

Desarrollo de marcadores genéticos tipo intrones para *Litopenaeus vannamei*

Juan Ortiz T.¹ & Franklin Pérez U.²

1. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento Ciencias de la Vida, Carrera de Ciencias Agropecuarias (IASA I). Sangolquí-Ecuador. PBX. 171-5-231-B. e-mail: jcortiz@espe.edu.ec
 2. ONELAB. Laboratorio para genética del camarón blanco. E-mail: fperez@hotmail.com
-

RESUMEN

Mediante el minado de datos (Data Mining), se analizaron secuencias EST públicamente disponibles para *L. vannamei*. Se generó ciento setenta y tres primers para intrones previa homologación con 7.439 secuencias de ESTs y cDNA contra el genomio de *D. melanogaster*. Se obtuvieron 53 loci con intrones. Un alto porcentaje de intrones (38%) fueron transferibles dentro del género *Litopenaeus*. Adicionalmente un set de 17 intrones fue evaluado por Segregación Mendeliana. Un moderado grupo de intrones (25%), mostraron ser polimórficos en un análisis de SSCP. Intrones polimórficos obtenidos en ésta investigación podrán ser usados en mapeo genético y estudios de poblaciones tanto en *L. vannamei* como en otras especies de camarón.

Palabras clave.- Marcadores genéticos, intrones, camarón blanco.

ABSTRACT

Through out of the one mined of data (Mining Dates), it was analyzed sequences (EST) openly available for *L. vannamei*. One Hundred seventy three primers was generated for previous intrones approval with 7.439 sequences of ESTs and cDNA against the genomio of *D. melanogaster*. 53 loci was obtained with introns. A high percentage of introns (38%) was transferable inside the I generate *Litopenaeus*. Additionally a Set of 17 introns was evaluated by Mendeliana Segregation. A moderate group of introns (25%), showed to be polimorfics in an analysis of SSCP. The polymorfics Introns obtained in this investigation might be used in genetic mapped and populations' studies of *L. vannamei* like as well in other shrimp species.

Words key. - Genetic markers, introns, white shrimp.

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.*, 2001).

Los marcadores moleculares están clasificados en dos tipos: marcadores de tipo I con identidades funcionales y marcadores tipo II con funciones desconocidas (O'Brien, 1991). Los marcadores tipo II se han desarrollado exitosamente (Alcívar-Warren *et al.*, 2001; Davis & Hetzel, 2000; Russell, 1992; Van der Werf *et al.*, 1989; Tassanakajon *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 2003; Espinoza *et al.*, 2001; Giovambattista *et al.*, 2001; Bierne *et al.*, 2000).

Los marcadores Tipo I (intrones) sirven como puntos de anclaje que permiten la transferencia de información genética entre diferentes cruces o familias. Marcadores con funciones conocidas pueden estar relacionados o ser responsables de caracteres de interés productivo como crecimiento o resistencia a enfermedades.

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

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

La presente investigación utilizó información de bases de datos públicos (NCBI y Marine Genomics) para generar marcadores intrónicos útiles para mapeo genético en *L. vannamei*. El Estudio fue desarrollado bajo el auspicio directo de la Cooperación Técnica Belga y la Escuela Politécnica del Litoral, a quienes reiteramos nuestros agradecimientos.

Objetivos: Desarrollar marcadores tipo intrones en *L. vannamei*; determinar polimorfismo de los marcadores intrónicos desarrollados; demostrar la utilidad de los marcadores obtenidos para mapeo en *L. vannamei*

MATERIALES Y METODOS

Secuencias tipo ESTs de *L. vannamei* que no contenían microsátélites, fueron comparados contra el genomio completo de *D. melanogaster* para determinar genes homólogos y posición de intrones. Las secuencias con alta similitud a genes de *D. melanogaster* sirvieron para el diseño de primers en áreas intrónicas, y anotados para mosca de la fruta. Estos primers fueron diseñados con el software Primer Premier.

El análisis de secuencias públicas permitió generar 459 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 459 primers se probaron en animales silvestres (*L.vannamei*, *L stylirostris*, *F. californiensis*, *F.duorarum* y *T. byrdi*) y progenitores (*L.vannamei*) de una familia para mapeo genético, utilizando la técnica de PCR. Polimorfismo y número de alelos fue evaluado 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 DISCUSIÓN

MARCADORES INTRÓNICOS

En nuestro panel de prueba para intrones, utilizamos un grupo multiespecies: *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. birdy*. El porcentaje de amplificación fue de 32, 38, 41, 42 y 31% (Anexo 1) respectivamente, reflejándose la universalidad de los marcadores tipo I en resultados similares (Bierne *et al.*, 2000; Liu *et al.*, Touriya *et al.*, 2003).

Los intrones amplificados en el barrido inicial mostraron un 40% (n = 21) de polimorfismo en el panel de mapeo de *L. vannamei* con rangos entre 2 - 4 alelos polimórficos mediante análisis convencional de PAGE. El 60% de primers monomórficos restantes de *L. vannamei* (set) fueron probados con la técnica SSCP, de los cuales, 7 juegos mostraron polimorfismo. Estos primers se probaron en un pequeño panel de prueba para Segregación Medeliana y en el proyecto "Mapa genético de *L. vannamei*" que se llevó a cabo en el laboratorio de Genética del CENAİM.

Diez y siete primers (32 %) demostraron su utilidad para mapeo. En estudios de poblaciones de *P. monodon* y *L. vannamei* se ha demostrado que secuencias intrónicas tienen alta heterocigocidad, y son polimórficos con tamaños entre 2 - 6 alelos, dentro de la especie y entre especies (Bierne *et al.*, 2000; Duda & Palumbi, 1999) .

Los primers diseñados en esta investigación para *L. vannamei* son transferibles a otras especies de crustáceos. Los resultados de este estudio demuestran la transferibilidad de marcadores de *L. vannamei* a otras especies (*L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum*, y *T. byrdi*) en proporción variable. La universalidad y transferibilidad de primers intrónicos ha sido demostrada previamente en Teleosts y en peneidos (Bierne *et al.*, 2000; Touriya *et al.*, 2003; Duda & Palumbi, 1999).

Anexo 1. Marcadores intrónicos e información de polimorfismo en *Litopenaeus vannamei* en un panel de prueba constituido por *L. vannamei* de un set de mapeo y animales silvestres: *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. birdy*. Se presenta el tamaño de banda y número de alelos observados.

LOCUS	ENTRY	PRIMERS 5'- 3'	EXPECTED	<i>L. vannamei</i> <i>parentales</i>	<i>L.</i> <i>vannamei</i>	<i>L.</i> <i>stylirostris</i>	<i>F.</i> <i>californiensis</i>	<i>F.</i> <i>duorarum</i>	<i>T.</i> <i>byrdi</i>
CNM-MG 620	>2026van	ATCACTACCAGCAAGGAC AGTCGGATGGGTTCCT	97	97(1)	97(1)	97(1)	97(1)	97(1)	
CNM-MG 622	>2044van	ATGGTTAGGGTGGACAAAT ACGCAGGCTCATAACGG	144	145(1)	145(1)	144(1)	145(1)	144(1)	
CNM-MG 624	>2072van	GGGTGCGGGTTTCTTGGTGA GGAAGGGGAAGGGAAGGGTIG	77	77(1)	77(1)	77(1)	77(1)	77(1)	77(1)
CNM-MG 626	>2097van	TGCGTGATGGATGGACTTAG CGTAACAAGAGGGAATTATGGA	267				563-569(2)	543-550(2)	
CNM-MG 630	>2290van	TTATGTATCCAAGGAGGCT ACCATTCTGTCTGATAGTC	269	405(1)	405(1)	410(1)	408(1)	398-407(2)	
CNM-MG 631	>2335van	GCTGCTGGATCTCGAT AAGGATGGGGTAGTGG	169	153(1)	153(1)	153(1)	153(1)	153(1)	
CNM-MG 633	>2504van	ATTCCAGGGTGGCACITTTCT TTAGGGTAACCGACATTATTG	203	476-478(3)	478-480(3)	486(1)	465-506(4)	490-494(3)	
CNM-MG 639	>2925van	GACGTGGACCTAAGAAG TATCAGCGGAGGAAGT	187	300-305(3)	300-305(2)	298(1)	312(1)	311(1)	
CNM-MG 644	>3899van	CTGAACCAGGATAAGGG TGATGATACGTGGGAAGA	91	275-281(2)	269-276(4)	283(1)	277-289(3)	267(1)	
CNM-MG 645	>3925van	AGCGAAAGTCGTCCCTAG TCATGCTCAGCGTGGC	97	98(1)	98(1)	98(1)	98(1)	98(1)	
CNM-MG 652	>4045van	AATGACCIGTCTCTTGIGA CGTGGTGTTCGGCTAC	206	474-487(2)	474-487(3)	484-495(3)	471-478(2)	469-477(2)	

Anexo 1. Marcadores intrónicos e información de polimorfismo en *Litopenaeus vannamei* en un panel de prueba constituido por *L. vannamei* de un set de mapeo y animales silvestres: *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. biridi*. Se presenta el tamaño de banda y número de alelos observados. (Continuación)

LOCUS	ENTRY	PRIMERS 5'-3'	EXPECTED	<i>L. vannamei</i> <i>parentales</i>	<i>L.</i> <i>vannamei</i>	<i>L.</i> <i>stylirostris</i>	<i>F.</i> <i>californiensis</i>	<i>F.</i> <i>duorarum</i>	<i>T.</i> <i>byrdi</i>
CNM-MG 656	>4098van	GCGGTGCTGCATCATCAAAA CGCTTCAAGGGCCAGTATCTT	158	289-304(2)	289-304(3)	286-291(3)	267-301(4)	267-265(4)	
CNM-MG 657	>4108van	AATTTCTCCGAGAAGGTGC GAGGAAGCCAAGGGTATTG	212	349-370(2)	349-370(3)	344-350(4)	324-359(4)	323-332(4)	
CNM-MG 658	>4111van	CATGCGCCAGTAGTTTCAT GCATAACGACGCTGGTGAAT	155	271-313(4)	300-318(3)	287-292(2)	284-287(2)	274-284(3)	
CNM-MG 662	>4145van	TAAACAGGGCGCAGTTCGAG AAGCAGCTTCCCTTGIGAG	112	361(1)	361(1)	357-364(4)	361-363(2)	353(1)	
CNM-MG 664	>4175van	CATCCATCGCATCCGTATTA GATCCCAGGCTTGGAAACC	188				677-706(2)	650-692(3)	
CNM-MG 667	>4230van	CTGGTGCTGTTCGACAAGGC GGTGTAACGAGCTGGGCAT	192	390-395(2)		370-390(2)	384-390(2)	383-415(4)	396- 416(2)
CNM-MG 668	>4247van	GCAGAACGACGCTGGTGAAT CCTGATGTCTCCGCAGATGG	178	321-366(4)	364-373(2)	338-344(3)	342-348(2)	321-341(3)	375(1)
CNM-MG 669	>4252van	CCACCGTCCCAGGTAAAGA ACCAACGACACCAACGCAGA	202			680(1)	671-688(4)	601-704(3)	
CNM-MG 670	>4260van	CAGAGCAAGCGGTACTCCAC GAACCAAGCGACGAAGCAGA	223					185(1)	
CNM-MG 673	>4315van	CGTACTCATCGGAGACGAGAT ACCGTACTGTAAAGAACAAGCC	168	146(1)	146(1)	146(1)	146(1)	146(1)	146(1)
CNM-MG 674	>4350van	TGACAAATGCTCGGCCAAA GCACCTCACCGCTTCTCG	230			599-691(3)	672-692(4)	661-706(3)	

Anexo 1. Marcadores intrónicos e información de polimorfismo en *Litopenaeus vannamei* en un panel de prueba constituido por *L. vannamei* de un set de mapeo y animales silvestres: *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. birdi*. Se presenta el tamaño de banda y número de alelos observados. (Continuación)

LOCUS	ENTRY	PRIMERS 5'-3'	EXPECTED	<i>L. vannamei</i> <i>parentales</i>	<i>L.</i> <i>vannamei</i>	<i>L.</i> <i>stylirostris</i>	<i>F.</i> <i>californiensis</i>	<i>F.</i> <i>duorarum</i>	<i>T.</i> <i>byrdi</i>
CNM-MG 675	>4366van	TACGACCAAATCCTGACACTAA GAACAAAGATGGCAGGATAA	287			600-608(3)	489-513(3)	519-524(2)	523(1)
CNM-MG 677	>4378van	CGCCACAGTGGTCGGATTTT CCTGATGGTGGGGTTGGATG	196	335-345(2)	335-346(3)	349-351(2)	352-373(4)	351-361(3)	
CNM-MG 679	>4398van	GTTGGTGAGGCGGATTGAGA GTTATGGTTCAGCCAAGAGG	216	348-372(2)	348-372(3)	353-358(3)	290-358(3)	334-372(3)	
CNM-MG 681	>4411van	GAGCCITTCATTTCCTTTAT ACATCATCTCCGTGTCIGGT	251			236(1)	682-691(2)	692(1)	783(1)
CNM-MG 682	>4432van	ACCAGCAAAGAAGCAGAAGG ATGGCTGATTCAGTGGTGAG	342			675-687(2)	675-689(2)	692-710(4)	
CNM-MG 689	>4511van	TCGGCCCAAGAACTATGAC TTCTCCTTAGCCTCGTCAAT	133			131(1)			174(1)
CNM-MG 690	>4641van	TGGGAATGGTAGTTCGCAGGAA							
CNM-MG 695	>4735van	GTGCCGCCACCCAGTTCTT CATCGCATCCGTATTACCCCT	154	262-266(2)	262-266(2)	266(1)	268(1)	269-280(3)	345- 377(2)
CNM-MG 699	>4760van	GTCTTGGAACCCTCACCACA CAAGCACTCGATGAACCCTT	176				693-735(3)	666-710(3)	407(1)
CNM-MG 700	>4820van	GTCCAGTTCCTCATCTCCT TCACCAAGAAACCCGCACCC	198	359-366(3)	363-402(2)	350-385(4)	356-363(2)	356-363(2)	385- 443(2)
		GATCGCTGACGCTGAACACG	154	475(1)	474(1)	460-475(2)	350-525(4)	350-509(4)	269- 509(4)

Anexo 1. Marcadores intrónicos e información de polimorfismo en *Litopenaeus vannamei* en un panel de prueba constituido por *L. vannamei* de un set de mapeo y animales silvestres: *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. birdy*. Se presenta el tamaño de banda y número de alelos observados. (Continuación)

LOCUS	ENTRY	PRIMERS 5'-3'	EXPECTED	<i>L. vannamei</i> <i>parentales</i>	<i>L.</i> <i>vannamei</i>	<i>L.</i> <i>stylirostris</i>	<i>F.</i> <i>californiensis</i>	<i>F.</i> <i>duorarum</i>	<i>T.</i> <i>byrdi</i>
CNM-MG 701	>4830van	CGGCAAATGGTCCCTAGATG							
		GGAAACGCTTGGCAGCATAA	125	198-241(2)	202-241(2)	240(1)	241-247(2)	249(1)	246-254(2)
CNM-MG 704	>4864van	TATCCGTCACAGCGTCCACA							
		GACCCAGAAGAAGTACAAGG	151			488-492(2)	492-494(2)	465-474(2)	482-491(2)
CNM-MG 712	>4945van	TTGGCGTGAAGTTTCTCAT							
		CAAACACCGCAAGCACCTG	142	260(1)	260(1)	258-270(3)	265(1)	263(1)	225-254(2)
CNM-MG 716	>4995van	AACAAGAGGGAATTATGGATTG							
		GTGCGTGATGGATGGACTTA	265				546(1)	527-532(2)	445-478(4)
CNM-MG 717	>5002van	GAAGGTGGTCTTGAGGAGCA							
		AGATATCCGTCACAGCGTCC	92	436-444(4)	445(1)	435-444(3)			427-445(3)
CNM-MG 720	>5035van	CAGGAAGTCAGAAGTAGAGTA							
		CATCAGGATTCTATTTCAGTT	182	183(1)	183(1)	183(1)	183(1)	183(1)	183(1)
CNM-MG 723	>5042van	ATGTCGGGAGGATTAAGTGT							
		ATGGGATCAGTCACCACAAG	383	376(1)	376(1)		726(1)	713-726(2)	475-712(2)
CNM-MG 726	>5078van	ACCTGGTAGGCAACAAGGGA							
		GCCTCGGTAAACATTGTGAAG	173	492(1)	491-493(2)		491-502(3)	494-526(3)	176(1)
CNM-MG 727	>5080van	TGTTTCCAGTACGGTTTCTTA							
		CACAAGACTTTCCGCATTAA	110	92(1)	92(1)	92(1)	92(1)	92(1)	91(1)
CNM-MG 729	>5101van	CATCAGCAGACATGCAGGGA							
		TCCAGATCGGCTCAAGAAC	184			164(1)			

Anexo 1. Marcadores intrónicos e información de polimorfismo en *Litopenaeus vannamei* en un panel de prueba constituido por *L. vannamei* de un set de mapeo y animales silvestres: *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. birdy*. Se presenta el tamaño de banda y número de alelos observados. (Continuación)

LOCUS	ENTRY	PRIMERS 5'-3'	EXPECTED	<i>L. vannamei</i> <i>parentales</i>	<i>L.</i> <i>vannamei</i>	<i>L.</i> <i>stylirostris</i>	<i>F.</i> <i>californiensis</i>	<i>F.</i> <i>duorarum</i>	<i>T.</i> <i>byrdi</i>
CNM-MG 732	>5132van	TACGACCAAATCCTGACACTAA CCAAACAGCCTAACTCTGCC	166	148(1)	148(1)	148(1)	148(1)	148(1)	148(1)
CNM-MG 738	>5173van	AACAACCTGGTGTCTGTCGA ACTTGGTGGTCCIGGTGTAA	211	446(1)	446(1)	417-447(3)	435-490(3)	458-495(3)	417- 444(2)
CNM-MG 740	>5181van	CTAAACAGCCCTCCAAGCAG AACTTGTACGGACCTTCC	100	85(1)	85(1)	85(1)	85(1)	85(1)	
CNM-MG 742	>5212van	CATGACATGCTGGCTTGGGTC CTTGAAGGCTGCTTGGAGTG	198	354-367(3)	357(1)	357(1)	364(1)	341(1)	341- 384(3)
CNM-MG 746	>5248van	AGAAGGGTTGCTTTCCAGAT AGGGTGGACAAATCAACATG	235	214(1)	214(1)	214(1)	215(1)	216(1)	217(1)
CNM-MG 747	>5262van	AACTTGCAGGCAATGTGAGC CTTCCGACTCGAAGAACGAC	158	138(1)	138(1)	138(1)	138(1)	138(1)	138(1)
CNM-MG 748	>5266van	GCGGGTATGGCCTTCTGATC GTTCGAGCTTGGTCGTCCTG	164						191- 201(2)
CNM-MG 750	>5290van	TACGACCAAATCCTGACACTAA CCAAACAGCCTAACTCTGCC	166	149(1)	149(1)	149(1)	149(1)	149(1)	149(1)
CNM-MG 754	>5296van	GTCCTGCACATGACGATGCT GGCTGCTCGGAGACAAGTAA	212						278- 373(3)
CNM-MG 757	>5324van	AAC TGCCCGAAATGCGACAA TCATGCTCAGCGTGGCTTCC	134	148(1)	150(1)	144(1)			151(1)
CNM-MG 759	>5336van	CAGTGTCTCCCTCCCTCGTAA CAGTTCACCCGTATCCTTCA	267				250-281(3)	250-281(3)	

Anexo 1. Marcadores intrónicos e información de polimorfismo en *Litopenaeus vannamei* en un panel de prueba constituido por *L. vannamei* de un set de mapeo y animales silvestres: *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. birdy*. Se presenta el tamaño de banda y número de alelos observados. (Continuación)

LOCUS	ENTRY	PRIMERS 5'- 3'	EXPECTED	<i>L. vannamei</i> <i>parentales</i>	<i>L.</i> <i>vannamei</i>	<i>L.</i> <i>stylirostris</i>	<i>F.</i> <i>californiensis</i>	<i>F.</i> <i>duorarum</i>	<i>T.</i> <i>byrdi</i>
CNM-MG 760	>5355van	CACGGTCATGGCCGTATCGG							
		GTGTTGGGCTTGGCGIGGAA	152	530(1)	529-543(2)	532-543(2)	539-547(2)	537-540(2)	483- 596(3)
CNM-MG 761	>5363van	GACCGCTTCGTCAAAGTAAA							
		TGAAACCATTAGGGAGCATG	148	410(1)	409(1)	397-405(2)	408(1)	397-406(3)	369- 403(3)
CNM-MG 762	>5366van	AATGGCAATCAACCACTTA							
		TATCAATACCCTTGGGCTTC	125	384(1)	384(1)	366-379(3)	380-393(3)	375(1)	375- 379(2)
CNM-MG 763	>5382van	GTGTCCTGGGAGCTGGAGTGG							
		GGACGGGTGCCCTGTAGGTT	176	430-447(3)	429-464(3)	403-409(2)	593-619(3)	569-590(3)	491- 700(4)
CNM-MG 764	>5401van	TCTGTGGAATTCTCACCCCAAG							
		GAAGCACTGACGGCACATCA	115		151(1)	147(1)	142-155(3)	148-361(3)	127- 362(3)
CNM-MG 766	>5410van	GTCTTGGAAACCCTCACCACA							
		CATCGCATCCGTATTACCCT	195				697(1)	637-686(3)	403(1)
CNM-MG 767	>5520van	CITGACATTCTCGTCCTTGC							
		TCTTGGCGTGACCTTCCTCT	194	173(1)	173(1)	173(1)	173(1)	173(1)	173(1)
CNM-MG 770	>6165van	GAAGCCAGGTATGGTTGTCA							
		GCTTCAGATCCTTCACCGAC	168	149(1)	149(1)	149(1)	149(1)	149(1)	149(1)
CNM-MG 772	>6181van	CTACCATTTCCTCGTCCATA							
		CTCTGATGACGGCTACCTTA	180	297-300(2)	295-297(2)	282-294(2)	301-316(2)	294-352(4)	283- 292(2)
CNM-MG 775	>6363van	GGAGTTGTGAAGTCAGGGTT							
		AACAGCAAAGGCAGTCAAGG	238				170(1)	170(1)	158(1)

Anexo 1. Marcadores intrónicos e información de polimorfismo en *Litopenaeus vannamei* en un panel de prueba constituido por *L. vannamei* de un set de mapeo y animales silvestres: *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. birdi*. Se presenta el tamaño de banda y número de alelos observados. (Continuación)

LOCUS	ENTRY	PRIMERS 5'-3'	EXPECTED	<i>L. vannamei</i> <i>parentales</i>	<i>L.</i> <i>vannamei</i>	<i>L.</i> <i>stylirostris</i>	<i>F.</i> <i>californiensis</i>	<i>F.</i> <i>duorarum</i>	<i>T.</i> <i>birdi</i>
CNM-MG 778	>6658van	GAGACCTCTGCCAAGACCCG							
		CAATCCTAACCTTCCCACGA	100	330-332(2)	330(1)	380-387(2)	340-351(4)	353(1)	266-531(3)
CNM-MG 779	>6662van	TGAAGAGGTCAGGGCAAGA							
		ATGTGCTGGGCATAGGCAGT	213			592-597(2)		588-608(3)	589-612(2)
CNM-MG 780	>6823van	AGGCTGGCTGACCTGATGGA							
		GCGAAGATTGCGAATACAAA	123	514-516(2)	510-531(2)	479-485(3)	517-521(2)	505-519(3)	484(1)
CNM-MG 781	>6975van	TCCACGGTTACGTCCTTGTC							
		CAGCCTTCCACATCTCAGCA	198	386-394(2)	385-387(2)	388(1)	389(1)	394-396(2)	389(1)
CNM-MG 782	>7060van	ATTGATGAAGCTGACCGGATTT							
		TCTAGGCCCTCTACCGTTGC	209	368-371(2)	370-380(2)	367-373(3)	377-410(2)	375-378(2)	497(1)
CNM-MG 783	>7197van	ACCGAAAGATTTCTGACCAT							
		TCAGTGTGGCTTGATGCTC	270			579-594(3)	599(1)		557-589(2)
CNM-MG 784	>7297van	CAAGGGAGTTGGTTGGGAGA							
		GAATGTCTGGGTAGCGTGGG	264	562-636(2)		549(1)	564-574(2)	546(1)	445-516(3)
CNM-MG 785	>7435van	GTCCTCAATCGCAGAAACAA							
		TGGAATCATTACGGGCAAA	200	200(1)	201(1)		201(1)	201(1)	
CNM-MG 786	>7488van	AGACCAGGGCTTGTGTGCG							
		GTGGGTGCTGAGAATAGTG	226			639(1)	607-616(1)	597(1)	638(1)

Anexo 1. Marcadores intrónicos e información de polimorfismo en *Litopenaeus vannamei* en un panel de prueba constituido por *L. vannamei* de un set de mapeo y animales silvestres: *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum* y *T. birdi*. Se presenta el tamaño de banda y número de alelos observados. (Continuación)

LOCUS	ENTRY	PRIMERS 5'-3'	EXPECTED	<i>L. vannamei</i> parentales	<i>L.</i> <i>vannamei</i>	<i>L.</i> <i>stylirostris</i>	<i>F.</i> <i>californiensis</i>	<i>F.</i> <i>duorarum</i>	<i>T.</i> <i>byrdi</i>
CNM-MG 787	>7515van	TAATCTTGCCTACAGCCAGT							659-
		CTGGTCGATATGCAAAGTC	175			662-678(2)	654(1)	659(1)	674(2)
CNM-MG 789	>7536van	AGAAGCATTGCCGTTAGCCT							453-
		GCACTGATGCCAAGAAGCCA	152			397(1)	375-403(3)	373-402(2)	467(2)
CNM-MG 790	>7561van	GACAAATGCTCGGCCAAAT							228-
		TCACCGCTTTCCTCGGCTAC	205			593-664(4)	649-666(3)	643-680(3)	660(4)
CNM-MG 791	>7570van	TGAGAAATGACCGTGGTGTATC							
		TTGGTGCTGAGAACAGAGTG	161	403-408(2)	413(1)	402-418(4)	394-403(2)	394-414(3)	319(1)

Anexo 2. Homologación de marcadores intrónicos de *L. vannamei* con proteínas conocidas.

PRIMER	PROTEIN ACCESSION	FUNCTION	PROBABILITY	SCORE	SPECIES
CNM-MG620	AAR01298.1	Factor de elongación 2	2x10 ⁻⁵⁹	229	<i>Libinia marginata</i>
CNM-MG622	AAL62465.1	Proteína 60S acidica ribosomal	2x10 ⁻⁵⁵	199	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG624	CAA58023.1	Proteína ribosomal L7a	1x10 ⁻¹¹	70.1	<i>Drosophila melanogaster</i>
CNM-MG630	BAC41415.1	Proteína mKIAA0320	3x10 ⁻⁷⁰	267	<i>Mus musculus</i>
CNM-MG631	XP_320350.1	ENSANGP00000009134	5x10 ⁻³¹	137	<i>Anopheles gambiae</i>
CNM-MG633	AAM28646.1	Precursor dihidroipoamideacetyl transferase	3x10 ⁻⁵⁰	198	<i>Xenopus laevis</i>
CNM-MG639	NP_003163.1	Proteína surfeit1,surfeitlocus	2x10 ⁻³³	144	<i>Homo sapiens</i>
CNM-MG644	NP_611468.1	CG9090-PA	9x10 ⁻³²	137	<i>Drosophila melanogaster</i>
CNM-MG645	BAC41415.1	Proteína mKIAA0320	3x10 ⁻⁷⁰	267	<i>Mus musculus</i>
CNM-MG650	AAL62465.1	Proteína Ribosomal 60S	7x10 ⁻⁵¹	201	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG652	AAK52067.1	Qmprotein	9x10 ⁻⁹⁴	344	<i>Heliothis virescens</i>
CNM-MG656	AAK92167.1	Proteína ribosomal L32	1x10 ⁻³⁷	156	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG657	AAK92167.1	Proteína ribosomal L32	3x10 ⁻³⁹	162	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG658	NP_079863.1	Proteína ribosomal S21	2x10 ⁻²⁹	129	<i>Mus musculus</i>
CNM-MG662	NP_080675.1	RIKEN cDNA1500041N16	2x10 ⁻²⁷	102	<i>Mus musculus</i>
CNM-MG667	XP_394568.1	Proteína Ribosomal S25	3x10 ⁻²¹	102	<i>Apis mellifera</i>
CNM-MG668	AAP21828.1	Proteína ribosomal S21	2x10 ⁻³¹	136	<i>Branchiostoma belcheritsingtaunese</i>
CNM-MG673	O61231 RL10_DR OME	Proteína ribosomal S10 L10 (Qmprotein)	6x10 ⁻⁶⁸	257	<i>Drosophila melanogaster</i>
CNM-MG677	AAB27066.1	ADP-ribosylation factor1;ARF1	4x10 ⁻⁸³	308	<i>Drosophila melanogaster</i>
CNM-MG679	AAK92167.1	Proteína ribosomal S32	5x10 ⁻⁴⁹	194	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG690	AAN05607.1	Proteína ribosomal 7a	1x10 ⁻¹⁶	87	<i>Argopecteni irradians</i>
CNM-MG699	NP_001976.1	electron-transfer-flavo protein,;	2x10 ⁻⁴⁴	158	<i>Homo sapiens</i>
CNM-MG700	AAN05607.1	Proteína ribosomal 7a	3x10 ⁻²¹	69.7	<i>Argopecten irradians</i>
CNM-MG701	ref NP_033121.1	Proteína ribosomal S5	1x10 ⁻⁵¹	204	<i>Mus musculus</i>
CNM-MG712	AAP14951.1	Proteína ribosomal 27a	5x10 ⁻⁵¹	201	<i>Branchiostoma belcheritsingtaunese</i>
CNM-MG717	AAL62472.1	Proteína ribosomal S8	3x10 ⁻¹⁴	79	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG720	AAL09707.1	Proteína ribosomal 30	5x10 ⁻²⁸	124	<i>Branchiostom abelcheri</i>
CNM-MG723	BAB78527.1	ribosome-associatedproteinP40	7x10 ⁻⁴⁶	185	<i>Bombyx mori</i>
CNM-MG726	AAC61597.1	F1F0-typeATPsynthasesubunitg	2x10 ⁻²²	105	<i>Homo sapiens</i>
CNM-MG727	AAN52382.1	Proteína ribosomal l39	2x10 ⁻¹⁴	79.7	<i>Branchiostoma belcheri</i>
CNM-MG732	AAK92191.1	Proteína ribosomal s23	7x10 ⁻⁷⁴	277	<i>Spodopterafrugiperda</i>
CNM-MG738	AAH59695.1	Zgc:73391protein	3x10 ⁻²⁸	125	<i>Daniorerio</i>
CNM-MG740	CAG02850.1	Unnamed protein product	5x10 ⁻²⁸	124	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
CNM-MG742	NP_998805.1	Microtubule - associated protein,RP/EB	1x10 ⁻⁴⁶	187	<i>Danio rerio</i>
CNM-MG746	BAC56488.1	Similar to acidic ribosomal phosphoprotein PO	3x10 ⁻³⁹	162	<i>Bostaurus</i>

Anexo 2. Homologación de marcadores intrónicos de *L. vannamei* con proteínas conocidas (Continuación).

PRIMER	PROTEIN ACCESSION	FUNCTION	PROBABILITY	SCORE	SPECIES
CNM-MG747	AAC03149.1	Factor de elongación 1 α	2x10-47	189	<i>Libinia marginata</i>
CNM-MG750	AAK92191.1	Proteína ribosomal S23	3x10-75	281	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG755	AAP21828.1	Proteína ribosomal S21	7x10-32	137	<i>Branchiostoma belcheritsingtaunese</i>
CNM-MG757	AAN73075.1	cysteine-richintestinal protein	3x10-32	139	<i>Hirudo medicinalis</i>
CNM-MG760	AAK92158.1	Ribosomal proteinL27A	5x10-41	165	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG761	AAK92167.1	Ribosomal protein L32	3x10-23	108	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CNM-MG763	NP_035016.1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 α subcomplex, 4.	2x10-12	73.9	<i>Mus musculus</i>
CNM-MG767	BAD12426.1	Fructose 1,6-bisphosphatealdolase	9x10-46	183	<i>Antheraeaayamamai</i>
CNM-MG770	AAC03149.1	Factor de elongación 1 α	7x10-66	250	<i>Libinia marginata</i>
CNM-MG772	AAF13315.1	Translation initiation factor 5A	1x10-32	142	<i>Spodoptera exigua</i>
CNM-MG778	AAC83399.1	P 21ras-like protein	6x10-22	105	<i>Artemia sp.</i>
CNM-MG780	AG8 A	Chain A, Aldehyde Dehydrogenase From Bovine Mitochondria	7x10-53	207	
CNM-MG781	Q9VND8 RHEB_DROME	GTP-binding protein Rhebhomolog	9x10-35	148	<i>Drosophila melanogaster</i>
CNM-MG782	Q9NVP1 DD18_HUMAN	ATP-dependent RNHelicaseDDX18(DEAD-boxprotein18)(Myc-regulat	1x10-83	310	<i>Homosapiens</i>
CNM-MG784	AAF15900.1	Thioredoxin reductase	2x10-53	209	<i>Homosapiens</i>
CNM-MG785	AAH19268.2	HRMT1L2 protein	1x10-41	172	<i>Homosapiens</i>
CNM-MG791	AAH62033.1	Proteína phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	1x10-79	286	<i>Rattus norvegicus</i>

CONCLUSIONES

1. La información de secuencias genéticas disponible públicamente en el caso de *L. vannamei* es útil para la generación de marcadores intrónicos.
2. La exploración de datos intrónicos tiene bajo costo, lo que evita un aumento de costos operativos asociado con las etapas iniciales para el desarrollo de marcadores moleculares, es decir la construcción de la denominada librería genómica y su secuenciación.
3. Debido a que los marcadores intrónicos 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 intrónicos son transferibles entre especies. Transferibilidad significa 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 I.
6. Los marcadores desarrollados en esta investigación en *L. vannamei* son polimórficos y útiles en genética de camarones.

REFERENCIAS

- Alcívar-Warren, A.** 2001. Biotechnology and Aquaculture Interface: The site of Maximum Impact Workshop. Application of Biotechnology to Address Shrimp Industry Development and Environmental and Public Health Issues. . ARS-OI Biotechnology- Aquaculture Workshop.
- Bierne, N., E. Lehnert, E. Bedier, F. Bonhomme and S. Moore.** 2000. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon – primed intron-crossing (EPIC)-PCR. *Molecular Ecology* 9: 233 –235.
- Davis, G. and D. Hetzel.** 2000. Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. *Aquaculture research* 31:
- Duda, T. and R. Palumbi.** 1999. Population structure of the black tiger prawn, *penaeus monodon*, among western indian ocean and western pacific populations. *Marine Biology* 134: 705-710
- Espinosa G., M. Jager, E. García-Machado , Y. Borell, N. Corona, A. Robainas and J. Deutsch .** 2001. Microsatellites from the white shrimp *Litol. schmitti* (Crustacea, Decapada). *Biotecnología aplicada* 18: 232-234.
- Giovambattista, G., M. Ripoli, J. Lirón, M. Kienast, E. Villegas, F. Castagno y P. Peral.** 2001. Aplicación de las Técnicas de Polimorfismo de DNA en la resolución de casos de Abigeato, identificación individual y determinación de Paternidad. *Analecta veterinaria* 21(1): 5-11
- Liu, Z., A. Karsi and R. Dunham.** 1999. Development of Polymorphic EST Markers Suitable for Genetic Linkage Mapping of catfish. *Marine Biotechnology* 1: 465-476.
- Marine Genomic : <http://www.marinegenomics.org>
- Meehan, D., Z. Xu, G. Zúñiga and A. Alcívar - Warren.** 2003. High frequency and large number of Polymorphic microsatellites in cultured shrimp *Penaeus (Litopenaeus vannamei)* (Crustácea : Decapoda). *Marine Biotechnology* 5: 311-330.
- NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- O'Brien, S.** 1991. Molecular genome lapping : lessons and prospects. *Genetic Development* 1 :105-111.
- Russell, Peter.** 1992. *Genetics*, 3rd edition. Harper Collins Publishers.
- Tassanakajon, A., A. Tiptawonnukul, P. Supungul, V. Rimphanitchayakit, D. Cook, P. Jarayabhand, S. Klinbunga, and V. Boonsaeng** 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7(1): 55 – 61.
- Touriya, A., M. Rami, G. Cattaneo-Berrebi, C. Ibanez, S. Augros, E. Boissin, A. Dakkak and P. Berrebi.** 2003. Primers for epic amplification of intron sequences for fish and other vertebrate population genetic studies. *Biotechniques* 35:676-682
- Van der Werf.** 1989. Introduction to some aspects of molecular genetics. University New England. Australia. 35-43p.