

## “Desarrollo de Marcadores Genéticos tipo *EST-SSR* y *SSR* para especies Acuícolas”

Juan Ortiz Tirado<sup>1</sup>, Franklin Pérez<sup>2</sup> y Juan C. Giacometti<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Escuela Politécnica del Ejército, Departamento Ciencias de la Vida, Carrera de Ciencias Agropecuarias (IASA I), Laboratorios. Sangolquí – Ecuador. PBX. 171-5-231-B.  
E-mail: jcortiz@espe.edu.ec

<sup>2</sup> ONELAB, Laboratorio para genética del camarón blanco. E-mail: [fperez@hotmail.com](mailto:fperez@hotmail.com)

<sup>3</sup> Escuela Politécnica del Ejército, Departamento Ciências de la Vida, Carrera de Ciências Agropecuárias (IASA I), Laboratórios. Sangolquí – Ecuador **E-mail:**  
**[juangiacometti@espe.edu.ec](mailto:juangiacometti@espe.edu.ec)**

### INTRODUCCION

El área de Recursos Bioacuáticos de la *Escuela Politécnica del Ejército* con alianzas estratégicas públicas y privadas (*CENAIM - ESPOL*, *CENIAC* y *ONELAB*) han desarrollado tecnología molecular aplicable al campo de la acuicultura, con especies de alto valor comercial como: *Litopenaeus vannamei* y *Oncorhynchus mykiss*. Los marcadores moleculares codominantes tipo *EST-SSR*, *SSR* tienen enorme importancia en la investigación genética actual. Son utilizados para la identificación de parentesco, ubicación de genes de interés comercial, y estudios de estructura poblacional (Russell, 1992; Tong *et al.*, 2002). En este trabajo presentamos la utilidad de la exploración de datos para el desarrollo de marcadores moleculares en *O. mykiss* y *L. vannamei*, especie en la cual marcadores tipo I no han sido reportados previamente.

El proyecto utilizó información pública de bases de datos (NCBI y Marine Genomics) para la generación de secuencias nucleotídicas útiles para camarón y trucha (Ilustración 1).

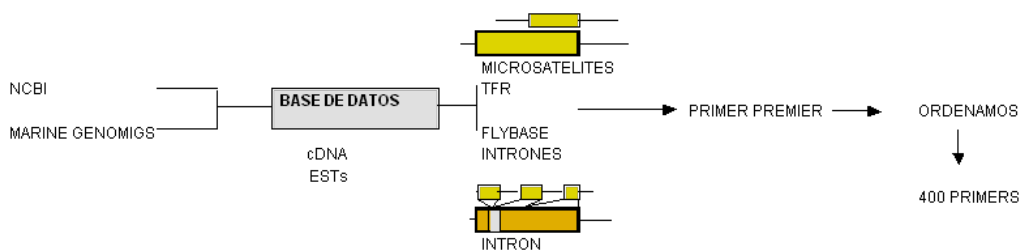


Ilustración 1. Exploración de datos *EST-SSR*, *SSR*.

### Objetivos.

1. Desarrollar marcadores tipo *EST-SSR* en camarón.
2. Determinar polimorfismo de los marcadores tipo *EST-SSR* en camarón.
3. Desarrollar marcadores tipo *SSR* en trucha.
4. Determinar polimorfismo de los marcadores tipo *EST-SSR* en trucha arco iris.

### MATERIALES Y METODOS

Camarón: El análisis de secuencias públicas permitió generar 286 primers, los cuales se evaluaron en animales silvestres mediante PCR (*L.vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, *F.duorarum* y *T. byrdi*) y optimizaron en un set de mapeo de *L. vannamei* levantados en las instalaciones del *CENAIM- ESPOL en San Pedro de Manglar Alto*. Polimorfismo y número de alelos fue evaluado para cada primer. Primers monomórficos se corrieron con la técnica *SSCP*, de alta discriminación y que determinan variabilidad en las secuencias. Los primers que revelaron polimorfismo en progenitores de la familia de mapeo, fueron amplificados para verificar segregación mendeliana. Adicionalmente se confirmó la utilidad de genes, mediante un análisis por homologación de marcadores amplificados (*BLAST*).

Trucha: Se realizó el mismo procedimiento, generando 50 juegos de primers, los mismos que fueron sintetizados por la compañía *SBS Genetech Co., Ltd*. La evaluación de los primers se los realizó en grupos silvestres de trucha arco iris y su optimización en cuatro grupos familiares levantados en las instalaciones del *CENIAC en Papallacta*.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Camarón (*EST –SSR*).- Un 3,8% de *ESTs* contenían repeats tipo microsatélite con frecuencia de 1 repetición cada 7,8 kb. De los 286 primers diseñados para *SSR – ESTs*, amplificaron 129 loci. Alto porcentaje (56%) fueron transferibles dentro del genero *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* fue evaluado para 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* (Ortiz, 2004).

Trucha (*SSR*).- La tasa de éxito de amplificación en animales silvestres fue de un 56 % es decir 28 amplificaciones por *PCR*. La evaluación para segregación mendeliana arrojó una tasa de amplificación del 44%, distribuyéndose un 36% de *SSR* polimórficos (Tabla 1) y un 8% de marcadores monomórficos. El promedio de bases por primer se mantuvo en el orden de 36 bp ( Ilustración 2).

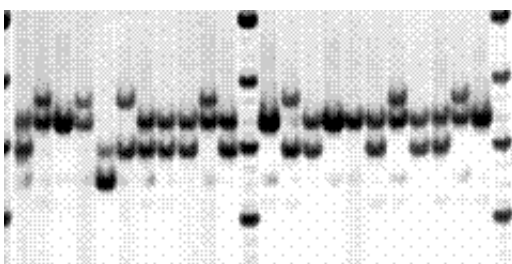


Ilustración 2. Primer 42815192. *O. mykiss*

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 nuestro trabajo, el conjunto de primers diseñados tuvo un contenido de GC entre el 40 y 60% y una mínima estabilidad en la región 3' terminal. Sin embargo los primers diseñados cortos (17,1 bp de longitud promedio) fueron diseñados debido al tipo de software utilizado. Es posible que primers de corta longitud, puedan ser responsables de un porcentaje de primers fallidos, lo que explicaría una tasa de éxito menor al comparar nuestro trabajo con otros reportados en la literatura.

Tabla 1.

Marcadores SSR e información de polimorfismo en *O. mykiss* en un grupo familiar. Se presenta el tamaño de bandas y número de alelos.

LOCUS	ENTR	PRIMERS 5'- 3' P3	PRIMERS 5'- 3' PP	REPEAT	ESPERADO	<i>O.mykiss</i>
				SEQUENCE		
ESPE -NCBI 24592857	24592857	AACAACAACAACAATGA GAGGCTGAGTTAGGAAAGA		TCTG	222	235 - 259 (4)
ESPE -NCBI 42815192	42815192	TGCTTGCCATACATTTTCATAC ACAGTAAGTCCCTGCTTTGTT	AATAGCACAGCCTTTAGC ATGTCTTGGCATAGTGAA	TGTC	214	239 - 267 (4)
ESPE -NCBI 42626013	42626013		TGGCTACGACTCCTACTG TGTGATGGGAACCAACCT	GAG	205	227 - 233 (2)
ESPE -NCBI 46477370	46477370		TCCAGCATCAAGAAGACT CAACCCAACAACACTACT	TGA	301	429 - 437 (2)
ESPE -NCBI 56999947	56999947		CTACCACCTCACTCCCTCC TCACCTCCTGCTTCC	CTG	216	311 - 316 (2)
ESPE -NCBI 42756932	42756932		GAAGAAAGACTGACTCCGTGAT GACAGAATTGCCCTGGTG	ACTC	388	412 - 421 (3)
ESPE -NCBI 60384030	60384030	AGGCTTTCTCTCCCTCTTC TGATTAGACCTTTCTGTTGT		AGGC	258	249 - 260 (2)
ESPE -NCBI 63084723	63084723	AATGGTGACAGTTTCTGCT GATGCCTGGGTAGAGCGT		GTGA	284	246 - 265 (4)
ESPE -NCBI 60363691	60363691	TAGGTGGGTGATGTGTAGG AGAGGGAAGTATGTGGTGAGT		TTGTC	233	224-236(2)
ESPE -NCBI 60384029	60384029	TGATTAGACCTTTCTGTTGT AGGCTTTCTCTCCCTCTTC		TGCC	258	247 -259 (2)
ESPE -NCBI 40227035	40227035	GACCTCAGCAAACACGCT AAACAGCACAATGACAAACT		CTGT	195	200 - 258 (3)
ESPE -NCBI 42756547	42756547		ATCAGCCACTGCCTATCT TTTCATTTCTCCCTTCTC	GACTG	328	168-183(3)
ESPE -NCBI 60361946	60361946		GCAACCCGTTACCTACC TCCCAAACCACCACCATC	TGT	302	326 -335 (3)
ESPE -NCBI 24596030	24596030	GCAGCGATACTACTCCAATAA TGCTCTACCACCTCCTCTC		AATG	335	298 - 310 (2)
ESPE -NCBI 24686365	24686365	AAAGAAAGTGGAGGAGATGG GTTGTAGGAAGATGTGTGCTT		GAGT	243	243 (1)
ESPE -NCBI 40224850	40224850	GGGACTCTTTAGCAGGAT AGTGCCTTGAATGGGTA	GGGACTCTTTAGCAGGAT AGTGCCTTGAATGGGTA	CCAA	231	239 -254(4)
ESPE -NCBI 40309212	40309212		ACGGCTATGGAGGTTATG CTTTGGGAAGCAGAGGTA	GAG	278	270 (1)
ESPE -NCBI 46482981	46482981		GAATCCCTGGAAAGAGCC CACAGCCGTATGAAACCC	CCCT	249	366 - 405 (4)

Con la utilización de exploración de datos en secuencias *EST* para plantas, se han identificado centenares de marcadores *SSR* en diferentes especies (Thiel *et al.*, 2003). Aunque un número exacto de *EST-SSRS* generados por exploración de datos en secuencias *ESTs* públicamente disponibles, ha sido reportado previamente en cerdo (Rohrer *et al.*, 2002), genetistas dedicados en genética animal no han aprovechado la alta disponibilidad de secuencias *EST* en bases de datos públicos. La disponibilidad de *ESTs* para diferentes especies animales es alta, ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST\\_summary.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html)) y combinado con el uso de un nuevo servicio en la web para búsqueda de microsatélites y diseño de primers (<http://hornbill.cspp.latrobe.edu.au/cgi-bin/pub/index.pl>) (Robinson *et al.*, 2004), el aislamiento de *SSR* se vuelve muy simple. Para ilustrar este punto examinamos mil *ESTs*, cada una en tres especies diferentes (aves de corral *Gallus gallus*, cerdo *Sus scrofa* y el salmón del atlántico *Salmo salar*) y generaron primers *EST-SSR* en 6,8, 8,5 y 5,7% respectivamente. En el caso especial de *Salmo salar*, cuyo mapa de ligamiento comprende 64 marcadores (Gilbey *et al.*, 2004), para abril del 2004, hubo 87.982 secuencias *EST* depositadas en *NCBI*. Asumiendo una tasa de éxito del 1% en el desarrollo de marcadores, alrededor de 900 marcadores *EST-SSR* nuevos se podrían probar para polimorfismo y ligamiento. Los porcentajes de *EST-SSRS* en aves de corral, cerdo, salmón y camarón están en el mismo rango y gama para plantas (Saha *et al.*, 2003), lo cual señala una fuente importante de información útil.

## CONCLUSION

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

## REFERENCIAS

- Gilbey, J., E. Verspoor, A. McLay and D. Houlihan. 2004. A microsatellite linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Animal Genetics* 35: 98-105.
- Marine Genomic : <http://www.marinegenomics.org>
- NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Ortiz, Juan. 2004. Desarrollo de marcadores genéticos tipo *EST-SSR* e intrones para el mapa genético del camarón blanco. *Tesis de Maestría*. *CENAIM – ESPOLO*. 210 pp
- Robinson, A., C. Love, J. Batley, G. Barker and D. Edwards. 2004. Simple sequence repeat marker loci discovery using SSR primer. *Bioinformatics*. In press.
- Rohrer, G., S. Fahrenkrug, D. Nonneman, N. Tao and W. Warren. 2002. Mapping microsatellite markers identified in porcine EST sequences. *Animal Genetics* 33: 372-376.
- Russell, Peter. 1992. *Genetics*, 3rd edition. Harper Collins Publishers.
- Saha, S., M. Karaca, J. Jenkins, A. Zipf, O. Reddy, K. Umesh and R. Kantety. 2003. Simple sequence repeats as useful resources to study transcribed genes of cotton. *Euphytica* 130: 355-364.
- Thiel, T., W. Michalek, R. Varshney and A. Graner. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare*). *Theoretical Application in Genetic* 106: 411-422.
- Tong, J., S. Lehnert, K. Byrne, H. Kwan, and K. Chu. 2002. Development of polymorphic EST markers in *Penaeus monodon*: applications in penaeid genetics. *Aquaculture* 208: 69 –79.