

Desarrollo de marcadores genéticos tipo microsatélites en secuencias EST para mapeo genético en *Litopenaeus vannamei*

Juan Ortiz T.^{1,2} & Franklin Pérez²

^{1.} Universidad Técnica Pesquera de Astrakhán - Rusia. Dirección Actual: Escuela Politécnica del Ejército, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Proyecto de Acuicultura. E-mail: j_ortiz_tirado@hotmail.com .

^{2.} Área de Genética. Fundación CENAİM - ESPOL. E-mail: franklin@cenaim.espol.edu.ec.

RESUMEN

La identificación de microsatélites en secuencias EST y su homologación de *L. vannamei* contra el genomio de *D. melanogaster* mediante el minado de datos, generaron 286 pares de primers. La evaluación con especies de camarón (*L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. byrdi*), permitió obtener marcadores polimórficos para mapeo genético en *L. vannamei*. Un 3,8% de ESTs contenían repeats tipo microsatélite con frecuencia de 1 repetición cada 7,8 kb. Se diseñaron 286 primers para SSR - ESTs. Amplificaron 129 loci con SSR - ESTs. Alto porcentaje (56%) de EST - SSRs fueron transferibles dentro del género *Litopenaeus*. Evaluación de SSR- ESTs en animales silvestres, mostró que el 72% de los marcadores cumplen con el equilibrio Hardy-Weinberg, útiles en genética de poblaciones. El número de alelos fue de 2 - 24; en promedio 6,2. Adicionalmente, un set de 28 SSR-ESTs fueron evaluados por segregación mendeliana. Evidencia de alelos nulos se encontró en 5 de ellos. Alto porcentaje de marcadores SSR- ESTs monomórficos (44%) son polimórficos en análisis SSCP. Los microsatélites e intrones polimórficos obtenidos, pueden ser usados en mapeo genético y estudios de poblaciones en *L. vannamei*.

Palabras clave: *L. vannamei*, Marcadores moleculares, Microsatélites.

ABSTRACT

Public EST sequences available were analyzed for *L. vannamei* by data mining. The identification of SSR in ESTs sequences generated 286 primers which were evaluated against *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* and *T. byrdi*. Repeat motifs were found in 3.8% of the evaluated ESTs at a frequency of one repeat every 7.8 for SSR. A total of 125 loci with SSR - ESTs. High percentage (56%) of EST - SSRs were transferable within the genus *Litopenaeus*. More than half of the amplified products were polymorphic in a

small testing panel of *L. vannamei*. Evaluation of those primers in a larger testing panel showed that 72% of the markers fit the Hardy-Weinberg equilibrium, which shows their utility for populations' genetics analysis. The number of alleles ranged from 2 to 24 with an average of 6,2. Additionally a set of 28 SSR-ESTs were evaluated for mendelian segregation. Evidence for null alleles was found for 5 of them. A high percentage of SSR-ESTs monomorphic markers (44%) showed to be polymorphic by single strand conformation polymorphism analysis. Due to high number of ESTs available in public databases, the research and development of molecular markers in shrimp species could be a biotechnological alternative of high performance and low cost.

Key words: *L. vannamei*, Molecular markers, Microsatellite.

ISSN 1390-3004

Recibido: 23-12-2004

Aceptado: 17-01-2005

INTRODUCCIÓN

Marcadores moleculares codominantes (que permiten visualizar la segregación de genes aportados por el padre y la madre) tienen enorme importancia en la investigación genética actual. Este tipo de marcadores se utilizan para identificación de parentesco, mapeo genético para ubicar genes de interés comercial como responsables de crecimiento o resistencia a enfermedades, y para estudios de estructura genética de poblaciones (Giovambattista *et al.* 1998). Entre estos marcadores, los más importantes son los microsatélites e intrones. Los microsatélites son secuencias repetitivas de ADN, altamente variables (polimórficas), reproductibles y abundantes en el genomio. Los microsatélites pueden ubicarse dentro de los genes o fuera de ellos. Por otro lado los intrones son secuencias no codificantes y están ubicados en la parte interna de los genes (Russell 1992).

La presente investigación utilizó información de bases de datos públicos (NCBI y Marine Genomics) para generar marcadores tipo microsatélites e intrones útiles para mapeo genético en *L. vannamei*. Los objetivos del estudio fueron: desarrollar marcadores tipo microsatélite en *L. vannamei*, determinar polimorfismo de los microsatélites desarrollados, y demostrar la utilidad de los marcadores obtenidos para mapeo en *L. vannamei*

METODOLOGÍA

El análisis de secuencias públicas permitió generar 286 pares de primers los cuales se evaluaron y optimizaron en animales silvestres y en un set de mapeo de *L. vannamei* levantados en las instalaciones del CENAİM. De estos se propuso obtener un 10% de marcadores polimórficos para mapeo genético.

Los 286 primers se probaron para amplificación mediante PCR, utilizando animales silvestres (*L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. byrdi*) y progenitores (*L. vannamei*) de una familia para mapeo genético.

Polimorfismo y número de alelos fueron evaluados para cada primer. Primers monomórficos (presentan una sola banda) se corrieron con una técnica de alta discriminación, conocida como SSCP, para determinar si presentan variabilidad. Primers polimórficos en los progenitores de la familia de mapeo, fueron amplificados para determinar segregación mendeliana. Adicionalmente se verificó la utilidad de genes, mediante un análisis por homologación de marcadores amplificados (BLAST).

RESULTADOS Y DISCUSION

Microsatelites (SSR) en Secuencias EST.- La investigación inicial *in silico* arrojó una frecuencia de repetición cada 7,8 kb en una corrida de 2.227 kb de secuencias EST de *L. vannamei*. La frecuencia de SSR en librerías genómicas de *L. vannamei* varía de acuerdo al número de patrones, 1 cada 1,43 kb y 1 cada 206 kb (Meehan *et al.* 2003). La alta frecuencia de bases repetidas tipo microsatélites en secuencias EST encontradas demuestran la vialidad, al compararlas con librerías genómicas en *L. vannamei*, para desarrollar marcadores moleculares tipo microsatélites en secuencias EST a gran escala.

Las bases repetidas más frecuentes de ESTs en *L. vannamei* corresponden a trinucleótidos, seguidos por repeticiones mononucleótidas (Tabla 1). Estos resultados se contrastan con reportes de otras librerías genómicas y especies de camarón peneidos, donde las bases repetidas dominantes son de características dinucleótidas (Meehan *et al.* 2003, Wuthisuthimethavee *et al.* 2003, Tassanakajon *et al.* 2003). Diferencias en la exploración de datos y utilización de métodos tales como la rigurosidad para declarar un microsatélite y el nivel de tolerancia para una base no perfecta, explican éstas diferencias.

Tabla 1. Patrones de SSR – ESTs encontrados por exploración de datos en *Litopenaeus vannamei*.

TIPO DE PATRÓN	No. de ESTs	No. Diferente de Patrones	Tres o más frecuencias de Patrones	No. de Repeticiones	
				MIN	MAX
MONONUCLEÓTIDOS	69	3	T(66); A(1); C(2)	15	55
DINUCLEÓTIDOS	60	10	AT(14); GT(13); AG(12)	8	143
TRINUCLEÓTIDOS	74	30	ATT(10); GCT(8); CTT(7)	5	25
TETRANUCLEÓTIDOS	38	27	AAAG(4); ATTT(4); TACA(3)	4	30
PENTANUCLEÓTIDOS	43	19	AAAAT(6); AGGTT(5); GTTTT(4)	3	14
TOTAL PATRONES	284	89			

El aislamiento de SSR en *L. vannamei* muestra rendimientos variables. En el presente trabajo se diseñó 286 pares de primers en secuencias EST, generando

129 amplificaciones por PCR. El número de marcadores polimórficos obtenidos fue del 56%. Los resultados del diseño de primers, reflejados en marcadores polimórficos fue del 23% en *L. vannamei*. Los datos sobre polimorfismo, de la investigación inicial, deben ser juzgados cuidadosamente, ya que los productos obtenidos fueron investigados y corridos en un pequeño panel de prueba que consistió en 6 individuos de *L. vannamei*.

Primers diseñados para *L. vannamei* en la presente investigación, tuvieron una tasa de éxito en amplificación por PCR del 41% (118 de 286 pares de primers). Tong *et al.* (2002) obtuvo un 72% de tasa de éxito en la amplificación de primers basados en secuencias EST en *P. monodon*. Para la identificación de ESTs a gran escala en humanos (Beasley *et al.* 1998), tomaron en consideración parámetros importantes para el diseño de primers con el fin de optimizar las amplificaciones de PCR. Tres parámetros importantes son utilizados en el diseño de primers: longitud del primer, contenido de GC, y AT con tendencia de GC hacia la terminal 3'. Estos parámetros permitieron el incremento dramático en las tasas de éxito de PCR. En el presente estudio, el conjunto de primers diseñados tuvo un contenido de GC entre el 40 y 60% y una mínima estabilidad en la región 3' terminal. Sin embargo los primers diseñados cortos (17,1 bp de longitud promedio) fueron diseñados gracias al software utilizado. Es posible que primers de corta longitud, puedan ser responsables de un porcentaje de primers fallidos, lo que explicaría una tasa de éxito menor al comparar los resultados aquí reportados con otros de la literatura.

Una ventaja teórica de marcadores SSR desarrollados a partir de secuencias EST es la alta transferibilidad entre especies relacionadas. Los marcadores EST-SSRS, que amplificaron en *L. vannamei* el 21 y 69%, también amplificaron en *L. stylirostris* y *T. byrdi* respectivamente. Aun cuando la transferibilidad de marcadores desarrollados a partir de microsatélites genómicos en camarón puede ser probado a gran escala (Ball *et al.* 2003, Ponsomboona 2000, Xu *et al.* 2003). En el screening inicial se encontró que 10 primers, diseñados para *L. vannamei* basados en secuencias EST de esa especie, no amplificaron para camarón blanco pero presentó resultados positivos y amplificación por PCR en *L. stylirostris* y *T. byrdi*. Una posible explicación para este hecho es la presencia de intrones, los cuales impiden la amplificación en PCR debido a la presencia de zonas intrónicas grandes. Estos marcadores son equivalentes a marcadores EPIC, producto del diseño de primers que flanquean secuencias intrónicas (Bierne *et al.* 2000).

Para una identificación con alta resolución en genética de poblaciones, se requiere de gran cantidad de marcadores moderadamente polimórficos. En este trabajo se evaluó la utilidad de los marcadores EST-SSRS mediante el equilibrio Hardy - Weinberg (HWE) con 59 primers en un panel de prueba con animales silvestres. De los 59 primers probados, 47 amplificaron satisfactoriamente en PCR.

Un alto porcentaje de primers evaluados (72%) no muestran diferencias significativas del HWE en un valor α de 0,01. Un reporte de observación en *L. setiferus* 5 de 6 microsatélites mostraron una desviación significativa de HWE, lo que se explica por la presencia de alelos nulos y el efecto Wahlund (Ball *et al.* 1998).

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

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

EST-SSRs y otros marcadores basados en PCR pueden revelar polimorfismo extra mediante análisis con SSCP cuando la electroforesis convencional (PAGE) falla. Esta variabilidad corresponde a polimorfismo de nucleótidos simples -Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-, mientras que el PAGE descubre polimorfismos de longitud. En este trabajo encontró que 44% de marcadores de EST-SSRs que eran monomórficos en la investigación inicial por PAGE, fueron polimórficos al momento de realizar el análisis de SSCP. La presencia de 8 marcadores mostraron bandas diferenciadas entre parentales del panel de mapeo, lo que indica la utilidad de estos marcadores EST en un mapa genético.

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

CONCLUSIONES

1. La información disponible de secuencias EST en el caso de *L. vannamei* es útil para la generación de marcadores EST-SSR, EST-SSCPs .
2. La exploración de datos para EST-SSR reduce los costos operativos asociado con las etapas iniciales para el desarrollo de marcadores moleculares, es decir la construcción de la denominada librería genómica y su secuenciación.
3. Debido a que los marcadores EST-SSR, SSCP-SSR se derivan directamente de la expresión de genes, la identidad del producto y la función pueden ser identificadas por la comparación con bases de datos de proteína, generando marcadores tipo I.
4. Se ha demostrado que los marcadores EST-SSRS son transferibles entre especies, es decir que el costo neto por marcador desarrollado, será aún más bajo si estos son utilizados en especies diferentes.
5. El uso del análisis de SSCP permite revelar el polimorfismo a nivel de un solo nucleótido (SNP), aumentando aún más el porcentaje de marcadores útiles tipo EST-SSR.
6. Los marcadores desarrollados en esta investigación son polimórficos y útiles en genética de camarones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue desarrollado bajo el auspicio directo de la Cooperación Técnica Belga y la Escuela Politécnica del Litoral, en el Programa de la Maestría en Ciencias, especialidad Acuicultura Marina. Y, finalmente, agradecemos a los revisores anónimos por las sugerencias al presente artículo.

REFERENCIAS

- Ball, P.B. & R.M. Chapman.** 2003. Population genetic analysis of white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, using microsatellite genetic markers. *Molecular Ecology* 12: 2319-2330.
- Beasley, E.T., E.R. Myers, D.U. Coxand & L.T. Lazzeroni.** 1998. Statistical refinement of primer design parameters. Pp. 55-71. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand & J.J. Sninsky. (Ed.) *PCR applications: protocols for functional genomics*. Academic Press. San Diego, CA.
- Bierne, N.E., E.F. Lehnert, E.T. Bedier, F.B. Bonhommeand & S.T. Moore.** 2002. Screening for intron-length polymorphisms in Penaeid shrimps using exon - primed intron-crossing (EPIC)-PCR. *Molecular Ecology* 9: 233 -235.
- Giovambattista, G.M., M.T. Ripoli, J.V. Lirón, M.S. Kienast, E.N. Villegas, F.G. Castagno & P.C. Peral.** 1999. Aplicación de las Técnicas de Polimorfismo de DNA en la resolución de casos de Abigeato, identificación individual y determinación de Paternidad. *Analecta veterinaria* 21(1): 5-11.

- Maggioni, R.A., A.P. Rogers & N.T. Maclean.** 2003. Population structure of *L. schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite *loci*. *Molecular Ecology* 12: 3213- 3217.
- Marine Genomics :** www.marinegenomics.org
- Meehan, D.E., Z.T. Xu, G.U. Zúñiga & A.R. Alcívar - Warren.** 2003. High frequency and large number of Polymorphic microsatellites in cultured shrimp *Penaeus (Litopenaeus vannamei)* (Crustácea: Decapoda). *Marine Biotechnology* 5: 311-330.
- NCBI:** www.ncbi.nlm.nih.gov.
- Pongsomboona, S.C., V.T. Whanb, S.B. Mooreb & A.T. Tassanakajon.** 2000. Characterization of tri- and tetranucleotide microsatellites in the black tiger prawn, *Penaeus monodon* . *Science Asia* 26 : 1-8.
- Russell. P.A.** 1992. *Genetics*. 3rd ed. Harper Collins Publishers.
- Tassanakajon, U.T., T.K. Tiptawonnukul, P.T. Supungul, V.R. Rimphanitchayakit, D.C. Cook, P.J. Jarayabhand, S.N. Klinbunga, & V.R. Boonsaeng.** 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7(1): 55 - 61.
- Tong, J.S., S.B. Lehnert, K.B. Byrne, H.K. Kwan, & K.C. Chu.** 2002. Development of polymorphic EST markers in *Penaeus monodon*: applications in peneid genetics. *Aquaculture* 208: 69 -79.
- Wuthisuthimethavee, S.P., P.L. Lumubol, A.V. Vanavichit & S.T. Tragoonrung** 2003. Development of microsatellite markers in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Aquaculture* 224: 39-50.
- Xu, Z.X., A.D. Dhar, J.W. Wyrzykowski, A. Alcivar-Warren & J.P. Primavera.** 2003. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines using microsatellite. *Aquaculture* 199: 13-40.