

IDENTIFICACIÓN DE FAMILIAS DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES TIPO MICROSATÉLITES

Yordan Vivanco Muñoz¹, Franklin Pérez²

¹Ingeniero Acuicultor, 2004

²Director del Tópico, Ingeniero Agrónomo, Universidad Central del Ecuador (Quito), 1992, M.Sc. en Genética Molecular, Universidad de California, Davis, 1996. Candidato a Ph.D. KU Leuven, Genética de Poblaciones.

ABSTRACT

The implementation of breeding programs coupled with molecular tools offers wide perspectives in species at the onset of domestication as in the case of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. This work was carried out in order to develop and implement microsatellite markers for familiar and individual identification in shrimp. A total of 32 families, derived from an Ecuadorian breeding program, were evaluated with 7 microsatellites developed from a set of 131 experimental sequences. Genotyping was accomplished without parental genotype knowledge. Our results show that some of the putative families were in fact a mixture of animals of different origin. Additionally we found that two groups of animals, handled as different families, were the product of two single crosses. The implemented techniques and microsatellites will be useful for studies on genetic variability, identification of inbreeding and quality control of breeding programs in the white shrimp.

RESUMEN

La implementación de programas de mejoramiento apoyados con herramientas moleculares promete acelerar las ganancias genéticas por ciclo de selección en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, especie que se tiene poca información acerca de las herramientas moleculares dirigidas a mejoramiento genético. El presente trabajo se planteó con el fin de implementar y evaluar marcadores tipo microsatélite en camarón blanco para la identificación de familiar e individual de 32 familias derivadas de un programa de mejoramiento genético local. La evaluación de las muestras se realizó sin conocimiento de los perfiles genéticos de los padres. Se diseñaron 131 pares de primers para marcadores microsatélites, de los cuales se optimizaron siete. Se determinó la existencia de mezclas de animales de diferente origen en varias familias. Igualmente se detectó que varios grupos manejados como familias independientes fueron derivados de dos cruces. La técnica implementada y los loci desarrollados serán útiles para evaluación de variabilidad en material comercial, seguimiento de

familias en producción comercial e identificación de grados de consanguinidad en animales de ciclo cerrado.

INTRODUCCIÓN

Los programas de mejoramiento genético en el sector camaronero han despertado interés en los productores debido a las bajas producciones que se han dado desde la aparición de nuevas enfermedades virales. Uno de los cambios que se está dando es la domesticación de la especie con los objetivos de no depender de la larva silvestre y de mejorar la especie genéticamente (5). En Ecuador actualmente se está trabajando con animales sobrevivientes de piscinas donde hubo mortalidades. Esos animales son llevados a reproductores y trabajados dentro de programas de selección cuantitativa sin un real control genético. Sólo un grupo local de mejoramiento genético, PromoGen S.A. se ha involucrado en programas de selección familiar (6).

Uno de los graves problemas en programas de mejoramiento genético basados en selección masal (sin control genético) es el estrechamiento genético debido a la falta de información de pedigrí. Esto induce a la pérdida de variabilidad genética que se refleja en el apareamiento de caracteres letales que influyen en la producción comercial (6,2). El seguimiento correcto de los cruces, basadas en la selección de las mejores cualidades y evitando la endogamia (cruce entre hermanos o entre padres e hijos) es la manera adecuada para realizar mejoras genéticas en especies acuícolas (3). Siguiendo estos lineamientos se ha demostrado en *Litopenaeus vannamei* la posibilidad de generar líneas seleccionadas con mayor eficiencia en crecimiento y resistencia a enfermedades (1).

Con la utilización de marcadores genéticos tipo microsatélites se puede determinar la identidad genética de cada uno de los individuos seleccionados y determinar su grado de parentesco. La información obtenida puede ser utilizada para realizar cruces dirigidos que permitan rescatar alelos que están en baja proporción o a punto de extinguirse en la población seleccionada (4). Esto permite mantener la variabilidad genética a niveles adecuados y evitar problemas de consanguinidad.

Con marcadores microsatélites se ha hecho pruebas exitosas de parentesco con especies acuícolas como en salmónidos y moluscos, y también en camarones de la especie *Penaeus monodon* (9), *Penaeus japonicus* (7) y *Litopenaeus vannamei* (8).

En el presente proyecto se trabajó con 32 familias de camarón *Litopenaeus vannamei* (15 individuos por familia) provenientes del programa de mejoramiento genético de Promogén S.A.. Muestras de

DNA de esos animales fueron evaluadas con marcadores genéticos tipo microsatélites, optimizados en CENAIM, con la finalidad comprobar la utilidad de estos marcadores para la identificación de familias de camarón blanco. Los resultados obtenidos servirán como herramienta al sector camaronero para seleccionar reproductores con características genéticas adecuadas (mejoramiento genético) evitando el cruzamiento entre individuos estrechamente emparentados.

RESULTADOS

Microsatélites Optimizados

En la tabla I se presentan los loci optimizados en CENAIM, con los que se trabajó con las 32 familias.

Tabla I. Secuencia de los iniciadores, temperatura de plegado, Concentración de Cloruro de Magnesio y Número de acceso al NCBI de los 7 microsatélites escogidos

| locus | Secuencia de los primers | T° (TD) | [MgCl ₂] (Mm) | Acceso al NCBI |
|--------|---|---------|---------------------------|----------------|
| CN-54 | F: TGCTTGTGAAGGTGTGTGAACGTG R: CAAGATGCGTATGCACACATTGCTG | 43 | 1,0 | AF360040 |
| CN-67 | F: GAAGAGGCAGGGCGGATTT R: GGAAGGTGGGAACAAGG | 51 | 2,0 | AF360007 |
| CN-84 | F: GGGTTATGATGACCAAAG R: ATTGGGTCTCGGAGTTTA | 59 | 2,0 | AF360114 |
| CN-135 | F: ATAATGCGAGCGTGAG R: ATTCCTTAGCGAACCA | 43 | 2,0 | AF359979 |
| CN-142 | F: TGCTACGCCGACAATG R: GAAGGTGCTTGCGACA | 43 | 2,0 | AF360029 |
| CN-148 | F: CATCATCGCTAAAATT R: CCTTCTGTTGTGGGTAT | 43 | 2,0 | AF360051 |
| CN-159 | F: AAGAACGAAGTGGAGGAG R: AAGCACCCAGTGTAGCC | 47 | 2,0 | AF360109 |

Prueba de Segregación Mendeliana

En todos los loci se observaron familias con segregación mendeliana (Fig. 1).

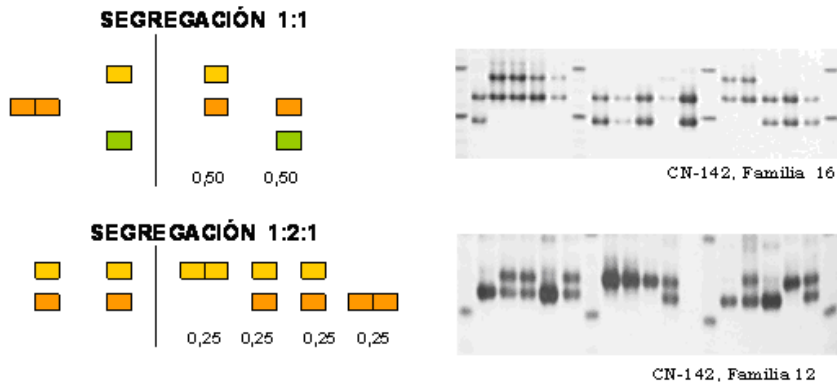


Figura 1. Ejemplos de segregación mendeliana

En todos los loci hubo familias que indicaron la introducción de individuos de otra u otras familias, ya que no cumplían con ningún caso de segregación mendeliana (Fig. 2).

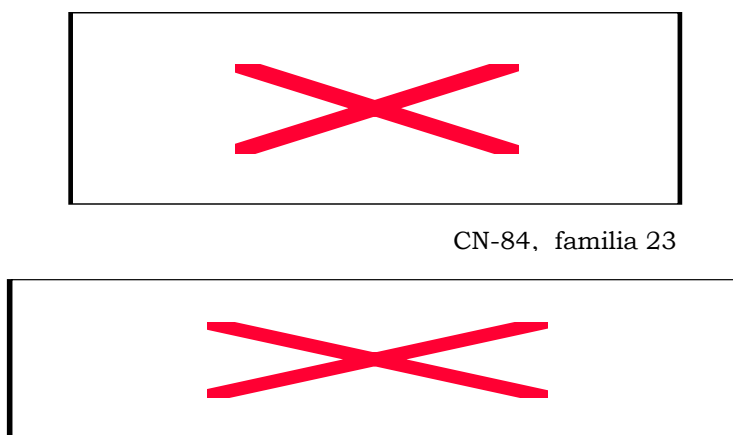


Figura 2. Grupo familiar que no presenta ningún caso de Segregación Mendeliana

Agrupamiento Familiar

El análisis de agrupamiento con el programa Kinship demostró que no todos los individuos pertenecen a la familia correspondiente, y que algunos individuos se agrupan en otras familias. La mitad de las familias (16 familias) presentaron un porcentaje de agrupamiento mayor del 80%, mientras que las otras familias fue menor (Tabla II).

Tabla II. Porcentaje de agrupamiento entre los individuos de la misma familia

| | | | | | |
|-----|------|-----|------|-----|------|
| F1 | 77% | F2 | 48% | F3 | 83% |
| F4 | 79% | F5 | 68% | F6 | 73% |
| F7 | 76% | F8 | 81% | F9 | 79% |
| F10 | 94% | F11 | 68% | F12 | 81% |
| F13 | 94% | F14 | 65% | F15 | 86% |
| F16 | 98% | F17 | 99% | F18 | 96% |
| F19 | 91% | F20 | 75% | F21 | 66% |
| F22 | 89% | F23 | 71% | F24 | 36% |
| F25 | 100% | F26 | 87% | F27 | 100% |
| F28 | 41% | F29 | 100% | F30 | 50% |
| F31 | 61% | F32 | 100% | | |

4.5.2. Agrupamiento entre Familias

Al realizar la prueba de agrupamientos individuales entre familias, los resultados obtenidos indicaron que la mayoría de familias tienen introducidos algunos individuos de distintas familias. En la Tabla III se presenta el ejemplo de dos grupos que de acuerdo al programa de selección correspondían a familias que compartían animales entre sí.

Tabla III. Agrupamiento entre la Familia 29 y Familia 19

| | F29 01 | F29 02 | F29 03 | F29 04 | F29 05 | F29 06 | F29 07 | F29 08 | F29 09 | F29 10 | F29 11 | F29 12 | F29 13 | F29 14 | F29 15 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| F18 10 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| F18 11 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| F18 12 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| F18 13 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| F18 14 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| F18 15 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| F19 01 | NS | * | * | NS | * | * | * | NS | NS | * | * | ** | ** | NS | * |
| F19 02 | ** | * | * | * | ** | ** | ** | * | * | * | * | ** | ** | NS | * |
| F19 03 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | * | * | NS | NS | |
| F19 04 | * | NS | NS | NS | * | NS | ** | * | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| F19 05 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| F19 06 | * | ** | ** | ** | ** | ** | ** | NS | NS | ** | ** | ** | ** | NS | ** |
| F19 07 | NS | * | * | * | * | * | * | NS | NS | * | * | ** | ** | NS | * |
| F19 08 | NS | * | NS | NS | NS | NS | * | NS | NS | * | * | * | * | NS | NS |
| F19 09 | NS | ** | * | * | * | * | ** | NS | NS | ** | ** | ** | ** | NS | * |
| F19 10 | ** | * | * | * | ** | ** | ** | * | ** | * | * | ** | ** | NS | * |
| F19 11 | NS | * | * | NS | * | * | * | NS | NS | * | * | ** | ** | NS | * |
| F19 12 | * | * | * | * | ** | ** | ** | NS | NS | ** | * | ** | ** | NS | * |
| F19 13 | NS | ** | * | * | * | * | ** | NS | NS | ** | ** | ** | ** | NS | * |
| F19 14 | * | ** | * | * | * | * | * | NS | * | * | ** | ** | ** | * | * |
| F19 15 | NS | ** | * | * | * | * | ** | NS | NS | ** | ** | ** | ** | NS | * |
| F20 01 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | * | * | NS | NS | |
| F20 02 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| F20 03 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| F20 04 | NS | * | * | NS | * | * | NS | NS | NS | * | * | ** | ** | NS | * |
| F20 05 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |

- * Probabilidad 95,0 % que sean hermanos
 ** Probabilidad 99,0 % que sean hermanos
 *** Probabilidad 99,9 % que sean hermanos
 | NS No significativo

Se encontró una fuerte relación entre las familias 16, 17 y 18 que presentaron los mismos genotipos. En la prueba de χ^2 se determinó que la segregación fue similar, ratificando la sospecha de que las 3 familias provienen de un mismo desove. Resultados de fuerte agrupamiento se evidenció en otros grupos inicialmente denominados familias: 7 y 8; 9, 12 y 13; 27 y 32.

Dendograma Familiar (Análisis UPGMA)

En la figura 3 se presentan los resultados de agrupamiento entre familias basados en distancias genéticas bajo el algoritmo de Nei, realizado con el programa TFPGA. En estos resultados se puede confirmar la cercanía entre las familias 16, 17 y 18 y 7 y 8.

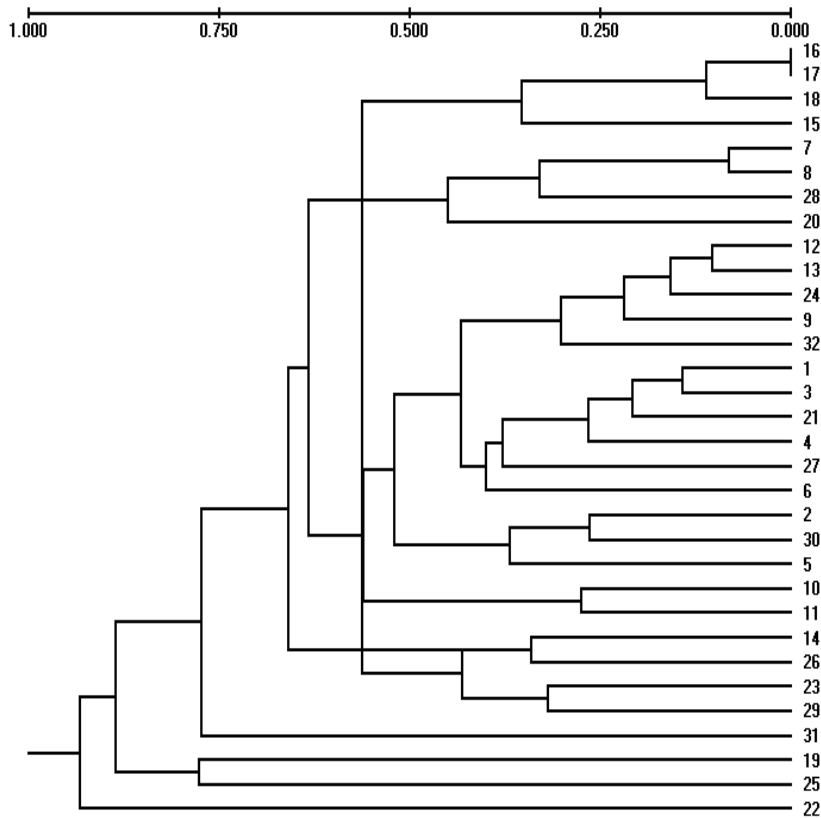


Figura 3. Dendrograma familiar basado en el análisis UPGMA

CONCLUSIONES

Con formato: Numeración y viñetas

- Se puede utilizar microsatélites específicos para *Litopenaeus vannamei* para el seguimiento de familias y determinación de parentesco.
- Durante el trabajo con las muestras del programa de mejoramiento genético llevado a cabo por PROMOGEN, se comprobó la incidencia de mezcla de familias, deduciendo que hubo problemas de manipuleo durante el programa.
- Es preferible tener la información del genotipo de los padres, de esa manera se puede saber con certeza los genotipos a obtener de la descendencia y determinar si hubo mala manipulación al encontrar individuos introducidos.
- En un estudio financiero del mismo proyecto se demostró que es mejor implementar el sistema de marcadores microsatélites para los programas de mejoramiento genético por su menor necesidad de inversión, dando como la mejor opción alquilar las instalaciones. También es importante recalcar la mayor eficiencia en los resultados finales por tener una mayor seguridad en los cruces de padrotes y eliminar la incidencia de mezcla de familias que llevan a la disminución de ganancia genética.

BIBLIOGRAFÍA

1. Argue B., Arce S., Lotz J., Moss S. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture*. 2002. 204:447-460.
2. Bierne N., Bezart I., Vonau V., Bonhomme F., Bédier E. Microsatellite-Associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquacult*. 1999. 184:203-219.
3. Davis P., Hetzel S. Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. *Aquaculture Reserch*. 2000. 31:3-10
4. Garcia D., Faggart M.A., Rhoades L., Alcivar A., Wyban J.A., Carr W.H., Sweeney J.N., Elbert K.M. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Molec. Marine Biology And Biotechnology*. 1994. 3:270-280.
5. Nieto J. Investigación & Desarrollo, órgano de difusión del centro de Investigación Científico y Tecnológico de la ESPOL. *Revista informativa. ESPOL*. 2003. pp 20-24
6. Pérez F. Desarrollo de Marcadores Moleculares tipo Microsatélite en Camarón *Litopenaeus vannamei* para Mejoramiento Genético. *CENAIM INFORMA*. N° 92. 2003.

7. Sugaya T., Ikeda M., Mori H., Taniguchi N. Inheritance mode of microsatellite DNA markers and their use for kinship estimation in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Fisheries Science*. 2001. 68:299-305.
8. Wolfus G.M., Garcia D.K., Alcívar-Warren A.. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquacult.*, 1996. 152:35-47.
9. Xu Z., Primavera J.H., de la Pena L.D., Pettit P., Belak J., Alcívar-Warren A. Genetic diversity of wild and cultured Black Tigre Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquacult.* 2001. 199:13-40.

Presentación al CICYT del resumen del trabajo de tesis:

**IDENTIFICACIÓN DE FAMILIAS DEL CAMARÓN BLANCO
Litopenaeus vannamei UTILIZANDO MARCADORES
MOLECULARES TIPO MICROSATÉLITES**

Aprobado por

Ph.Dc Franklin Pérez
Director del Trabajo de Tesis