaeus vannamei* empleando marcadores codominantes tipo microsatélite e intrones para ser utilizado a futuro para la detección de QTLs y marcadores que ayuden en selección asistida de caracteres de interés comercial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la ubicación de los marcadores codominantes (tipo microsatélite) en un mapa de ligamiento para asistir la selección de un grupo de marcadores que permitan identificar regiones que sirvan como herramientas para la selección de caracteres de interés comercial.

Complementar áreas básicas del conocimiento necesarias para responder a las demandas tecnológicas locales de cultivo de importancia para los programas de mejoramiento genético.

Demostrar la facilidad para implementar técnicas moleculares de microsatélites a bajo costo, sin la necesidad de equipo especializado.

HIPÓTESIS

Si empleamos marcadores moleculares codominantes tipo microsatélite, útiles para mapeo genético, determinaremos su utilidad y sus aplicaciones en Acuicultura.

1. DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA ELABORACIÓN DE UN MAPA GENÉTICO PARA EL CAMARÓN *Penaeus vannamei*

1.1. GENOMA DEL *Penaeus vannamei*

Hasta la fecha se han realizado muchos estudios genéticos de algunas especies de peces, mientras que en invertebrados y en otras especies, las investigaciones han sido escasas, de forma que el genoma de los animales acuáticos es poco conocido (Tong y Chu 2002).

En los crustáceos, se conocen pocos genomas completos, siendo uno de ellos el *Penaeus monodon*, mientras que en el *Penaeus vannamei* solo existe información parcial. En el año 1997 existían en el GeneBank los reportes de 4 a 5 genes caracterizados este camarón blanco. A partir de entonces varios grupos de investigadores han incrementado la base de datos con reportes de secuencias genómicas (Mejía, 2002). De esta manera, mediante varias estrategias se han secuenciado aproximadamente un millón de nucleótidos de ADN genómico (Bagshaw y Buckholt 1997).

El genoma haploide del *P. vannamei* está compuesto por 44 cromosomas (Ramos, 1997). Chakravarti *et al.*, (1991) usando el método 4 estimó el genomio total para la

hembra en 4445 cM y para el macho en 3583 cM. En el año 2004, Pérez *et al.*, realizó un mapa de ligamiento con AFLPs con la estima de tamaño de 2777 cM para la hembra y 2116 y para el macho.

1.2. MAPEO GENÉTICO

Mapear es determinar la localización de genes o marcadores moleculares dentro de un genoma. El mapeo genético permite identificar la región del genoma donde reside el gen, es decir su ubicación física dentro de un cromosoma, por lo tanto, la construcción de estos mapas ayudará a entender la estructura, función y evolución del genoma (Slettan *et al.*, 1997) y pueden ser una herramienta importante en el mejoramiento acuícola.

Los mapas genéticos pueden ser mapas físicos o mapas de ligamiento (Miesfeld, 1999). Los mapas físicos muestran la localización relativa de los marcadores específicos de ADN (molécula química que posee la información hereditaria) a lo largo de los cromosoma, mientras que los mapas de ligamientos muestra las posiciones relativas de los loci en un cromosoma basándose en las frecuencias con que dichos loci se heredan juntos.

La ubicación de genes en el genoma además de efectuarse por métodos físicos, puede realizarse mediante el análisis de la frecuencia de la recombinación entre loci. Si dos

genes se encuentran en cromosomas distintos o a una distancia muy grande dentro del mismo cromosoma, se heredan en forma independiente (frecuencia de recombinación $\geq 50\%$). En cambio si existen grupos de genes que se encuentren relativamente cercanos unos de otros (frecuencia de recombinación $< 50\%$) tienden a heredarse conjuntamente y son conocidos como grupos de ligamiento.

La frecuencia de recombinación entre dos loci, por tanto, es proporcional a la distancia física que los separa, sin embargo, estas frecuencias de recombinación no son uniformes en todas las regiones del genoma y se observan desviaciones de estos valores causados por múltiples entrecruzamientos durante la meiosis. Para corregir estos valores se utilizan funciones de mapeo como la de Kosambi (Kosambi, 1944) y Haldane (Haldane, 1919), las cuales por medio de fórmulas matemáticas convierten las fracciones de recombinación en distancias aditivas de mapa.

La unidad de mapa (m.u.) se define como la distancia entre genes en donde uno de cada cien productos meióticos es recombinante. La distancia obtenida mediante la frecuencia de recombinación tiene un carácter de tipo orientativo ya que los doble recombinantes no son detectados y además la frecuencia de recombinación en el caso de las hembras suele ser mayor que en los machos.

1.2.1. MAPAS DE LIGAMIENTO

Para la realización de un mapa de ligamiento es necesario disponer de marcadores polimórficos y el cruzamiento de un gran número de animales con un adecuado pedigrí. Previo a la construcción de un mapa, los marcadores deben ser analizados con una prueba estadística de ajuste de Chi cuadrado (χ^2) (Russell, 1992), para determinar si los marcadores segregan en la progenie según las leyes de Mendel. De acuerdo al ajuste que los marcadores presenten en las proporciones Mendelianas 1:1; 1:2:1 o 1:1:1:1, estos son seleccionados para integrar el mapa.

Debido a que los cálculos de distancias entre marcadores se tornan complejos a medida que el número de marcadores aumenta, se han diseñado programas de mapeo como Map Maker (Lander *et al.*, 1987), Map Manager (Manly *et al.*, 2001) y JoinMap (Van Ooijen y Voorrips 2001) que facilitan esta labor, permitiendo calcular fácilmente distancias genéticas de recombinación entre marcadores y obtener un visión gráfica de los mismos organizándolos por grupos de ligamiento. Así, los mapas de ligamiento son de gran ayuda para la ubicación relativa de los marcadores moleculares.

El posicionamiento en el mapa de marcadores moleculares tiene importantes aplicaciones en el mapeo de loci de caracteres cuantitativos o QTLs. Una vez identificados los QTLs con mayor efecto en el genoma, estos pueden ser utilizados

para seleccionar individuos con características deseables a una muy corta edad y así incrementar la eficiencia de los programas de selección familiar.

1.3. MARCADORES GENÉTICOS

Dentro de los organismos vivos existe una gran variedad de formas, colores y tamaños (características morfológicas), que los distinguen entre sí. Esta variabilidad o “polimorfismo” genético, ocurre en forma natural dentro y entre diferentes poblaciones de organismos. Cualquier diferencia genética detectable entre dos individuos sirve entonces como una “etiqueta” o “marcador genético” rasgo característico y propio de cada individuo o de cierto grupo de individuos. Los marcadores más antiguos y más ampliamente utilizados, son aquellos basados en marcadores morfológicos.

En el caso particular de los camarones, los marcadores genéticos morfológicos se han empleado como una herramienta para identificarlos por especies (Wuthisuthmethavee *et al.*, 2000), sin embargo, cuando las especies están estrechamente relacionadas son difíciles de distinguir las morfológicamente.

Una nueva generación de marcadores genéticos, son los llamados marcadores moleculares o marcadores basados en variación en el ADN, los cuales se basan en la información genética, la que es constante en cualquier parte del animal y en cualquier

etapa del desarrollo. Se define como marcador molecular a toda variabilidad de naturaleza genómica que puede o no estar asociada con la variabilidad de algún parámetro fenotípico.

1.4. TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECTAR POLIMORFISMO DE ADN

Técnicas moleculares (tales como PCR, seguido por electroforesis) pueden ser usadas para la identificación de diferentes alelos, producto del polimorfismo de ADN.

1.4.1. LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa inventada por Kary B. Mullis (1985), permite hacer millones de copias a partir de una muestra simple de ADN. En los últimos años, ésta técnica que permite amplificar un fragmento específico de ADN in vitro ha sido uno de los avances con mayor impacto, tanto en investigación básica como en ingeniería genética.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica una región específica del ADN utilizando dos oligonucleótidos o partidores con las siguientes características:

- 1) flanquean el fragmento de ADN que se quiere amplificar;
- 2) hibridan en hebras

opuestas de la secuencia blanco y 3) se orientan de manera tal que la síntesis de ADN ocurre en la región comprendida entre los dos partidores.

Un proceso de PCR consta de tres pasos: Primero, el ADN genómico que contiene la secuencia que va a ser amplificada se desnatura por el calor y se paralizan todas las reacciones enzimáticas. Luego se continúa con el alineamiento: el ADN desnaturado se hibrida con un exceso de "primers sintéticos" debido a que los primers se están moviendo, causado por el movimiento Browniano y finalmente se realiza la extensión donde se mantiene la temperatura a 72 °C para que ocurra la reacción de polimerización del ADN. Estos ciclos se repiten 25 a 45 veces, produciendo una gran cantidad de moléculas, la mayoría de las cuales contienen los partidores en sus extremos y son del mismo tamaño. Todo este proceso está completamente automatizado en un aparato llamado termociclador.

En la reacción se utiliza la ADN polimerasa Taq, producida por la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, para la etapa de extensión. Como esta enzima es estable a altas temperaturas (sobre 95 °C) no se inactiva en la etapa de desnaturación, y se agrega una sola vez al iniciar la PCR. Además esto permite que la síntesis de ADN se realice a altas temperatura (72 °C) lo que aumenta la especificidad del producto de PCR amplificado, ya que se minimiza la polimerización desde los partidores que están mal apareados con el templado (Kwiatowski *et al.*, 1991).

La gran ventaja de la PCR como herramienta diagnóstica es que permite amplificar ADN que se encuentra en pequeñas cantidades y se puede examinar una región particular del genoma. Cuando se conoce la secuencia de un gen determinado se pueden diseñar partidores que amplifican en forma específica ese gen.

1.4.2. ELECTROFORESIS

En la década de los 50 la electroforesis comenzó a ser utilizada en estudios de diversidad genética. En la actualidad es posible separar una mezcla de moléculas de ADN de acuerdo a su tamaño mediante geles de agarosa o poliacrilamida.

Un gel es esencialmente una red de material gelatinoso en la que se carga el ADN, el cual es sumergido en depósito conteniendo algún bufer y luego sometido a un campo eléctrico. Como los fragmentos de ADN tienen carga negativa (por sus grupos fosfatos), todos se mueven en la misma dirección al ánodo, migrando más rápidamente los fragmentos más pequeños.

Las moléculas de ADN separadas se pueden visualizar mediante su tinción con bromuro de etidio, un colorante que se intercala entre las bases del ADN y que emite fluorescencia cuando se irradia con luz ultravioleta. En geles de poliacrilamida, las moléculas se observan fácilmente después de ser teñidas con nitrato de plata.

Para determinar el tamaño del fragmento de ADN de interés se carga en el mismo gel una mezcla de fragmento de ADN de tamaño conocido (estándar), los cuales sirven como referencia de peso molecular.

1.5. MARCADORES DE ADN PARA ANÁLISIS GENÉTICOS

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN que sirven de referencia para seguir la transmisión de un segmento de cromosoma de una generación a otra. En un sentido restringido, un marcador genético es una entidad genética que manifiesta polimorfismo y se hereda en forma mendeliana. Estos marcadores ofrecen numerosas ventajas sobre alternativas fenotípicas convencionales debido a que son estables y detectables en todos los tejidos, además de que no son afectados por el medio ambiente.

Actualmente los avances en genética molecular han incorporado nuevas técnicas de naturaleza molecular y de mayor sensibilidad para detectar cambios en los genotipos de los individuos, situación que ha permitido grandes avances en estudios de: análisis filogenéticos y taxonómicos, diferenciación de individuos, cuantificación de variabilidad génica intra e interespecífica, mejoras genéticas, localización de genes de resistencia a enfermedades, dispersión de especies y mapeos de genomas.

La información que se consiga con los marcadores variará dependiendo del tipo de marcador. La variación genética detectada por estos marcadores puede ser usada para manipular características, evaluar diversidad genética (Féral *et al.*, 2002) y para la construcción de mapas.

1.5.1. TIPOS DE MARCADORES

Dos clases de loci (Tipo I y tipo II; O'Brien, 1991) forman las bases para la construcción de mapas genéticos dentro de la mayoría de las especies. Loci Tipo I, son marcadores asociados con genes de función conocida (dentro del gen) tales como: ESTs, intrones, Microsatélites-ESTs); mientras que los marcadores tipo II, están asociados con segmentos de ADN anónimos con funciones desconocidas (fuera del gen). Bajo esta clasificación, la mayoría de los marcadores tipo I pueden ser identificados durante el análisis de genes conocidos.

Los marcadores tipo I son importantes en estudios de poblaciones y tienen gran utilidad en estudios de genomas comparativos, evolución de genomas e identificación de genes. Entre los marcadores tipo II podemos mencionar: AFLPs, RAPDs y microsatélites los mismos que son útiles en acuicultura genética para estudios de diversidad genética y más recientemente como marcadores genéticos ligados a QTL.

1.5.1.1. FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN POLIMÓRFICOS (RFLP)

Técnica desarrollada a finales de los 70, permiten estudiar el genoma con una mayor cobertura al incluir secuencias codificadoras y no codificadoras del ADN (exones e intrones), lo cual permite detectar con mayor eficiencia cambios genéticos puntuales. Las principales ventajas de los RFLPs radican en la presencia de un número ilimitado de ellos, no son afectados por el medio ambiente, y pueden ser evaluados en cualquier etapa de desarrollo.

La técnica está basada en la digestión del ADN total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Esta restricción produce cantidades equimolares de fragmentos para una molécula de ADN dada. Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Southern Blot). Esta membrana es hibridada con una sonda (radioactiva o no). El producto de la hibridación es visualizado por medio de una autoradiografía de rayos-X, de acuerdo al peso molecular de la banda.

Dentro de las principales desventajas de los RFLP están la clonación de las sondas, detección de RFLP en las membranas y el uso de radioactividad; tareas consideradas laboriosas, lentas y caras.

1.5.1.2. POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNP)

Los SNP (Single Nucleotide Polimorphism) son polimorfismos producidos por un cambio nucleotídico único, cuya frecuencia oscila entre 1 de cada 600 y de 1 de cada 1000 pb. La importancia de estos marcadores se ha visto magnificada a partir del momento en que la descripción de los microsatélites, cuya densidad es mucho menor, ha resultado ser insuficiente cuando se trata de balizar una parte concreta del genoma con un número alto de marcadores.

La ventaja de los SNP es su facilidad de detección al ser loci dialélicos, por lo que el uso de microarrays o microchips de ADN se está generalizando, aumentando drásticamente la velocidad de detección y el volumen de análisis posible.

1.5.1.3. ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD)

Es una de las técnicas más versátiles desde su desarrollo en el año 1990 (Williams *et al.*, 1990). Los marcadores de ADN polimórficos amplificados aleatoriamente o RAPD (del inglés Randomly Amplified Polimorphic DNA) representan productos amplificados por PCR utilizando ADN genómico y primers aleatorios. Se usa una colección de decanucleótidos para amplificar áreas específicas distribuidas al azar por el genoma. Su pequeñez y la baja temperatura de alineamiento (36 °C), aseguran que se una a infinidad de secuencias en el genoma para conseguir amplificar muchos

fragmentos del ADN. Como los primers son aleatorios no se conocen los tamaños específicos de los segmentos amplificados.

Las principales ventajas de esta técnica son la rapidez en la obtención de resultados, el costo, el no uso de radioactividad, menor inversión en equipos y la cantidad reducida de ADN requerida. Sin embargo como desventaja aparece la inconsistencia de los datos. Diferentes condiciones de laboratorios con pequeñas alteraciones en los parámetros de amplificación, pueden dar origen a resultados diferentes. Esta desventaja se puede reducir logrando un alto grado de estandarización de las condiciones de reacción y de amplificación, usando un control interno para asegurar la reproducibilidad de los productos de la amplificación, además del registro de las bandas nítidas y consistentes.

Esta técnica ha sido utilizada en camarones para la detección de marcadores ligados a resistencia en IHNV en *Litopenaeus stylirostris* (Hizer *et al.*, 2002). García *et al.*, (1995) la empleó en *P. monodon* y en *P. vannamei* en 1996.

1.5.1.4. POLIMORFISMO DE CONFORMACIONES MONOCATENARIAS (SSCP)

Técnica descrita en 1989 para la detección de ADN de cadena simple. Esta técnica se basa en el análisis del polimorfismo a través de las diferencias conformacionales de fragmentos del DNA monocatenario, debido a mutaciones nucleotídicas. Para

detectarlos se procede a la amplificación del fragmento diana y su posterior desnaturalización.

Las distintas conformaciones son detectables con un cambio de movilidad en geles de poliacrilamida no desnaturalizante. Es especialmente útil cuando las reacciones de PCR producen bandas de ADN de gran tamaño o bien bandas de tamaño muy próximo. Puede llegar a distinguir cambios de pocos nucleótidos con una secuencia de más de 1 Kpb.

1.5.1.5. SITIOS ETIQUETADOS POR LA EXPRESIÓN (EST)

Técnica descrita en 1991. Su particularidad proviene del hecho que los oligonucleótidos se han deducido a partir de cADN parcial o completamente secuenciado. Curiosamente el polimorfismo sólo se observa claramente cuando los fragmentos amplificados se cortan con enzimas de restricción lo que hace que el método sea costoso en tiempo y dinero. Los ESTs pueden ser usados para analizar función, expresión y estructura del gen, como también pueden ser usados para comprender la composición cromosomal, organización y estructura del genoma.

1.5.1.6. FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS DE ADN AMPLIFICADOS (AFLP)

Técnica basada en el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) desarrollada por Vos *et al.*, (1995). En esta técnica se combinan los principios de los RFLP y PCR, donde una submuestra de fragmentos producidos por la restricción del ADN bajo estudio son amplificados selectivamente en cascada.

Los AFLPs usan como partidores oligonucleótidos complementarios a las secuencias que han sido ligadas a cada extremo del ADN digerido. El polimorfismo es detectado por la presencia o ausencia de fragmentos y son normalmente, al igual que RAPD, de herencia dominante. Con esta técnica se puede detectar una variación considerable del genoma, lo cual se refleja en el número de productos amplificados con una sola combinación de partidores.

La eficiencia en detectar polimorfismo puede ser varias veces mayor que la obtenida con RAPD y RFLP. Esta metodología ha sido usada en diversas especies para mapeo genético, tales como: *P. vannamei* (Erazo, 2002); *Ictalurus punctatus* (Liu *et al.*, 2003) entre otras.

El procedimiento comienza con la digestión del ADN genómico de los individuos con enzimas de restricción que reconocen 4 y 6 bases de reconocimiento, lo cual genera fragmentos de tamaño preferentemente pequeño. Luego se ligan adaptadores de

secuencia conocida a cada extremo y para el proceso de amplificación se usan partidores complementarios a estos adaptadores, manteniendo el sitio de restricción más un cierto número de nucleótidos (3 generalmente) que deben agregarse al extremo 3'.

Finalmente, el proceso implica dos alternativas de detección de las bandas, la primera es la marcación radioactiva de los productos amplificados en la última etapa de amplificación, su separación en geles de poliacrilamida, secado del gel y su visualización en autoradiografías. La segunda alternativa usa la tinción directa del gel con nitrato de plata.

1.6. MICROSATÉLITES

Los Microsatélites alternativamente conocidos como Simple Sequence Repeats (SSRs), Short Tandem Repeats (STRs) o Simple Sequence Length Polimorphism (SSLPs), son regiones cortas de ADN con números variables de repeticiones en tándem, flanqueadas por una secuencia única (Figura 1).

Se los encuentra presentes tanto en regiones codificantes como en regiones no codificantes y son usualmente caracterizados por un alto grado de polimorfismo. El origen de tal polimorfismo es aún tema de debate, aunque parece ser debido a eventos de "slippage" durante la replicación del ADN (Schlotterer y Tautz, 1992).

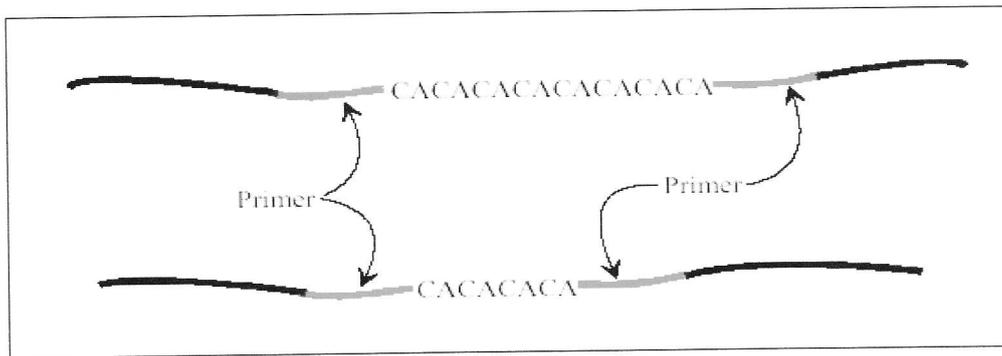


Figura 1. Esquema de un microsatélite (Tomado de Aspectos de Genética Molecular)

Mediante los microsatélites se puede medir la diversidad entre genotipos amplificando mediante PCR la región del ADN genómico que contiene estas secuencias repetidas. Los Microsatélites son buenos marcadores genéticos porque cada uno tiene diversos "alelos". Un alelo es definido por el número de repeticiones que está en la misma localización. Con muchos alelos, la mayoría de los individuos son heterocigotos.

Con la reacción de PCR, que utiliza las secuencias únicas cualquier lado de las secuencias de la repetición como sitios obligatorios superelegantes, el ADN del microsatélite puede ser amplificada específicamente.

Los alelos, los portadores individuales en los loci de un microsatélite del detalle, se pueden entonces determinar teniendo acceso al tamaño del fragmento amplificado con electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida y visualizados radioactivamente o por tinción con nitrato de plata. En camarones esta técnica se

utilizó para la identificación individual y correlación con el crecimiento en *P. vannamei* (Zhinaula, 2002).

1.6.1. AISLAMIENTO DE MICROSATÉLITES

Para aislar microsatélites primero se digiere el ADN con enzimas de restricción y se obtienen fragmentos pequeños, luego cada uno de estos fragmentos es incorporado a un vector, que puede ser un plásmido o un phago, estos vectores son introducidos en bacterias que son sembradas en medios especiales.

Con una sonda se identifican las colonias que llevan el vector que ha incorporado el fragmento correspondiente al microsatélite. Se realiza el reaislamiento del vector, y se secuencian el fragmento incorporado.

A partir de estos datos se elaboran primers con la secuencia flanqueante del microsatélite. Estos primers sirven para amplificar un fragmento por PCR y se estudia la variabilidad que presenta el microsatélite en los diferentes individuos.

En el caso de camarones penaeidos, marcadores microsatélites han sido aislados de *P. vannamei* (García *et al.*, 1996), *P. setiferus* (Ball *et al.*, 1998) y *Penaeus monodon* (Xu *et al.*, 1999).

1.6.2. UTILIDADES DE LOS MICROSATÉLITES

El uso de microsatélites ha ido aumentando mediante la producción de bibliotecas de partidores y la secuenciación automática fluorescente que permiten el diseño de los partidores que rodean los microsatélites. Mediante los microsatélites se puede medir la diversidad entre genotipos, amplificando mediante PCR la región del ADN genómico que contiene estas secuencias repetidas.

Los microsatélites son muy atractivos para los genetistas pues combinan varias ventajas como: codominancia (se puede diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), multiallelismo y alta heterocigosidad (Borrell *et al.*, 2003; Liu y Cordes., 2004).

El alto nivel de polimorfismo que detecta permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados. Además de ser altamente polimórficos (Figura 2.), los microsatélites usan cantidades mínimas de ADN, lo que los hace marcadores ideales para diferentes estudios genéticos.

Debido a su gran variabilidad, éstos pueden emplearse para la discriminación de poblaciones donde otros métodos han fallado para detectar cualquier diferencia genética. Además de monitorear la variabilidad genética, (Wolfus *et al.*, 1997; Bierne *et al.*, 2000), los microsatélites permiten determinar el pedigrí (Herbinger *et al.*, 1995).

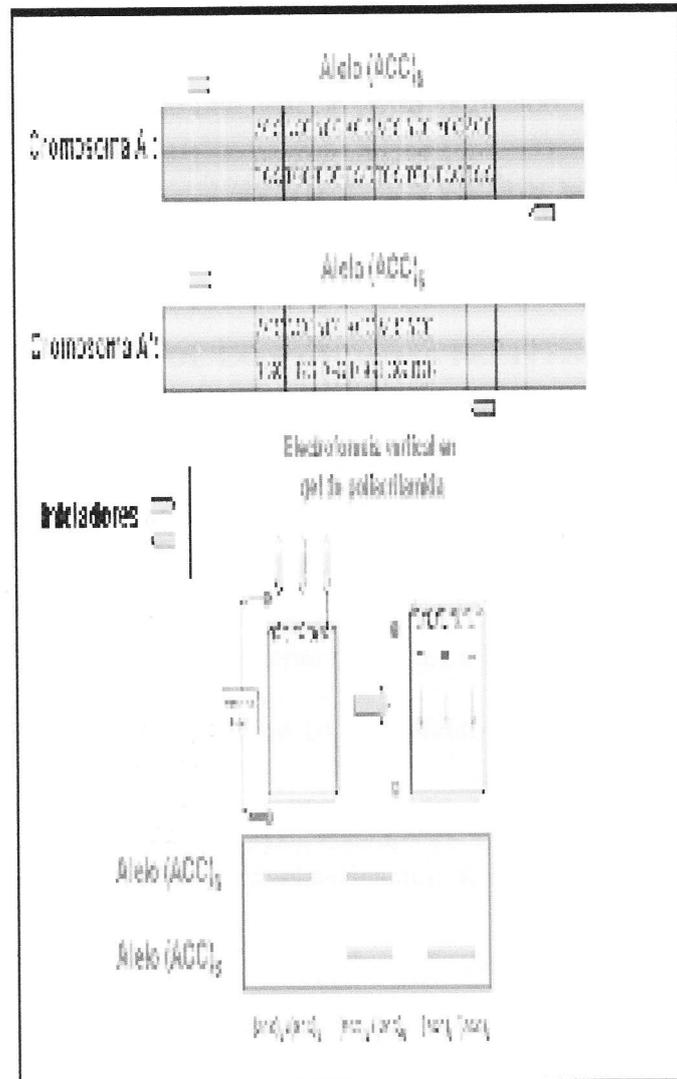


Figura 2. Diagrama que muestra el polimorfismo de los microsatélites debido a las diferencias en su longitud. En un individuo diploide, el cromosoma A contiene el alelo (ACC)8, mientras que el cromosoma A' en el locus homólogo presenta el alelo (ACC)6. Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando iniciadores diseñados en las regiones flanqueantes, los alelos son amplificados, para luego ser separados mediante una corrida electroforética. El diagrama muestra el patrón de bandas que deben determinar tanto los homocigotos como el heterocigoto para los mencionados alelos.

Una de las desventajas de los microsatélites es el tiempo y costo involucrado en el proceso del diseño de cada partidador, sin embargo existe la posibilidad de usar los mismos partidadores en más de una especie. Esto es debido, a que existe un grado de conservación de los microsatélites entre genomas de especies tan distantes.

1.6.3. CLASIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES

Chambers y MacAvoy (2000) proponen que los términos puro (o perfecto), compuesto y complejo se utilice para especificar que uno, dos o más tipos de motivos, respectivamente, se encuentran presentes a lo largo de un locus microsatélite dado, y que el término interrumpido (o imperfecto) como un descriptor jerárquico adicional que implica una o más unidades no repetitivas en el interior de los microsatélites. La Tabla I muestra la clasificación de los microsatélites.

Tabla I. Clasificación de los microsatélites de acuerdo a las diferencias en motivos

Microsatélite	Ejemplo
SSR Puro	(ACC)9
SSR Interrumpido puro	(ACC)6 (TG) (ACC)7
SSR Compuesto	(ACC)5 (TTG)9
SSR Interrumpido compuesto	(ACC)8 (TG) (ACC)5 (GA) (TTA)6
SSR Complejo	(ACC)8 (TG) (GA)1 2 ((TTA)5 (GC) (TTA) 4) 3

Fuente: Chambers y MacAvoy (2000)

1.6.4. LIMITACIONES DE LOS MICROSATÉLITES

La única limitación significativa de los microsatélites puede ser la inversión inicial de recursos económicos y la experiencia técnica requerida para el clonamiento y secuenciamiento de los loci SSR. Por otro lado, limitaciones con menor frecuencia o efecto, se darían en el caso que mutaciones, ocurridas en el sitio de apareamiento de los iniciadores, tendrían como resultado alelos nulos.

Otra limitación es la presencia de “bandas tartamudas”. Estas se encuentran frecuentemente asociadas con la amplificación de ADN repetitivo como es el caso los microsatélites. Las “bandas tartamudas” son productos de la amplificación por PCR que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original. La ocurrencia de estos artefactos dificulta la lectura de los geles, e inclusive, repetidamente son confundidos como alelos, complicando el análisis genotípico. Sin embargo estas consideraciones no han desalentado a muchos investigadores quienes han convertido a los microsatélites en una herramienta muy popular (Chambers y MacAvoy 2000).

Una vez que las secuencias de los iniciadores son diseñadas y publicadas, el análisis de los loci microsatélites será práctico para cualquier laboratorio capaz de realizar las técnicas de PCR y electroforesis. El desarrollo inicial de los microsatélites puede ser simplificado utilizando técnicas más avanzadas como el uso de librerías enriquecidas para uno o más motivos.

El ahorro en tiempo y recursos puede ser mejorado desarrollando el llamado “PCR multiplex”, el cual permite la amplificación y la recolección de datos simultáneos de múltiples loci SSR con una sola muestra de ADN en una simple reacción de PCR en una sola línea del gel de electroforesis (Brown *et al.*, 1996).

1.7. FACTORES DE ERRORES DE LOS MICROSATÉLITES

Algunos factores pueden disminuir el poder y la sensibilidad de los microsatélites como marcadores de elección o pueden ser fuente de error que disminuya la utilidad en los estudios genéticos (Lehmann *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 2000). Los dos factores principales son los alelos nulos y la homoplasia.

1.7.1. ALELOS NULOS

Se habla de alelos nulos cuando un alelo no puede ser amplificado debido a una mutación en el punto de hibridación en el cebador. Ese alelo no amplifica y el individuo es catalogado como homocigoto. La existencia de alelos nulos es especialmente difícil de detectar cuando su frecuencia es baja.

En caso de identificación de paternidades, cabe sospechar la presencia de alelos nulos cuando todos los marcadores apuntan a un progenitor homocigoto para el marcador excluyente, y que el descendiente sea también homocigoto para ese marcador, con el

alelo maternal. Un alelo nulo no puede conllevar a excluir a estos animales como posibles progenitores en un análisis de paternidad y, además, desviar las estimaciones de las frecuencias alélicas en poblaciones.

Para solucionar el problema de los alelos nulos se pueden diseñar cebadores alternativos fuera del punto de mutación y volver a analizar a los individuos clasificados como homocigotos, aunque la forma más usual de verificarlos es estudiar la descendencia de un cruzamiento entre el genotipo de un supuesto alelo nulo (genotipo incógnito) y otro que sea heterocigoto, si en la progenie se obtiene una mezcla de porcentajes iguales de dos heterocigotos, el genotipo incógnito era efectivamente homocigoto, pero si además de estos heterocigotos (ahora reducido a un 25% cada uno) se encuentran otros dos grupos de segregantes, cada uno también con un 25% de “homocigotos” (nulos verdaderos), entonces se confirmaría la presencia del alelo nulo en el progenitor testado.

1.7.2. HOMOPLASIA

Homoplasia es el hecho de que dos alelos tengan el mismo tamaño pero no debido a que sean idénticos, sino a que los tomamos como idénticos por tener el mismo tamaño, pero existen diferencias en su estructura, inserciones de una parte y deleciones de otra, cambios de bases o variaciones en la región flanqueante (Blankenship *et al.*, 2002). Este es un tipo de polimorfismo que se puede detectar

únicamente por secuenciación, y nos puede pasar inadvertido en caso de analizar a nuestros animales mediante amplificación por PCR y electroforesis para asignar tamaños.

La homoplasia en los test de paternidad y parentesco nos puede hacer atribuir una relación cuando no la hay o viceversa. También puede ser fuente de error en estudios poblacionales o de evolución, porque la tasa de mutación de los microsatélites está relacionada en forma compleja con el tamaño y composición del alelo, y, por ejemplo, los alelos interrumpidos o compuestos conllevan con más frecuencia a casos de homoplasia.

1.8. GRUPOS DE LIGAMIENTOS

Un grupo de ligamiento se define biológicamente como un grupo de genes con sus loci localizados en el mismo cromosoma. Un grupo de ligamiento estadísticamente se define como un grupo de loci agrupados de acuerdo a un criterio estadístico.

El grupo de ligamiento estadístico puede diferir del grupo de ligamiento biológico, ya que genes del mismo cromosoma pueden agruparse en diferentes grupos de ligamiento basados en diferentes criterios estadísticos porque puede no observarse genes de un segmento grande de cromosoma.

2. DETERMINACIÓN DE UN MAPA GENÉTICO DE LIGAMIENTO

Las actividades correspondientes al desarrollo del presente trabajo se llevaron a cabo en el laboratorio de genética molecular bajo la dirección y supervisión del M.Sc. Franklin Pérez, en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas “M.Sc. Edgar Arellano M.” (CENAIM) ubicado en San Pedro - Manglaralto, provincia del Guayas.

Este Centro cuenta con diferentes áreas en la que se llevan a cabo diversas actividades relacionadas con la investigación científica, así como actividades propias de la acuicultura. Además, brinda a los estudiantes la oportunidad de realizar pasantías y tesis, lo cual contribuye a su formación académica y profesional.

Los materiales y equipos para el desarrollo de la presente tesis estuvieron disponibles en CENAIM en los laboratorios de: genética molecular, biología molecular, inmunología y sala de cómputo. El material biológico se encontró en el área de larvicultura y en las piscinas de la estación experimental “Palmar”.

2.1. REFERENCIA FAMILIAR

El mapa de ligamiento fue construido con los genotipos de 88 individuos correspondiente a la progenie de dos parentales de *P. vannamei*, provenientes del laboratorio de larvicultura con esquema de domesticación y generados por inseminación artificial.

Los nauplios obtenidos de los respectivos cruces fueron cultivados en las instalaciones del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), en tanques de 1 tonelada métrica, con aireación permanente. Cuando alcanzaron un peso promedio de 2.09 g, fueron transferidos a la Estación Experimental ubicada en Palmar donde fueron mantenidos hasta el momento de la cosecha. Luego fueron trasladados hasta el laboratorio para su posterior análisis.

2.2. MANEJO DEL EXPERIMENTO

Para la elaboración del mapa genético, fueron necesarios dos parentales genéticamente diferentes y su progenie obtenida a partir del cruzamiento controlado entre los dos parentales. En nuestro caso contamos con dos parentales de *P. vannamei* y 88 individuos de su progenie.

El siguiente paso fue la extracción del ADN de cada individuo a partir de las branquias de los camarones y luego la purificación del material genético. Una vez extraído y purificado el ADN, se evaluaron los marcadores moleculares con los cuales se construyó el mapa.

Un mapa genético bien surtido de marcadores moleculares es una herramienta útil para identificar genes responsables de caracteres de interés, para su construcción se utilizó la técnica microsatélite, con la que se obtuvo diferencia entre individuos, además de ser repetible.

Con cada marcador se marcaron los genotipos parentales y los de la generación. Se observó la frecuencia con que aparecieron en la progenie y en uno u otro parental y de ese modo se pudo estimar el modelo de segregación Mendeliana.

Las muestras de ADN de los parentales fueron corridos paralelamente juntos con la progenie para cada uno de los loci y fueron usados solamente para determinar el modelo de segregación y los genotipos así como para la detección de alelos nulos.

Los programas informáticos utilizados en el tratamiento de los datos fueron Microsoft Office Excel, Microsoft Office Access, Adobe Photoshop 7.0, Gene Profiler 4.05 Scanalytics y JoinMap 3.0.

2.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Inicialmente se realizó la extracción de ADN de 100 individuos con un peso promedio de 0.12 g, con la que se evaluó la calidad de ADN. Una segunda extracción se usó para determinar segregación y evaluar polimorfismos de nuevos primers, ensayando un número máximo de marcadores. Posteriormente, debido al pequeño volumen de muestra de ADN disponible de cada individuo se realizó una tercera extracción de ADN, la misma que se efectuó cuando los camarones alcanzaron un peso y longitud promedio de 15.8 g, y 13.2 cm. respectivamente (Anexo 1), y fue utilizada para confirmar la segregación, genotipeando todos los loci. El mapa obtenido en este estudio está basado en la tercera extracción.

Las muestras de tejido de los parentales fueron extraídas del músculo de los camarones (preservados en etanol), mientras que las correspondientes a la progenie fueron extirpadas de las branquias de los individuos (en estado fresco).

Para su procesamiento se las colocó en tubos eppendorf conteniendo 4 μ L de proteinasa K [(Promega) (20 mg/mL)] y 500 μ L de tampón CTAB y el ADN fue aislado. Luego de agitarlas brevemente en el vortex, las muestras fueron incubadas en baño María a 66 °C durante toda la noche (8 horas). El ADN fue extraído una vez con fenol-cloroformo y una vez con fenol. El ADN fue precipitado con isopropanol helado, luego se guardaron las muestras a -20 °C durante dos horas, luego se lavó el ADN con etanol helado al 70 %. (Para extraer, precipitar y lavar el ADN, las

muestras fueron centrifugadas a 14 000 rpm durante 5 minutos, en centrifuga refrigerada), secado al ambiente y resuspendido en buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). Se empleó el método CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), descrito por Shahjahan *et al.*, (1995) con algunas modificaciones (Anexo 2).

2.2.2. PURIFICACIÓN CON RESINA

Para trabajar con ADN de óptima calidad, se procedió a purificar el ADN (Anexo3), utilizando el protocolo de purificación con resina descrito por Promega (Wizard® PCR Preps DNA Purification System. Cat. # A7170).

A los 100 µL de muestras de ADN se les agregó 1 mL de resina, se las agitó en el vortex por un tiempo corto, se tomó la muestra con una jeringuilla de insulina y se la colocó en filtro. Para lavar el ADN se agregó 2 mL de etanol al 80 % (o isopropanol) y se centrifugaron por 2 min. a 10 000 rpm (tubo sin tapa y filtro), luego fueron secados al ambiente por 5 min. Se colocaron los filtros en tubos nuevos agregándose 50 µL de agua milliQ (esterilizada a 68 °C desde el baño María).

Las muestras fueron incubadas durante dos minutos a temperatura ambiente y finalmente fueron centrifugadas a 12 000 rpm durante 1 minuto para que se desprendiera el ADN.

2.2.3. CUANTIFICACIÓN DE ADN

La concentración de ADN fue determinada por espectrofotometría con un equipo (Biophotometer Gene Quant, PHARMACIA) utilizando una dilución 1/20 para la lectura valorando un ratio de 170 a 185 nm.

Inicialmente la concentración del ADN por muestra fue estandarizada en 100 ng/ μ L, en las posteriores extracciones, el ADN de cada muestra se estandarizó en 80 ng/ μ L y se transfirió a una microplaca (ver anexo 1), permaneciendo almacenado el producto hasta el momento de usarlas para las reacciones de PCR.

El remanente del producto extraído fue conservado en tampón 1X y almacenado en tubos eppendorf para centrifuga a -20 °C.

2.2.4. EVALUACIÓN DE MARCADORES

Un total de 56 primers de microsatélites polimórficos desarrollados en CENAIM fueron genotipados en el set de mapeo. Adicionalmente 44 primers microsatélites basados en secuencias EST desarrollados por Meehan *et al.*, (2003), más un set de 22 intrones ricos en secuencias de microsatélites, resultados de parte de una tesis de maestría (Ortiz, 2004) y que presentaron marcadores polimórficos fueron genotipados en el set completo (Tabla III). Todos los juegos de primers

correspondientes a EST-SSRs fueron fabricados en Estados Unidos (Texas Midland Reagents, Tx.). Adicionalmente 62 juegos de primers también dirigidos a SSR-ESTs y 173 juegos correspondientes a secuencias intrónicas putativas, producto de la comparación con el genomio de *D. melanogaster*, fueron elaborados en Taiwán (Bioneer Corporation Inc).

2.2.5. GENOTIPEADO

Todos los marcadores fueron amplificados bajo condiciones estándar del laboratorio siguiendo el protocolo de PCR tipo Towch Down. (Don *et al.*, 1991). Los productos amplificados se separaron en geles de poliacrilamida de diferentes densidades de acuerdo al tamaño del primer empleado (ver Tabla II).

Cada mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) 494.1 μL de H_2O , 60.8 μL de tampón de PCR 10 X buffer, 24.3 μL de MgCl_2 , 12.2 μL de cada dNTPs, 6.1 μL de partidores (directo y reverso) y 4.9 μL de Taq polimerasa en 608 μL de volumen final. (Tabla III).

Se usaron dos termocicladores: PTC 200 MJ Research, Techne Genius y Ericom Delta Cycle I. con el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos, 12 ciclos de amplificación partiendo de 55 °C por 30 segundos, bajando 1 °C por ciclo hasta alcanzar los 43 °C para el annealing, elongación de las

Tabla II. Lista de primers utilizados para el set de mapeo

#	# de Primer	Primers CENAIM		Marcador en pares de bases
		Tamaño Esperado.	% gel	
1	177	100 ±	6 %	25 bp
2	197	250 ±	6 %	25 bp
3	210	400 ±	4 %	100 bp
4	241	175 ±	6 %	25 bp
5	327	200 ±	6 %	25 bp
6	339	175 ±	6 %	25 bp
7	347	300 ±	4 %	100+25 bp
8	351	225 ±	6 %	25 bp
9	354	200 ±	6 %	25 bp
10	355	275 ±	6 %	25 bp
11	362	200 ±	6 %	25 bp
12	367	300 ±	4 %	100+25 bp
13	379	250 ±	6 %	25 bp
14	383	250 ±	6 %	25 bp
15	384	225 ±	6 %	25 bp
16	398	175 ±	6 %	25 bp
17	402	175 ±	6 %	25 bp
18	406	300 ±	4 %	100+25 bp
19	412	225 ±	6 %	25 bp
20	416	275 ±	6 %	25 bp
21	418	300 ±	4 %	100+25 bp
22	430	200 ±	6 %	25 bp
23	437	125 ±	8 %	25 bp
24	439	300 ±	4 %	100+25 bp
25	444	275 ±	6 %	25 bp
26	459	125 ±	8 %	25 bp
27	494	300 ±	4 %	100+25 bp
28	496	400 ±	4 %	100 bp
29	523	400 ±	4 %	100 bp
30	557	275 ±	4 %	25 bp
31	600	300 ±	4 %	100+25 bp
32	604	175 ±	8 %	25 bp

Tabla II. (Continuación)

#	# de Primer	Intrones		
		Tamaño Esperado.	% gel	Marcador en pares de bases
33	639	300 ±	4 %	100+25 bp
34	644	275 ±	8 %	25 bp
35	652	450 ±	6 %	100 bp
36	656	300 ±	6 %	100+25 bp
37	657	125 ±	6 %	25 bp
38	658	275 ±	6 %	100+25 bp
39	668	325 ±	6 %	100 bp
40	677	325 ±	6 %	25 bp
41	679	375 ±	6 %	100 bp
42	690	250 ±	6 %	25 bp
43	701	225 ±	6 %	25 bp
44	778	325 ±	6 %	25 bp
45	717	450 ±	4 %	100 bp
46	742	350 ±	6 %	100 bp
47	755	325 ±	6 %	100 bp
48	763	450 ±	6 %	100 bp
49	772	300 ±	4 %	25 bp
50	780	475 ±	4 %	100 bp
51	781	400 ±	4 %	100 bp
52	782	350 ±	4 %	100 bp
53	784	525 ±	6 %	100 bp
54	791	425 ±	4 %	100 bp

#	# de Primer	Primers Alcívar		
		Tamaño Esperado.	% gel	Marcador en pares de bases
55	794	150 ±	6 %	25 bp
56	797	175 ±	6 %	25 bp
57	802	250 ±	6 %	25 bp
58	803	200 ±	6 %	25 bp
59	805	175 ±	4 %	25 bp
60	808	150 ±	4 %	25 bp
61	813	325 ±	6 %	100 bp

Tabla II. (Continuación)

#	# de Primer	Primers Alcivar		Marcador en pares de bases
		Tamaño Esperado.	% gel	
62	815	200 ±	4 %	25 bp
63	825	200 ±	4 %	25 bp
64	832	150 ±	6 %	25 bp
65	834	150 ±	6 %	25 bp
66	836	150 ±	6 %	25 bp
67	837	200 ±	6 %	25 bp
68	840	325 ±	6 %	100 bp
69	841	125 ±	6 %	25 bp
70	842	200 ±	6 %	25 bp
71	843	125 ±	8 %	25 bp
72	847	300 ±	4 %	100+25 bp
73	849	250 ±	6 %	25 bp
74	850	200 ±	6 %	25 bp
75	852	200 ±	6 %	25 bp
76	862	200 ±	6 %	25 bp
77	863	250 ±	6 %	25 bp
78	866	150 ±	6 %	25 bp
79	867	225 ±	6 %	25 bp
80	869	125 ±	6 %	25 bp
81	871	150 ±	6 %	25 bp
82	875	225 ±	6 %	25 bp
83	876	175 ±	6 %	25 bp
84	878	225 ±	6 %	25 bp
85	884	150 ±	6 %	25 bp
86	885	150 ±	6 %	25 bp
87	898	325 ±	6 %	25 bp
89	900	325 ±	6 %	25 bp
90	913	325 ±	6 %	25 bp
91	917	175 ±	6 %	25 bp
92	921	275 ±	6 %	25 bp
93	931	275 ±	6 %	25 bp
94	945	325 ±	6 %	25 bp
95	1035	325 ±	6 %	25 bp
96	1087	175 ±	6 %	25 bp

cadena por 1 minuto a 72 °C y denaturación a 92 °C. Las muestras amplificadas fueron mantenidas en refrigeración antes de proceder a su separación y visualización.

Tabla III. Concentraciones y cantidades de los reactivos utilizados para PCR

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen por muestra
H ₂ O			6,18 µl
PCR –Tampón	10 X	1 X	0,80 µl
Mg Cl ₂	25 µM	1,0 a 2,5 µM	Variable
dNTPs	10 µM	0,25 µM	0,16 µl
Iniciador – F	40 µM	0,4 µM	0,08 µl
Iniciador – R	40 µM	0,4 µM	0,08 µl
TAQ	5 U/µl	1 U/ µl	0,06 µl
Muestra			1,00 µl
Total			9 µl

(Protocolo para amplificación de microsatélites optimizados en CENAIM)

2.2.6. ELECTROFORESIS

La visualización de los segmentos se la realizó por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida no denaturante,) al 4, 6 y 8 %, según lo descrito por Sambrock *et al.* (1989). Los geles fueron fundidos en placas de vidrio, con espaciadores de 1 mm y polimerizados por 1 hora. Se utilizó: acrilamida y bisacrilamida en una proporción

29:1; TAE 1 X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA); Persulfato de amonio (10 %) y TEMED (Anexo 5). El volumen total de cada muestra amplificada se mezcló con 1,2 μ L de tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0.25 %, xilencianol 0.25 % y 30 % de glicerol). De esta mezcla se tomó 1,5 μ L y se depositó en los geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

Un total de 96 muestras fueron cargadas en cada gel, correspondiente a los parentales por duplicado (inicio y final) y a 92 hijos (figura 3). Se utilizó como estándares pesos moleculares “100, 25 y 100+25 bp (pares de bases) DNA ladder de Promega®.



Figura 3.- Equipos de electroforesis vertical con geles de poliacrilamida cargadas con muestras correspondientes a los parentales y la progenie.

Para la corrida de los geles se utilizaron dos equipos de secuenciación manual, modelo S2 de Life Technologies Gibco BRL y modelo S3S Owel con un tamaño de gel de 33 x 41,3 cm y 35 x 45 cm respectivamente. Además se utilizaron dos cámaras

de electroforesis de corrido vertical BIO RAD de Sequencing-Gen® GT. Sequencing Cell. Las bandejas inferiores se llenaron con tampón TBE 1 X, mientras que las superiores se llenaron con TBE 0,5 X. La corrida electroforética se realizó a 400 voltios, verificándose una corriente inicial de 600 voltios durante 30 minutos.

2.2.7. TINCIÓN DE PLATA

Inicialmente se utilizaron geles delgados (0,4mm), empleando la metodología de Beidler *et al.*, (1982) para la tinción (Tabla IV). Después de teñir los geles, se mantuvieron a temperatura ambiente por un lapso de 30 minutos. Luego fueron fotografiados para su posterior análisis.

Tabla IV. Protocolo para tinción de geles delgados 0,4 mm (Beidler *et al.*, 1982)

Paso	Reactivos		Duración
Fijación (4 L de solución)	10 % Etanol 1 % Ácido Acético dd H ₂ O	400 mL 40 mL	10 Minutos
Enjuague	H ₂ O desionizada	4 L	1 Minuto
Enjuague	1,5 % Acido Nítrico	86 mL	3 Minutos
Ejuague	H ₂ O desionizada	4 L	1 Minuto
Impregnación	(0,2 % AgNO ₃)	9 g /4 L	20 Minutos
Enjuague	H ₂ 0 desionizada	4 L	30 Segundos
Revelado	30 g/L CO ₃ Na ₂ 0,54 mL / l formaldehído 37 % (810 µL/1,5 L)		4-7 Minutos

Fuente: Beidler *et al.*, 1982

Luego de aproximadamente 8 horas de migración de las moléculas en los geles, se procedió a la tinción de las bandas de ADN con nitrato de plata, de acuerdo al protocolo modificado de Dinesh *et al.*, 1995 (Tabla V), el que consistió en fijar el gel en alcohol etílico y ácido acético, luego se impregnó con solución de nitrato de plata, después se realizó un enjuague con agua desionizada, posteriormente se reveló con hidróxido de sodio y formaldehído. La parada de la tinción se la realizó empleando carbonato de sodio.

Cada una de las soluciones de tinciones se preparó en un volumen de 4 L empleando químicos de grado analítico. Estas soluciones sirvieron para teñir 16 geles en promedio. La solución de fijación fue usada al menos tres veces mientras que las soluciones de revelado y parada fueron utilizadas al menos 10 veces.

Tabla V.- Reactivos utilizados para la tinción de plata en geles de poliacrilamida

PASO	SOLUCIÓN	TIEMPO
Fijación	10 % Etanol + 5 % Ácido Acético	15 minutos
Impregnación	0.011 M de Nitrato de Plata	25 minutos
Lavado	Agua desionizada	1 minuto
Revelado	0.75 M de NaOH + 0.085 M de formaldehído	7 minutos
Finalización	0.07 M de Carbonato de Sodio	5 minutos

Fuente: Dinesh *et al.* 1995

La solución de nitrato de plata fue usada al menos 8 veces sin pérdida de sensibilidad.

Las soluciones fueron almacenadas hasta su posterior uso, en botellas ámbar y mantenidas a temperatura ambiente.

2.2.8. DOCUMENTACIÓN

Para fines de documentación y análisis, los geles fueron fotografiados sobre una caja de luz blanca, utilizando una cámara digital Olympus Camedia C-5000 ZOM de alto rendimiento y almacenados en un computador IBM en un archivo Adobe Photoshop 7.0. Los archivos fueron modificados a formato Tiff monoescala para su transferencia al software de análisis Gene Profiler 4.05 Scanalytics.

2.3. ANÁLISIS GENÉTICOS

Con el propósito de evaluar los modelos de segregación mendeliana en los 120 marcadores se llevaron a cabo una serie de chequeos preliminares. En el programa computarizado Gene Profiler 4.05 Scanalytics, se realizaron análisis de los geles de poliacrilamida para determinar el tamaño de bandas de los genotipos observados.

Los datos se importaron a una hoja de Excel, reemplazando los valores por letras para la codificación, empleando el código descrito por Van Ooijen, J. W. & R.E. Voorrips, 2001. Para comprobar la concordancia de una segregación mendeliana se realizó una prueba de Chi cuadrado para cada marcador, empleando la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \frac{\sum(O-E)^2}{E}$$

Donde χ^2 (Chi cuadrado), O (datos observados) y E (datos esperados)

Información de marcadores segregando en forma mendeliana fueron importados a una base de datos en Microsoft Office Access, usando macros con Microsoft Office Excel, para ser ingresados al programa computarizado JoinMap y realizar la construcción del mapa.

2.3.1. ANÁLISIS DE LOS GELES

Con el software para análisis de imagen, Gene Profiler 4.05 Scanalytics, se determinó el perfil molecular de bandas de ADN para cada individuo (parentales y progenie), tal como se muestra en la Figura 4.

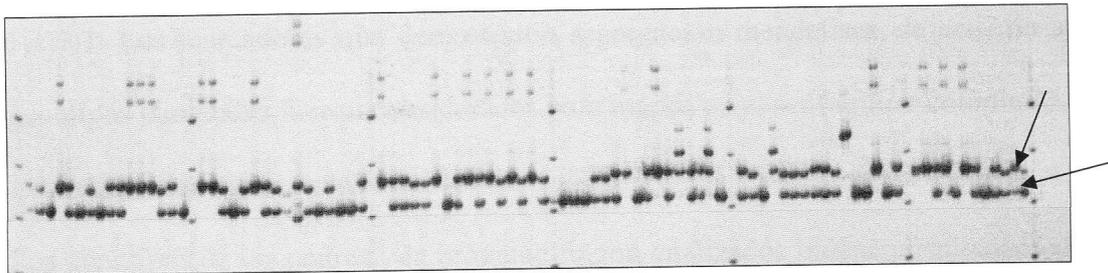


Figura 4. Perfil molecular de bandas de un microsatélite

Todas las muestras se corrieron junto a una secuencia conocida para determinar el tamaño de las bandas. El criterio usado para determinar el tamaño de las mismas fue localizar las bandas bien definidas, aún cuando estas presentaron menor intensidad.

En algunas muestras, un solo set de bandas representó un solo alelo o un estado homocigoto. Genotipos homocigotos (aparentemente alelos nulos) fueron

amplificados y analizados otra vez para verificar la ausencia de un alelo amplificable. Los geles fueron examinados visualmente antes de realizar el análisis computarizado.

Cuando los genotipos no presentaron un perfil definido, los productos de PCR se cargaron nuevamente en el gel y se volvieron a analizar. Si no pudieron ser resueltos se los excluyó para el análisis.

2.3.2. EVALUACIÓN PARA VERIFICAR SEGREGACIÓN MENDELIANA

Para evaluar la hipótesis de segregación, se utilizaron pruebas de Chi cuadrado (χ^2) sugeridos para los genotipos parentales correspondientes a las relaciones 1:1, 1:2:1 y 1:1:1:1. Los marcadores que demostraron segregación mendeliana de acuerdo a los genotipos parentales fueron considerados para mapeo en el set familiar completo.

Los genotipos de los padres y la progenie fueron analizados independientemente para cada marcador. Para determinar los genotipos de la progenie, los alelos fueron analizados basados en el bandeo que presentaron los parentales.

Posteriormente, los alelos de la madre y del padre fueron separados de la progenie, al igual que los genotipos de los individuos que no correspondieron a la familia. Adicionalmente se hizo un ordenamiento de los datos de acuerdo a los alelos obtenidos para cada tipo de marcador analizado.

2.3.3. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

El análisis de ligamiento para todos los marcadores del set de mapeo fueron realizados usando JoinMap 3.0 (Van Ooijen, J. W. & R.E. Voorrips, 2001) y los grupos de ligamento fueron diseñados con los individuos correspondientes a la progenie. Los datos de los genotipos correspondientes a cada locus fueron transferidos al programa antes mencionado, y codificados de acuerdo al formato CP (Cross-pollination), indicado en las Tablas VI y VII.

Tabla VI. Códigos del genotipo para una población CP, dependiendo del tipo de segregación del locus

Tipo de seg.	Posibles genotipos					
<abxcd>	ac,	ad,	bc,	bd,	--	(ninguna dominación permitida)
<efxeg>	ee,	ef,	eg,	fg,	--	(ninguna dominación permitida)
<hkxhk>	hh,	hk,	kk,	h-,	k-,	--
<lmxll>	ll,	lm,	--			
<nnxnp>	nn,	np,	--			

Cada letra de "a" hasta "p" representa un alelo distinto

"-" significa alelo desconocido

"h-" y "k-" son genotipos dominantes

"h-" significa hh o hk, y

"k-" significa kk o hk

Fuente: Van Ooijen, J. W. & R.E. Voorrips, 2001

Tabla VII. Tipo de códigos de segregación para población tipo CP

Código	Descripción
<abxcd>	locus heterocigoto en ambos padres, cuatro alelos
<efxeg>	locus heterocigoto en ambos padres, tres alelos
<hkxhk>	locus heterocigoto en ambos padres, dos alelos
<lmxll>	locus heterocigoto en un padre
<nnxnp>	locus heterocigoto en otro padre

Fuente: Van Ooijen, J. W. & R.E. Voorrips, 2001

2.4. CONSTRUCCIÓN DEL MAPA

Los marcadores fueron inicialmente asociados usando el comando "Create Groups for Mapping". El mapa fue calculado usando el comando "Calculate Maps" y para el mapa integrado se utilizó el comando "Combine Maps".

La distancia del mapa en centiMorgan (cM) fue calculada usando la función de mapeo de Kosambi, incluido en este software. Datos del mapa obtenidos así como representaciones gráficas del mismo fueron transferidos a Paint y luego a Microsoft Word para su elaboración final.

3. ELABORACIÓN DEL MAPA GENÉTICO

3.1. SEGREGACIÓN DE MARCADORES

Todos los marcadores microsatélites descritos en la Tabla III fueron cribados para detectar segregación mendeliana en los padres y en la progenie. Para comprobar la correspondencia entre ellos, se usó muestras de ADN de los parentales por duplicado (al inicio y al final de cada gel).

De los 120 microsatélites, 76 fueron informativos y estuvieron disponibles para el set de mapeo, los otros 44 produjeron modelos de amplificación en un modelo (Figura 5) no esperado (monomórfico), por lo tanto, fueron descartados para el análisis de ligamiento.

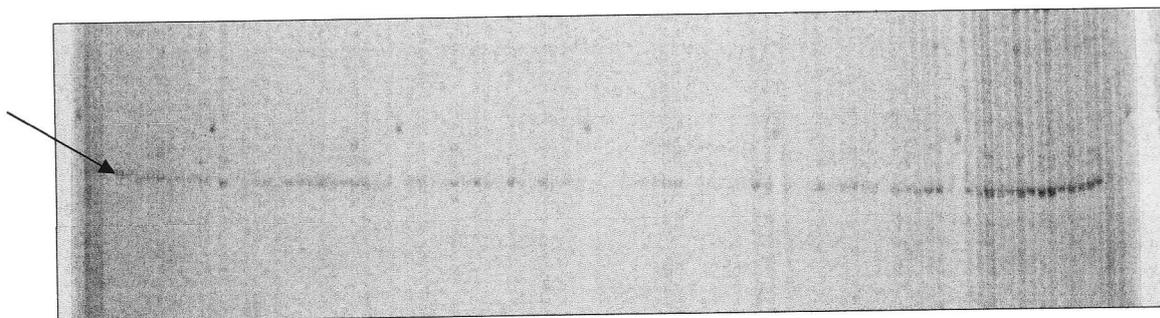


Figura 5. Modelo de segregación monomórfico

En este estudio los marcadores microsatélites segregaron en los modelos: 1:1:1:1 para los genotipos <ab x cd> y <ef x eg> (23.7 % y 10.5 % respectivamente); 1:1 para los genotipos <nn x np> y <lm x ll> (27.6 % y 28.9 %), mientras que el modelo 1:2:1 correspondió al genotipo <hk x hk> (9.2 %) como se muestra en la Figura 6 (a,b,d,c,e.) y Tabla VIII.

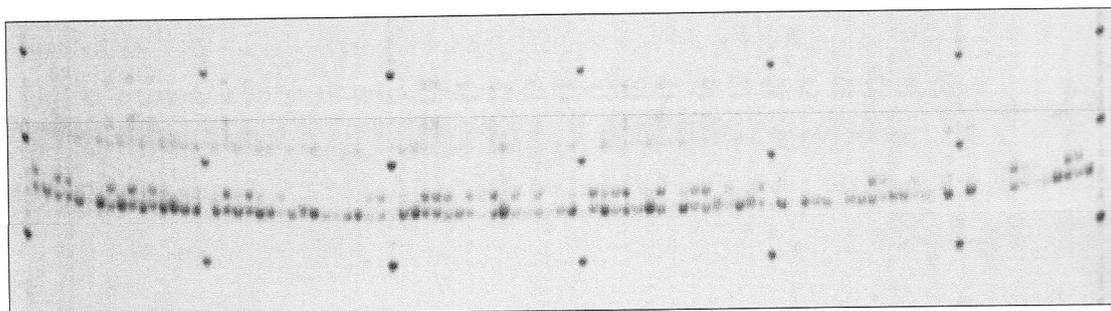


Figura 6a.- CNM402 <lm x ll>

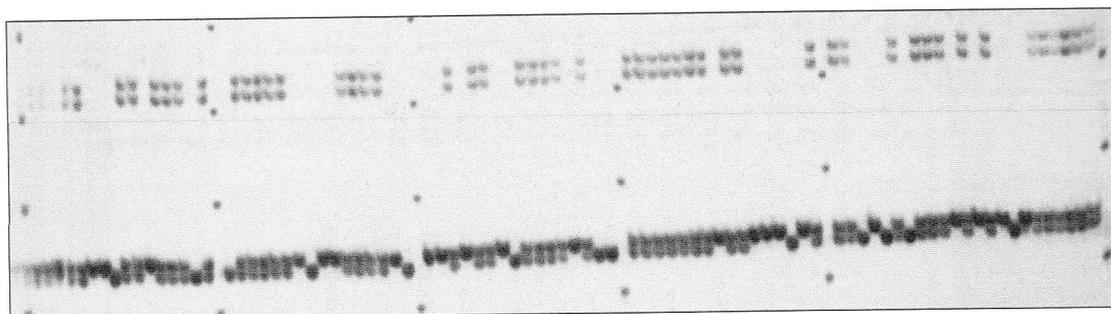


Figura 6b.- CNM437 <hk x hk>

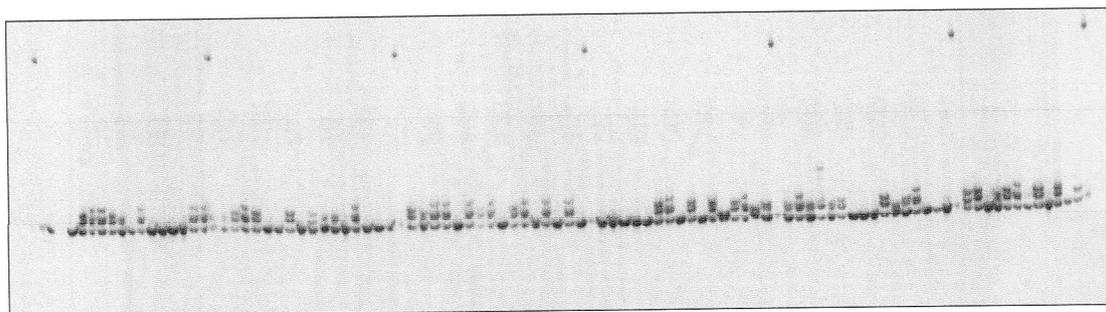


Figura 6c.- CNM791 <nn x np>

Tabla VIII. Modelos de segregación para genotipos y alelos mediante la prueba estadística de χ^2

#	Primer	Segregación genotipos	#	Primer	Segregación alelos
1	67	1:1:1:1	1	81	1:1:1:1
2	81	1:1:1:1	2	83	1:1:1:1
3	83	1:1:1:1	3	159	1:1:1:1
4	142	1:1:1:1	4	177	1:1:1:1
5	159	1:1:1:1	5	197	1:1:1:1
6	177	1:1:1:1	6	339	1:1:1:1
7	197	1:1:1:1	7	384	1:1:1:1
8	339	1:1:1:1	8	430	1:1:1:1
9	354	1:1:1:1	9	444	1:1:1:1
10	384	1:1:1:1	10	494	1:1:1:1
11	406	1:1:1:1	11	658	1:1:1:1
12	430	1:1:1:1	12	717	1:1:1:1
13	444	1:1:1:1	13	742	1:1:1:1
14	494	1:1:1:1	14	755	1:1:1:1
15	557	1:1:1:1	15	805	1:1:1:1
16	658	1:1:1:1	16	842	1:1:1:1
17	668	1:1:1:1	17	850	1:1:1:1
18	717	1:1:1:1	18	67	1:2:1
19	742	1:1:1:1	19	126	1:2:1
20	755	1:1:1:1	20	142	1:2:1
21	802	1:1:1:1	21	327	1:2:1
22	803	1:1:1:1	22	347	1:2:1
23	805	1:1:1:1	23	351	1:2:1
24	815	1:1:1:1	24	354	1:2:1
25	841	1:1:1:1	25	406	1:2:1

Tabla VIII. (continuación)

#	Primer	Segregación genotipos	#	Primer	Segregación alelos
26	842	1:1:1:1	26	557	1:2:1
27	850	1:1:1:1	27	763	1:2:1
28	876	1:1:1:1	28	782	1:2:1
29	118	1:2:1	29	802	1:2:1
30	355	1:2:1	30	803	1:2:1
31	437	1:2:1	31	815	1:2:1
32	639	1:2:1	32	832	1:2:1
33	657	1:2:1	33	834	1:2:1
34	679	1:2:1	34	841	1:2:1
35	878	1:2:1	35	863	1:2:1
36	68	1:1	36	875	1:2:1
37	76	1:1	37	876	1:2:1
38	100	1:1	38	898	1:2:1
39	106	1:1	39	68	3:1
40	126	1:1	40	76	3:1
41	210	1:1	41	100	3:1
42	241	1:1	42	106	3:1
43	327	1:1	43	210	3:1
44	347	1:1	44	241	3:1
45	351	1:1	45	402	3:1
46	402	1:1	46	418	3:1
47	418	1:1	47	439	3:1
48	439	1:1	48	459	3:1
49	459	1:1	49	496	3:1
50	496	1:1	50	523	3:1
51	523	1:1	51	600	3:1
52	600	1:1	52	604	3:1

Tabla VIII. (continuación)

#	Primer	Segregación genotipos	#	Primer	Segregación alelos
53	604	1:1	53	644	3:1
54	644	1:1	54	656	3:1
55	656	1:1	55	668	3:1
56	763	1:1	56	780	3:1
57	780	1:1	57	781	3:1
58	781	1:1	58	791	3:1
59	782	1:1	59	794	3:1
60	791	1:1	60	797	3:1
61	794	1:1	61	808	3:1
62	797	1:1	62	836	3:1
63	808	1:1	63	837	3:1
64	832	1:1	64	840	3:1
65	834	1:1	65	847	3:1
66	836	1:1	66	849	3:1
67	837	1:1	67	871	3:1
68	840	1:1	68	884	3:1
69	847	1:1	69	1035	3:1
70	849	1:1	70	118	1:1
71	863	1:1	71	355	1:1
72	871	1:1	72	437	1:1
73	875	1:1	73	639	1:1
74	884	1:1	74	657	1:1
75	898	1:1	75	679	1:1
76	1035	1:1	76	878	1:1

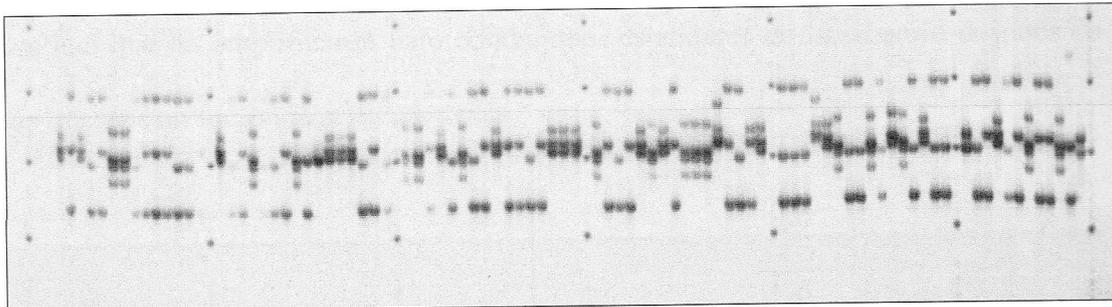


Figura 6d.- CNM850 <ab xcd>

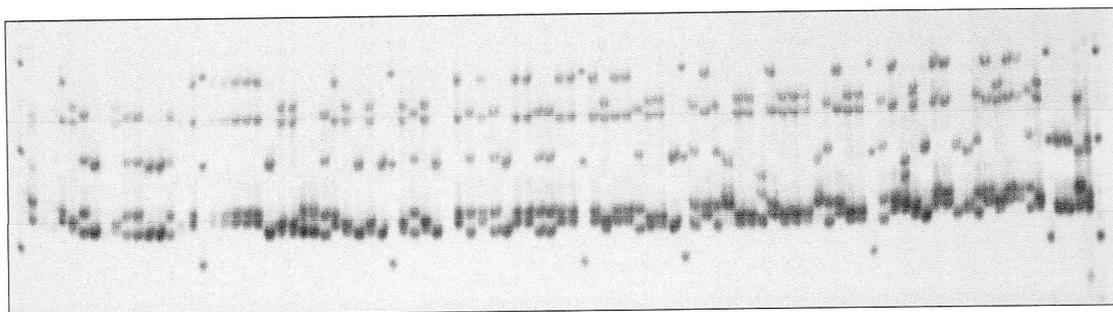


Figura 6e.- CNM876 <ef x eg>

Figura 6. Modelos de amplificaciones de microsatélites codificados de acuerdo al formato CP. La muestra antepenúltima corresponde a la hembra y la última al macho.

La mayoría de los microsatélites produjo doble banda (4.2 %), aunque algunos loci produjeron una sola banda (monomórficos, 10 %). En estos casos, estos fueron descartados para la construcción del mapa, al igual que los microsatélites que presentaron varias bandas con similar intensidad y que fueron considerados como problemas asociados a PCR. Cabe indicar que también se incluyeron los pocos microsatélites que presentaron alelos nulos. (Figuras 7 y 8).

Los loci que no amplificaron bajo condiciones estándares de laboratorio después de dos intentos no fueron investigados más.

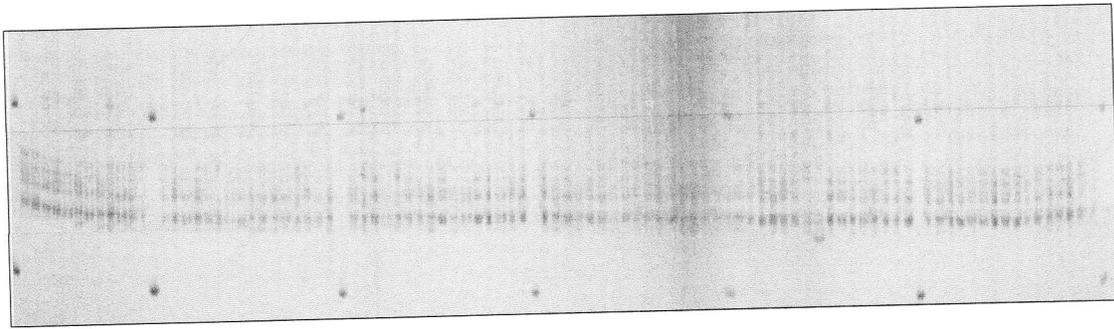


Figura 7. Microsatélite considerado como problema asociado a PCR

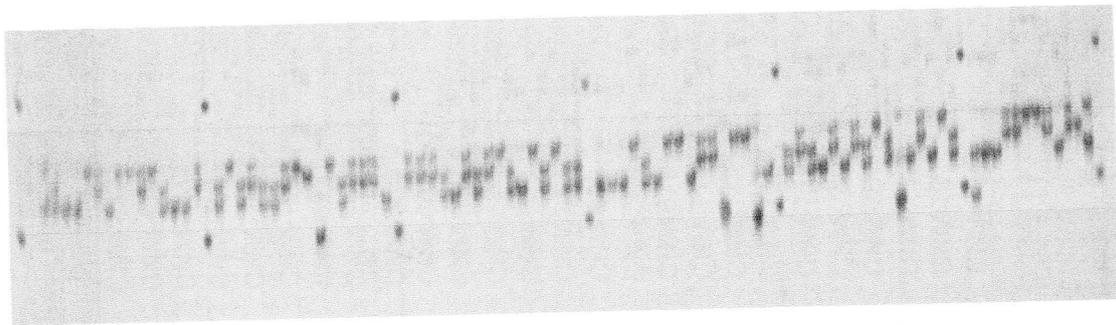


Figura 8. Microsatélite en que se aprecia la presencia de alelos nulos para la hembra

Los genotipos correspondiente a la progenie la familia mapeada y codificados de acuerdo al formato JoinMap están dados en la Tabla IX. Para comprobar dicha distorsión se hizo un test de chi cuadrado para los genotipos (Tabla X). Así, la distorsión ($P < 0.05$) fue evidente para el 6.1 % (5/82) de los loci microsatélites amplificados (CNM379, CNM398, CNM843, CNM852 y CNM21).

Tabla IX. Genotipos correspondientes a los marcadores utilizados en la familia mapeada

#	Primers	Segregación	#	Primers	Segregación	#	Primers	Segregación
1	CNM-67	<efxeg>	27	CNM-437	<hkxhk>	53	CNM-797	<lmxll>
2	CNM-68	<nnxnp>	28	CNM-439	<lmxll>	54	CNM-802	<efxeg>
3	CNM-76	<nnxnp>	29	CNM-444	<abxcd>	55	CNM-803	<efxeg>
4	CNM-81	<abxcd>	30	CNM-459	<nnxnp>	56	CNM-805	<abxcd>
5	CNM-83	<abxcd>	31	CNM-494	<abxcd>	57	CNM-808	<nnxnp>
6	CNM-100	<lmxll>	32	CNM-496	<nnxnp>	58	CNM-815	<efxeg>
7	CNM-106	<lmxll>	33	CNM-523	<nnxnp>	59	CNM-832	<lmxll>
8	CNM-126	<lmxll>	34	CNM-557	<efxeg>	60	CNM-834	<nnxnp>
9	CNM-142	<efxeg>	35	CNM-600	<lmxll>	61	CNM-836	<nnxnp>
10	CNM-159	<abxcd>	36	CNM-604	<lmxll>	62	CNM-837	<nnxnp>
11	CNM-177	<abxcd>	37	CNM-639	<hkxhk>	63	CNM-840	<lmxll>
12	CNM-197	<abxcd>	38	CNM-644	<nnxnp>	64	CNM-841	<efxeg>
13	CNM-210	<nnxnp>	39	CNM-656	<lmxll>	65	CNM-842	<abxcd>
14	CNM-241	<nnxnp>	40	CNM-657	<hkxhk>	66	CNM-847	<lmxll>
15	CNM-327	<lmxll>	41	CNM-658	<abxcd>	67	CNM-849	<lmxll>
16	CNM-339	<abxcd>	42	CNM-668	<efxeg>	68	CNM-850	<abxcd>
17	CNM-347	<lmxll>	43	CNM-679	<hkxhk>	69	CNM-863	<nnxnp>
18	CNM-351	<nnxnp>	44	CNM-717	<abxcd>	70	CNM-871	<lmxll>
19	CNM-118	<hkxhk>	45	CNM-742	<abxcd>	71	CNM-875	<nnxnp>
20	CNM-354	<efxeg>	46	CNM-755	<abxcd>	72	CNM-876	<efxeg>
21	CNM-355	<hkxhk>	47	CNM-763	<nnxnp>	73	CNM-878	<hkxhk>
22	CNM-384	<abxcd>	48	CNM-780	<nnxnp>	74	CNM-884	<nnxnp>
23	CNM-402	<lmxll>	49	CNM-781	<lmxll>	75	CNM-898	<nnxnp>
24	CNM-406	<efxeg>	50	CNM-782	<nnxnp>	76	CNM-1035	<nnxnp>
25	CNM-418	<lmxll>	51	CNM-791	<nnxnp>			
26	CNM-430	<abxcd>	52	CNM-794	<lmxll>			

Tabla X. Análisis de Chi Cuadrado para alelos y genotipos

#	Primer	Chi square alelos	Chi square genotipos
1	177	0,12636915	0,067481164
2	197	0,21505986	0,140496328
3	210	0,414216179	0,317310813
4	241	0,113009174	0,052259512
5	327	0,53526143	0,263552689
6	339	0,276226296	0,1175744367
7	347	0,582748259	0,298697771
8	351	0,784080768	0,485498804
9	354	0,085902233	0,137735184
10	355	0,10034828	0,250741354
11	362	**	*
12	367	***	*
13	379	0,029119018	1,65369E-06
14	383	*	*
15	384	0,988466909	0,64626028
16	398	0,001113961	0,001028115
17	402	0,777297411	0,72903449
18	406	0,301580606	0,315807871
19	412	*	*
20	416	*	*
21	418	0,369314369	0,271539339
22	430	0,798264703	0,285036992
23	437	0,626496275	0,105399225
24	439	0,711531418	0,650612964
25	444	0,774392519	0,273714751
26	459	0,912332942	0,892738401
27	494	0,230706749	0,2191099
28	496	0,220329882	0,133326986
29	523	0,465208821	0,371093372
30	557	0,860707977	0,729133077

Tabla X. (continuación)

#	Primer	Chi square alelos	Chi square genotipos
31	600	0,314878923	0,21835481
32	604	0,054291835	0,018422127
33	639	0,345778592	0,069055862
24	644	0,753805852	0,700896446
35	652	*	*
36	656	0,355225885	0,257518154
37	657	0,637351889	0,766874513
38	658	0,680846379	0,474176549
39	668	0,860707977	0,51252092
40	677	*	*
41	679	0,637351889	0,766874513
42	690	*	*
43	701	*	*
44	778	*	*
45	717	0,666765809	0,169828737
46	742	0,921562341	0,818948934
47	755	0,869422638	0,530005629
48	763	0,727470511	0,425030653
49	772	*	*
50	780	0,173568239	0,09558073
51	781	0,318308326	0,221623737
52	782	0,406569663	0,179712587
53	784	*	*
54	791	0,212317257	0,126630498
55	794	0,855132141	0,823063274
56	797	0,654073296	0,583128094
57	802	0,963640444	0,971824883
58	803	0,438234994	0,59341918
59	805	0,243395233	0,073488533
60	808	0,650110122	0,578514724
61	813	*	*
62	815	0,089032839	0,030650414

Tabla X. (continuación)

#	Primer	Chi square alelos	Chi square genotipos
63	825	0,802910366 *	0,507593718 *
64	832	0,944629941	0,735720137
65	834	0,855132141	0,823063274
66	836	0,583882423	0,502334955
67	837	0,036924099	0,010601844
68	840	0,450996245	0,252282278
69	841	0,373490936	0,287003145
70	842	0,041230956	0,001529248
71	843	0,173568239	0,09558073
72	847	0,856890422	0,825199067
73	849	0,532434886	0,510867369
74	850	0,409075484	3,8324E-06
75	852	*	*
76	862	0,902520294	0,650612964
77	863	*	*
78	866	*	*
79	867	*	*
80	869		
81	871	0,782863662	0,735720137
82	875	0,352321955	0,148614061
83	876	0,106404615	0,195443022
84	878	0,197288111	0,410815783
85	884	0,056759454	0,019630659
86	885	***	***
87	898	0,993355506	0,908072555
88	899	*	*
89	900	0,021818436	*
90	913	*	*
91	917	*	*
92	921	*	*
93	931	*	*
94	945	**	**

Tabla X. (continuación)

#	Primer	Chi square alelos	Chi square genotipos
95	1035	0,704195442	0,641938221
96	1087	*	*
97	1	*	*
98	21	0,429062003	9,85177E-10
99	25	*	*
100	26	*	*
101	32	*	*
102	39	*	*
103	42	*	*
104	46	*	*
105	54	*	*
106	66	*	*
107	67	0,041884498	0,067322733
108	68	0,715000655	0,654720846
109	71	0,885047425	*
110	76	0,19471315	
111	81	1	0,112240528
112	83	0,988466909	0,969140404
113	100	0,201242714	0,764562557
114	106	0,476033495	0,117524912
115	118	0,027814861	0,382733091
116	119	**	0,088396233
117	126	0,138676727	**
118	131	*	0,046837421
119	142	0,856996892	*
120	159	0,989271021	0,819167205
	82 marcadores		0,866505685
Total			
*	No segregaron		
**	No amplificaron parentales		
***	Presencia de bandas múltiples		

Muestras de ADN de buena calidad fueron usadas para el análisis de los microsatélites. Todos los primers se usaron para amplificar alelos.

Todas las muestras fueron corridas junto a un marcador de pares de bases de tamaño conocido para determinar la longitud de las bandas. La banda más fuerte fue escogida para determinar el tamaño de los alelos.

3.2. CONSTRUCCIÓN DEL MAPA

Los datos de los genotipos fueron analizados con JoinMap (Van Ooijen, J. W. & R.E. Voorrips, 2001). En esta investigación 46 marcadores presentaron ligamiento (61.5 %) y 30 marcadores no estuvieron ligados a ningún grupo representando el 39.5 %.

El mapa fue construido con marcadores agrupados dentro de dos grupos de datos con criterios de $LOD \geq 2.0$ y $LOD \geq 3.0$.

Con los dos grupos y en base a estos datos, los marcadores fueron divididos dentro de doce grupos de ligamiento (Tabla XI). El mapa comprendió 46 loci, cubriendo 255 cM con un intervalo de 6.5 cM.

El número de loci por grupo de ligamiento varió de 2 a 6 con un intervalo de 4.5 cM

Tabla XI. Grupos de ligamientos estadísticos

# Grupo	cM	# Marcadores	cM/Marcador
1	74	6	12,3
2	53	6	8,8
3	33	5	6,6
4	26	5	5,2
5	23	5	5,8
6	16	4	4
7	10	3	3,3
8	7	3	2,3
9	7	2	3,5
10	3	3	1
11	2	2	1
12	1	2	0,5
Totales	255	46	4,5

Los doce grupos de ligamiento se ordenaron arbitrariamente desde el más grande al más pequeño basados en la longitud promedio a cM del mapa (Figura 9).

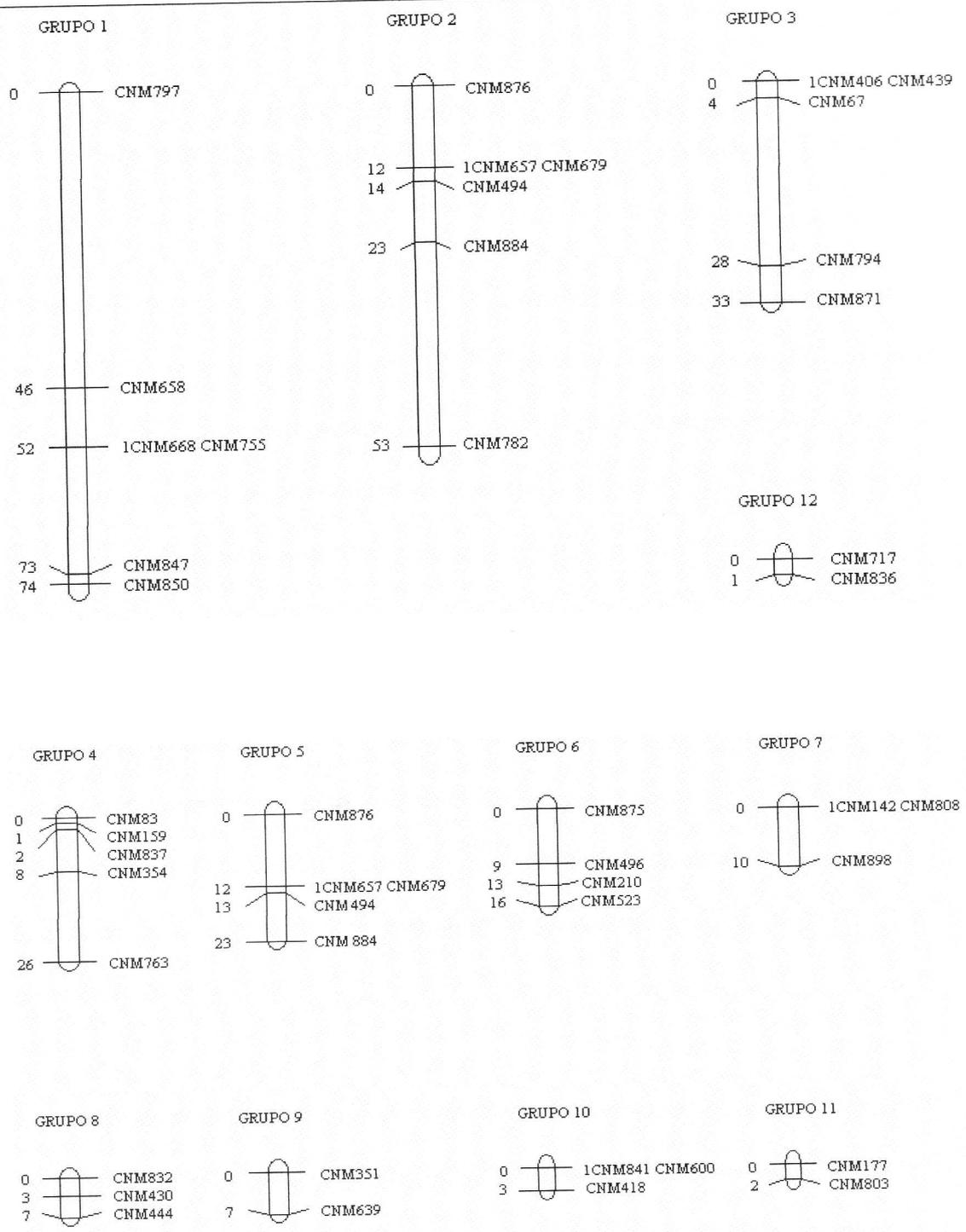


Figura 9. Mapa de ligamiento de *P. vannamei* construido con el método JoinMap.

4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA ELABORACIÓN DEL MAPA DE LIGAMIENTO

Si bien el primer mapa de ligamiento de moderada densidad para *P. vannamei*, (Pérez *et al.*, 2004) fue construido usando AFLPs, éste mapa de ligamiento es el primero hecho exclusivamente con marcadores codominantes tipo microsatélites. La ventaja de un mapa de esta clase en comparación con un mapa basado en AFLPs, es que ésta información puede ser transferida a otra familia sin necesidad de conocer el pedigrí.

Este mapa representa un esfuerzo inicial para estimar las distancias genéticas entre marcadores codominantes y ordenar los loci dentro de grupos de ligamientos. Está basado en 46 marcadores microsatélites tipeados en 88 animales correspondientes a la progenie de una sola familia de camarones constituyendo un mapa de baja densidad y con marcadores separados por una gran distancia genética, tal como se puede observar en el grupo 1.

Ihara *et al* en el 2004 construyó un mapa para el genoma del bovino utilizando 3802 microsatélites, cubriendo el 51% del total con un intervalo de 1.4 cM entre marcadores. En el mismo año, Lee *et al* realizó un segundo mapa de ligamiento para la tilapia empleando 525 microsatélites identificando 30 grupos de ligamientos con un cubrimiento de 704 cM del total estimado de 1 200 cM.

El pequeño número de loci mapeados en los grupos de ligamientos impiden rigurosos análisis, sin embargo con éstos marcadores se podrían localizar regiones de interés utilizando bulked segregant analysis.

La distancia que se aprecia entre los marcadores CNM797 y CNM658, puede ser debido a errores en los datos de los genotipos lo cual aumenta considerablemente la distancia entre marcadores (Lincoln y Lander1992). Otra causa puede ser debido a deleciones, diferencia en la fracción de recombinación o tamaño de la muestra.

En cuanto a los microsatélites que presentaron una banda ancha, es posible que estén constituidos por dos bandas de tamaño similar pero que no pudieron ser resueltas con el sistema electroforético usado. En este sentido, desde un punto de vista metodológico se podrían optimizar procesos. Por ejemplo, el uso de técnicas como SSCP, permitiría definir mejor las bandas de microsatélites, haciendo más fácil su identificación.

El andamio de marcadores de ADN de marcadores presentados aquí posibilitaría la rápida construcción de la próxima generación de un mapa de ligamiento de alta densidad para el *P. vannamei*.

Es indudable que éste mapa evolucionará cuanto más marcadores se agreguen, aunque el orden exacto de marcadores y grupos de ligamientos variará de familia a familia.

Nosotros esperamos que la suma de nuevos marcadores deba condensar el mapa actual finalmente en 44 grupos de ligamientos, correspondientes al número de cromosomas en el camarón en estudio.

Agregar marcadores SNPs o AFLPs a marcadores de ADN microsatélites producirá un mapa de ligamiento de alta densidad, el cual tendrá muchos usos en diversos experimentos. Será una herramienta indispensable para mapear QTL, para mapear la localización de genes letales y localizar genes expresados que son de importancia económica en acuicultura.

CONCLUSIONES

El hecho de que los microsatélites son de herencia codominante fue esencial para poder establecer los modelos de segregación mendeliana de una manera sin duda mucho más precisas que con otros marcadores dominantes tales como los AFLPs.

Los datos de la familia se obtuvieron de ADN extraído, ya sea de branquias o de músculos, disponiéndose de resultados en un tiempo corto (una semana), los cuales se pueden revisar cuando sean necesarios ya que el ADN se conserva durante años.

La distribución de los marcadores microsatélites en este estudio fue al azar y ciertos cromosomas contienen más loci microsatélites que otros, debido probablemente a la insuficiente cantidad de marcadores polimórficos.

Debido a que este mapa está basado en secuencias microsatélites, es fácil hacer comparaciones del mapa construido para diferentes especies. Este recurso permitirá un aprovechamiento mas eficiente y económico de los datos disponibles para esta especie.

Particularmente, los resultados aquí presentados son de fundamental importancia para el desarrollo de estudios destinados a la selección de un grupo mínimo de marcadores

que aseguren una cobertura del genoma para su evaluación como herramienta para la identificación de caracteres asociados al mejoramiento acuícola.

Se espera que en un futuro cercano estas técnicas puedan ser utilizadas como complementarias a los caracteres fenológicos actualmente en uso.

RECOMENDACIONES

El proyecto construcción del mapa genético del *P. vannamei* nos ha convencido que sería útil continuar este trabajo adicionando más marcadores microsatélites en los mismos individuos.

Debido a que los microsatélites EST tienen bajo costo, se debería continuar con el tamizado de datos disponibles en secuencias públicas y así incrementar el número de nuevos marcadores moleculares, los cuales servirán de gran utilidad para aumentar la densidad del mapa de ligamiento, con la meta de saturarlo.

La ejecución de la técnica SSR-EST a mayor escala para cubrir líneas de investigaciones genéticas originales, particularmente para detección de QTLs, probablemente, con presupuestos relativamente manejables.

Integrar los mapas genéticos de AFLPs y del microsatélite presente, adicionando además una gran cantidad de marcadores moderadamente polimórficos será de mucho beneficio en áreas investigativas de genética de camarón.

Optimizar la técnica de "PCR multiplex" ayudará a abaratar aún más los costos debido a que en una sola reacción de PCR se incluirían varios iniciadores.

BIBLIOGRAFÍA

Ball, A.O., Chapman., RW. 2003. Population genetic analysis of white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, using microsatellite genetic markers. Mol Ecol.12(9): 2319-30.

Ball. A.O., Leonard, S., Chapman., R. W. 1998. Characterization of (GT)_n microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*) Mol. Ecol. 7: 1251-1253.

Bagshaw, J.C. and Buckholt., MA. 1997. A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. Gene.184(2):211-4.

Blankenship, SM., May B, Hedgecock D., 2002. Evolution of a perfect simple sequence repeat locus in the context of its flanking sequence. Mol Biol Evol. 19(11): 1943-51.

Beckman, J.S. and M. Soller., 1990. Toward a unified approach to genetic mapping of eucaryotes based on sequence Tagged microsatellite sites. Biotechnology 930-2.

Bishop, M. D., Kappes, S.M., Keele, J.W., Stone, Rt., Sunden, SLF., Hawkins, GA., Toldo, SS., Fries, R., Grosz, MD., Yoo, J. and Beattie., C. 1994. A Genetic Linkage Map for Cattle. *Genetics* 136: 619-639.

Borrell, YJ., Blanco,G., Vásquez,E., Álvarez, J., Pineda, H., Fernández-Pato, C., Martínez, C., Sánchez., JA. 2003. La variabilidad microsatélite y sus aplicaciones en la Acuicultura. (<http://www.civa2003.org>), 1042-1056.

Brown, S.E., Severson, D.W., Smith, L.A., and Knudson, D.L. (2001) Integration of the *Aedes aegypti* Mosquito Genetic Linkage and Physical Maps. *Genet.* 157: 1299-1305.

Chakravarti, A., L. Reefer. 1991. A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. *Genetics* 128: 175-182.

Cruz, P., Ibarra, AM., Mejia-Ruiz, M., Perez-Enriquez, R., 2003. Genetic Variability Assessed by microsatellite in a Breeding Program of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Mar Biotechnol.* Nov. 6.

Coimbra, M.R.M., Hasegawa, O., Kabayashi, K., Koretsugu, S., Ohara, E., Ozaki, A., Sakamoto, T., Naruse, K., Okamoto, N., 2003. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* 2003. *Aquaculture* 220, 203-218.

Chambers, GK. and ES. MacAvoy., 2000. Microsatellites Consensus and controversy. Mol. Biol. 126(4): 455-76.

Davis, G. and D. Hetzel., 2000. Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. Aquaculture research 31: 3-10.

Dinesh, K., W, Chan, T. Lim y V. Chang., 1995. RAPD markers in fishes: an evaluation of resolution and reproducibility. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 3(2):112-118.

Don, R., P. Cox, B. Wainwright, K. Baker and J. Mattick., 1991. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res 19: 4008.

Erazo, C., 2002. Mapeo genético en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis para optar al título de Magister en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil-Ecuador.

Féral, Jean-Pierre., 2002. How useful are the genetics markers in attempts to understand and manage marine diversity? Journal of experimental Marine Biology and Ecology 268(2): 121-145

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., Alcívar-Warren., A., 1996. Molecular analysis of RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Mol. Mar. Biotechnol.* 5: 71-83

Haldane, J.B.S., 1919. The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. *Journal of Genetic* 8: 299-309

Herbinger, C. M., Doyle, R. W., Pitman, E. R., Paquet, D., Mesa, K A., Morris, D. B., Wright, J. M., Cook, D., 1995. DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared *Rainbow trout*. *Aquaculture*. 137: 245-256.

Hizer, S.E., Dhar, K.R. Klimpel, y D.K. Garcia., 2002. RAPD markers as predictors of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) resistance in shrimp (*Litopenaeus stylirostris*).*Genome* 45:1-7.

Hubert, S. and Hedgecock, D., 2004. Linkage Maps of microsatellite DNA Markers for the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics* 168: 351-362.

Ihara, N., Takasuga, A., Mizoshita, K., Takeda, H., Sugimoto, M., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Itoht, T., Watanabe, T., Reed, KM., Snelling WM., Kappes, SM., beattie, CW., Bennett, GL., Sugimoto, Y., 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res.* 14(10A): 1987-98.

Kosambi, D.D., 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Anm. Eugen.* 12: 172-75

Kwiatowski, J., Skarecky, D., Hernandez, S., Pham, D., Quijas, F., Ayala, F.J., 1991. High Fidelity of the Polymerase Chain Reaction. *Mol. Ecol. Evol.* 8(6): 884-887.

Kocher, T.D., Lee, W.J., Soboleswka, H., Penman, D., McAndrew, B., 1998. A Genetic Linkage Map of Cichlid Fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Genetics* 148, 1225-1232.

Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M. J., Lincoln, S.E., Newburg, L., 1987. MAPMARKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1(2): 174-81.

Lee, BY., Lee, WJ., Streelman, K.L., Carleton, K. I., Howe, A. E., Hulata, G., Slettan, A., Stern, J.E., Terai, Y., Kocher, T. D., 2005. A second Generation Genetic linkage Map of Tilapia (*Oreochromic* Spp.). *Genetic.* 104.035022.

Lehmann, T., Hawley, WA., Collins FH., 1996. An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics*. 144(3):1155-63.

Li Zhanjiang., 2003. A review of catfish genomic: Progress and perspectives. *Comp Funct Genom* 4: 259-265.

Lincoln, S. E. and E. S. Lander., 1992. Systematic detection of errors in genetic linkage data. *Genomics* 14: 604-610.

Liu, Z., Karsi, A., Dunham, RA., 1999. Development of Polymorphic EST Markers Suitable for Genetic Linkage Mapping of Catfish. *Genetics*1(5):437-0447.

Liu, Z., Farsi, A., Li, P., Cao, D., Dunham, R., 2003. An AFLP-Based Genetic Linkage Map of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Constructed by Using an Interspecific Hybrid Resource Family. *Genetics*: 687-694.

Liu, Z.J. and Cordes, J. F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.

Maggioni, R., Rogers, A.D., Meehan, D., 2003. Population structure of *Litopenaeus schimitti* (Decapoda:Penaeida) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellites loci. *Mol. Ecol.* 12(12): 3213-7.

Manly, K., R. Cudmore, and J.M.Meer., 2001. Map. Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. Mamm. Genome 12: 930-932

Mejía, H., 2002. Genoma del Camarón Blanco del Pacífico. Panorama Acuícola. Vol 7 (#2): 27.

Meehan, D., Xu, Z., Zuniga, G., Alcivar-Warren, A., 2003. High Frequency and Large Number of Polymorphic Microsatellites in Cultured Shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea:Decapoda]. Mar. Biotechnol. 5: 311-330.

Miesfeld, Roger., 1999. Applied molecular genetics. Ed. Wiley-liss. U.S.A.

Moen, T, Hoyheim B, Munck H, Gomez-Raya L., 2004. A linkage map of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals an uncommonly large difference in recombination rate between the sexes. Anim. Genet. 2004. 35(2):81-92.

Moore, S., Whan, V., Davis, G., Byrne, K., Hetzel, D., Preston, N., 1999. The development and application of genetic markers for the Karuma prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture 173: 19-32.

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

Ohara, E., Nisimura, T., Nagakura, Y., Sakamoto, T., Mushiake, K., Okamoto, N., 2005. Genetic Linkage Maps of two yellowtaile (*Seriola quinqueradiata* and *Seriola lalandi*). *Aquaculture* 224: 41-48.

Ortiz, J.C., 2004. Desarrollo de Marcadores Genéticos tipo microsátélites e intrones para mapeo genético en *Litopenaeus vannamei*. Tesis para optar al título de Magister en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil-Ecuador.

Perez, F., Erazo, C., Zhinaula, M., Volckaert, F., Calderon, J., 2004. A sex specific linkage map of the white shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* based on AFLP markers. *Aquaculture* 242: 105-118.

Ramos, R.C., 1997. Chromosome studies on the marine shrimps *Penaeus vannamei* and *P. californiensis* (Decapoda). *J. Crustac. Biol.* 17, 666-673.

Rexroad, C. E., Coleman, R.L., Martin, A.M., herhberger, W.K., Killefer, J., 2001. Thirty-five polymorphic microsatellite markers for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Genet.* 32, 317-319.

Russel, P., 1992. *Genetics*. 3rd edition. Harper Collins Publishers.

Sakamoto, T., Danzmann, R. G., Gharbi, k., Howard, P., Ozaki, A., Khoo, S. K., Woram, R. A., Okamoto, N., Ferguson, M. m., Holm, L. E., Guyomard, R., Hoyheim,

B., 2000. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics* 155: 1331-1345.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol.1,2,3.

Shahjahan, R. K. Roger, R., Leopold y J, Devault., 1995. Lower incubation-temperature increases yield of insect genomic DNA isolated by the CTAB method. *Biotechniques* 19: 332-334.

Slettan, A., Olsaker, I., Tie, O., 1997. Genome mapping of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*. 137: 99-102

Tanck, M.W., Palstra, A. P., van der Weerd, M., Leffering, C. P., van der Poel, J.J., Bovenhuis, H., Komen, J., 2001. Segregation of microsatellite alleles and residual heterozigosity at single loci in homocigious androgenetic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genome* 44, 743-751.

Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., Boonsaeng, V.V., 1998. Genetic structure in Wild populations of Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified.

Tong, J., Chu, K.H., 2002. Genome mapping in aquatic animals: progress and future perspectives. *Genetika* 38(6): 793-50

Toth, G., Gaspari, Z., Jurka, J., 2000. Different Eukaryotic Genome: Survey and analysis. *Genome Research* 10: 967-981.

Van Ooijen, J. W.& R.E. Voorrips., 2001. JoinMap 3.0 Software for the calculation of genetic linkage maps. Plan Research International, Wageningen, the Netherlands.

Vonau, V., Ohresser, M., Bierne, N., Delsert, C., Beuzart, J., Bedier, E., Bonhomme, F., 1999. Three polymorphic microsatellite in the shrimp *Penaeus stilyrostris*. *Anim. Genet.* 30(3): 234-5

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.

Walbeiser, G.C., Boswth, B. G., Nonneman, D. J., and Wolters, W. R., 2001. A Microsatellite Based Genetic Linkage Map for Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* . *Genetics* 158: 727-734.

Wilson, K., Li, Y., Swan, J., Ballment, B., Fayazy, Z., Byrne, K., Whan, V., Iglesias, D., Lehnert, S., Pongsomboon, S., Tassanakajon, A., Kenway, M., Benzie, J., Moore,

S., 2000. International collaboration on genetic mapping of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*: progress update. Paper presented in International Marine Biotechnology Conference 2000. Townsville, Australia.

Wilson, K., Li, Y., Whan, V., Lehnert, S., Byrne, K., Moore, S., Pongsomboon, S., Tassanakajon, A., Rosenberg, G., Ballment, E., Fayazy, Z., Swan, J., Kenway, M., Benzie, J., 2002. Genetic mapping of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. *Aquaculture* 204: 297-309.

Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J. and Tingey, S., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res* 18: 6531-6535.

Wolfus, G. M., Garcia, D. K., Alcivar-Warren, A., 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing 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. *Plant & Animal Genome VIII Conference*.

Wuthisuthmethavee, S., Lumubol, P., Vanavichit, A., 2000. Development of microsatellite markers in black tiger shrimps (*Penaeus monodon Fabricius*) Aquaculture 224: 39-50.

Xu, Z., Dhar, AK., Wryzykowski, J., Alcivar-Warren, A., 1999. Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome. Anim Genet. 30(2): 150-6.

Xu, Z., Primavera, H.J., De la Peña, L.D., Pettit, P., Belek, J., Alcivar-Warren, A., 2001. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellite. Aquaculture 199: 13-40.

Zhinaula, M.J., 2002. Correlación de Crecimiento en *Litopenaeus vannamei* Utilizando ISSRs, Como Método de Identificación Individual. Tesis para optar al título de Ingeniero Acuicultor, Universidad Técnica de Machala. Machala-Ecuador.

ANEXOS

ANEXO 1

Camarones para mapa (peso y concentración de ADN).

#	Peso (g)	ng/uL	C	TE	#	Peso (g)	ng/uL	C	TE
1*	0,065	172	116	84	51	0,084	305	66	134
2*	0,119	317	63	137	52	0,078	304	66	134
3*	0,153	218	92	108	53	0,101	269	74	126
4*	0,088	153	131	69	54	0,01	242	83	117
5*	0,145	170	118	82	55	0,153	231	87	113
6*	0,122	411	49	151	56	0,093	381	52	148
7*	0,133	120	167	33	57	0,065	215	93	107
8*	0,149	442	45	155	58	0,046	283	71	129
9*	0,131	472	42	158	59	0,098	162	123	77
10*	0,184	84	238	-38	60	0,058	255	78	122
11*	0,083	235	85	115	61	0,097	398	50	150
12*	0,093	208	96	104	62	0,077	287	70	130
13*	0,066	182	110	90	63	0,062	242	83	117
14*	0,125	488	41	159	64	0,052	458	44	156
15*	0,074	210	95	105	65	0,067	406	49	151
16	0,119	421	48	152	66	0,119	323	62	138
17	0,084	309	65	135	67	0,079	203	99	101
18	0,051	214	93	107	68	0,098	337	59	141
19	0,111	375	53	147	69	0,064	216	93	107
20	0,639	272	74	126	70	0,068	262	76	124
21	0,093	282	71	129	71	0,111	433	46	154
22	0,106	411	49	151	72	0,071	282	71	129
23	0,083	188	106	94	73	0,073	303	66	134
24	0,084	175	114	86	74	0,117	401	50	150
25	0,076	221	90	110	75	0,105	526	38	162
26	0,052	187	107	93	76	0,01	261	77	123
27	0,59	104	192	8	77	0,103	276	72	128
28	0,204	424	47	153	78	0,082	307	65	135
29	0,154	295	68	132	79	0,118	422	47	153
30	0,1555	79	253	-53	80	0,075	217	92	108
31	0,177	526	38	162	81	0,072	233	86	114
32	0,124	250	80	120	82	0,174	337	59	141
33	0,082	310	65	135	83	0,097	272	74	126
34	0,068	371	54	146	84	0,051	190	105	95
35	0,054	168	119	81	85	0,069	368	54	146
36	0,06	206	97	103	86	0,074	222	90	110
37	0,076	382	52	148	87	0,082	277	72	128
38	0,163	456	44	156	88	0,054	287	70	130
39	0,116	313	64	136	89	0,14	197	102	98
40	0,071	268	75	125	90	0,097	222	90	110
41	0,079	291	69	131	91	0,097	370	54	146
42	0,067	369	54	146	92	0,122	341	59	141
43	0,067	253	79	121	93	0,071	257	78	122
44	0,235	332	60	140	94	0,058	343	58	142
45	0,115	225	89	111	95	0,047	325	62	138
46	0,072	176	114	86	96	0,082	261	77	123
47	0,063	190	105	95	97	0,034	319	63	137
48	0,065	138	145	55	98	0,085	385	52	148
49	0,066	274	73	127	99	0,43	392	51	149
50	0,102	400	50	150	100	0,087	350	57	143

(# + *) Muestras fueron tomadas para otro experimento.

(II extracción).

Camarones para mapa (peso y concentración de ADN).

#	Peso (g)	ng/uL	C	TE	#	Peso (g)	ng/uL	C	TE
1	0,148	312	64	136	47	0,134	197	102	98
2	0,107	123	163	37	48	0,122	211	95	105
3	0,128	150	133	67	49	0,13	164	122	78
4	0,102	106	189	11	50	0,108	491	41	159
5	0,142	*			51	0,128	249	80	120
6	0,108	278	72	128	52	0,109	134	149	51
7	0,197	144	139	61	53	0,98	156	128	72
8	0,085	152	132	68	54	0,101	176	114	86
9	0,072	151	132	68	55	0,069	235	85	115
10	0,079	112	179	21	56	0,111	185	108	92
11	0,069	204	98	102	57	0,137	329	61	139
12	0,097	275	73	127	58	0,137	275	73	127
13	0,141	167	120	80	59	0,09	188	106	94
14	0,059	160	125	75	60	0,086	166	120	80
15	0,03	94	213	-13	61	0,091	171	117	83
16	0,069	188	106	94	62	0,12	244	82	118
17	0,083	209	96	104	63	0,109	241	83	117
18	0,089	191	105	95	64	0,106	175	114	86
19	0,102	*		200	65	0,091	232	86	114
20	0,093	141	142	58	66	0,082	105	190	10
21	0,068	104	192	8	67	0,071	136	147	53
22	0,125	287	70	130	68	0,105	222	90	110
23	0,079	252	79	121	69	0,082	261	77	123
24	0,105	250	80	120	70	0,087	165	121	79
25	0,091	233	86	114	71	0,096	175	114	86
26	0,098	168	119	81	72	0,131	335	60	140
27	0,108	158	127	73	73	0,12	250	80	120
28	0,1	105	190	10	74	0,127	303	66	134
29	0,097	147	136	64	75	0,113	*		200
30	0,169	251	80	120	76	0,09	237	84	116
31	0,122	162	123	77	77	0,097	233	86	114
32	0,092	118	169	31	78	0,081	309	65	135
33	0,094	151	132	68	79	0,086	419	48	152
34	0,077	87	230	-30	80	0,095	225	89	111
35	0,084	*		200	81	0,043	155	129	71
36	0,074	83	241	-41	82	0,055	136	147	53
37	0,122	163	123	77	83	0,089	235	85	115
38	0,094	221	90	110	84	0,076	155	129	71
39	0,089	104	192	8	85	0,105	148	135	65
40	0,132	397	50	150	86	0,128	298	67	133
41	0,101	359	56	144	87	0,104	195	103	97
42	0,07	156	128	72	88	0,087	281	71	129
43	0,13	411	49	151	89	0,176	229	87	113
44	0,091	213	94	106	90	0,107	133	150	50
45	0,071	164	122	78	91	0,19	258	78	122
46	0,154	245	82	118	92	0,136	236	85	115

• No hubo muestra

(III extracción).

Camarones para mapa (talla y peso respectivo).

#	Largo (cm.)	Peso (g)	#	Largo (cm.)	Peso (g)
1	14	20,1	50	12	10,6
2	13,5	17,8	51	13,9	17,6
3	10	7,1	52	15,7	26,2
4	14,7	22,6	53	13,4	15,5
5	13,2	16,1	54	12,8	14,3
6	13,3	16,3	55	15,1	22,8
7	13,6	16,9	56	13	14,6
8	11,5	9,6	57	14,6	21,8
9	13,3	15,7	58	13,5	15,9
10	12	11,1	59	13	13,9
11	15,5	27,3	60	14	19
12	12	11,8	61	12,5	12,8
13	11,5	10,5	62	14,5	19,9
14	12,8	14,2	63	14	18,7
15	14	19,8	64	12,4	13,1
16	12,6	14,2	65	12,4	12,2
17	13,5	18,5	66	15,1	25,4
18	13,4	16,7	67	13,6	16,5
19	13,5	16,6	68	14,6	22,7
20	13,1	15,1	69	13,5	16,7
21	11,5	9,8	70	13,1	15,2
22	13	15,2	71	14,5	22,2
23	14	18,4	72	14,2	20,3
24	14	19,5	73	15,5	24,8
25	14,6	16,9	74	13,7	17,8
26	12,5	13,1	75	12,8	14,4
27	12,8	13,4	76	12,9	13,6
28	13,2	14,8	77	14	18,6
29	14,5	22,3	78	14,1	20,4
30	13,5	17,4	79	14,8	23,1
31	11,5	9,4	80	13,3	16,5
32	13,6	16,8	81	14,4	19,9
33	15,1	23,8	82	13,1	15,2
34	12,9	13,5	83	13,1	15,1
35	13,8	17,8	84	14,5	21,2
36	13,8	18,9	85	14,2	19,5
37	12,2	11,5	86	12,6	12,6
38	13,4	16,5	87	13,2	14,5
39	13,2	15,8	88	12,2	11,4
40	14,2	19,7	89	12,7	13
41	12,2	11,4	90	13,9	18,1
42	13,4	15,5	91	14	19,1
43	14,3	19,9	92	12	11,2
44	12,8	12,9	93	13	13,8
45	10,3	6,5	94	12,7	13,7
46	13,5	16,6	95	12,8	14,1
47	14,4	19,9	96	13,8	18,2
48	13,2	14,6	97	12,8	13,2
49	13,6	16,4	98	13,2	15,8

(Continuación).

Camarones para mapa (ADN purificado con resina).

#	ng/uL	C	TE	#	ng/uL	C	TE
1	196	82	118	53	269	59	141
2	229	70	130	54	218	73	127
6	279	57	143	55	263	61	139
7	225	71	129	56	245	65	135
11	233	69	131	57	372	43	157
13	260	62	138	59	218	73	127
14	271	59	141	60	196	82	118
15	426	38	162	61	274	58	142
16	148	108	92	62	400	40	160
17	268	60	140	63	102	157	43
18	477	34	166	64	176	91	109
19	296	54	146	65	381	42	158
20	465	34	166	66	278	58	142
21	287	56	144	67	188	85	115
22	298	54	146	68	223	72	128
23	332	48	152	69	220	73	127
24	411	39	161	70	198	81	119
25	375	43	157	71	459	35	165
26	412	39	161	72	386	41	159
27	211	76	124	73	199	80	120
28	247	65	135	74	303	53	147
29	410	39	161	75	192	83	117
30	379	42	158	76	363	44	156
32	238	67	133	77	255	63	137
33	438	37	163	78	385	42	158
34	156	103	97	79	438	37	163
35	289	55	145	80	296	54	146
36	222	72	128	81	282	57	143
37	162	99	101	82	178	90	110
38	179	89	111	83	204	78	122
39	288	56	144	84	348	46	154
40	116	138	62	85	328	49	151
41	167	96	104	86	172	93	107
42	208	77	123	87	483	33	167
43	193	83	117	88	356	45	155
44	282	57	143	89	326	49	151
45	300	53	147	90	227	70	130
46	234	68	132	91	340	47	153
47	397	40	160	92	194	82	118
48	250	64	136	93	243	66	134
49	282	57	143	94	168	95	105
50	186	86	114	95	378	42	158
51	302	53	147	96	404	40	160
52	193	83	117	97	283	57	143

Datos correspondientes a la tercera extracción

Continuación Anexo 1

MICROPLACAS CON MUESTRAS DE ADN (I EXTRACCIÓN)							
Female	Male	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28	29
31	32	33	34	35	36	37	38
39	40	41	42	43	44	45	46
47	48	49	50	51	52	53	54
55	56	57	58	59	60	61	62
63	64	65	66	67	68	69	70
71	72	73	74	75	76	77	78
79	80	81	82	83	84	85	86
87	88	89	90	91	92	93	94
95	96	97	98	99	100		

MICROPLACAS CON MUESTRAS DE ADN (II EXTRACCIÓN)							
Female	Male	1	2	3	4	6	7
8	9	10	11	12	13	14	16
17	18	20	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31	32	33	37
38	40	41	42	43	44	45	46
47	48	49	50	51	52	53	54
55	56	57	58	59	60	61	62
63	64	65	67	68	69	70	71
72	73	74	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88
89	90	91	92	Female	Male		

MICROPLACAS CON MUESTRAS DE ADN (III EXTRACCIÓN)							
Fema	Male	1	2	6	7	11	13
14	15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28	29
30	32	33	34	35	36	37	38
39	40	41	42	43	44	45	46
47	48	49	50	51	52	53	54
55	56	57	59	60	61	62	63
64	65	66	67	68	69	70	71
72	73	74	75	76	77	78	79
80	81	82	83	84	85	86	87
88	89	90	91	92	93	94	95
96	97	Fema	Male				

ANEXO 2

Método de extracción de ADN CTAB (Modificado Shahjahan *et al.* 1995).

- ❖ Colocar en un tubo eppendorf (de 1.5 mL) 5 μ L de proteinasa K (100 mg/mL).
- ❖ Adicionar 500 μ l de CTAB tampón y una muestra de tejido (50 - 100 mg).
- ❖ Mezclar por 5 segundos.
- ❖ Incubar en baño de maría a 66 °C por 2 horas.
- ❖ Macerar la muestra.
- ❖ Incubar en baño de maría a 66 °C por 8 horas.
- ❖ Adicionar 500 μ L de fenol-cloroformo.
- ❖ Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.
- ❖ Recuperar sobrenadante (350 μ L) en un nuevo tubo.
- ❖ Añadir cloroformo (igual cantidad de sobrenadante recuperado).
- ❖ Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.
- ❖ Tomar la fase acuosa y colocarla en un nuevo tubo.
- ❖ Añadir 500 μ L de isopropanol helado (precipitar el pellet).
- ❖ Colocar a -20 °C por 4 horas.
- ❖ Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.
- ❖ Retirar el isopropanol.
- ❖ Adicionar 500 μ L de etanol helado al 70% (lavar el pellet).
- ❖ Centrifugar a 14000rpm por 5 minutos.
- ❖ Retirar el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
- ❖ Disolver el pellet en 100 μ L de TE 1X.
- ❖ Preservar el DNA a -20 °C o a 4 °C.

ANEXO 3

Protocolo de purificación con resina (Wizard® PCR Preps DNA Purification System. Cat. # A7170).

- ❖ Para cada muestra de ADN, preparar una minicolumna Wizard®, una jeringuilla de insulina y un tubo eppendorf de 1.5 mL.
- ❖ Agregar 1mL de resina a 100µL de muestra (o más, dependiendo de la cantidad de ADN).
- ❖ Agitar en el vortex por un tiempo corto.
- ❖ Tomar la mezcla resina/ADN con la jeringuilla de insulina y depositarla dentro de la minicolumna.
- ❖ Para lavar la columna, agregar 2 mL de isopropanol al 80 % (o etanol al 100 %).
- ❖ Insertar la minicolumna dentro de un nuevo tubo de centrifuga. (cortar la tapa del tubo).
- ❖ Centrifugar la minicolumna (dentro del tubo) a 10000 rpm por 2 minutos para remover cualquier residuo de isopropanol.
- ❖ Dejar secar la resina a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- ❖ Transferir la minicolumna a un nuevo tubo de centrifuga. Aplicar 50 µL de agua milliQ estéril a 68 °C (desde el baño María) o TE buffer a la minicolumna y esperar 2 minutos (el ADN permanecerá intacto en la columna pasado 30 minutos).
- ❖ Centrifugar la minicolumna por 1 minuto a 12000 rpm para desprender los fragmentos de ADN y permitir que caigan al fondo del tubo de centrifuga.
- ❖ Remover y descartar la minicolumna. EL ADN purificado puede ser almacenado en los tubos de centrifuga a 4 °C o -20 °C.

ANEXO 4

GELES DE POLIACRILAMIDA (170 mL)

	4 %	6 %	8 %
Agua	114 mL	100 mL	89 mL
TBE	34 mL	34 mL	34 mL
Acrilamida	22 mL	34 mL	44,6 mL
APS	1,3 mL	1,4 mL	1,2 mL
Temed	76 μ L	70 μ L	64 μ L

GELES DE POLIACRILAMIDA (100 mL)

	4 %	6 %	8 %
Agua	67 mL	59 mL	53 mL
TBE	20 mL	20 mL	20 mL
Acrilamida	13 mL	20 mL	26 mL
APS	800 μ L	823 μ L	682 μ L
Temed	45 μ L	41 μ L	38 μ L

PROTOCOLO PARA PREPARAR ACRILAMIDA 30 % (Sambrook *et al.*, 1989)

Acrilamida.....	580 g.
Bisacrilamida.....	20 g.
Agua milliq.....	2 L.

Pesar la cantidad requerida de acrilamida y bisacrilamida. Disolver en agua milliq a 37 °C durante 30 - 40 minutos. Enrasar la solución a 2 L de agua, luego filtrarla y almacenarla en un recipiente de color ámbar.

Protocolo para preparar APS (Anmomiun per sulfate).

APS.....	5.0 g.
Agua milliq.	50 mL.

En un tubo Falcon colocar agua milliq, agregar los 5.0 gramos de APS, agitar hasta su completa disolución. Colocar 1.2 mL en cada tubo eppendorf y etiquetarlos.