ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

“Mapeo genético en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*”

Tesis de Grado

Previa a la obtención del título de:

MAGISTER EN CIENCIAS

Presentado por:

Edna Constanza Erazo Maldonado

Guayaquil - Ecuador

2002

TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:

BTC
CTB

FUNDACION CENAIM-ESPOL

COOPERACION TECNICA BELGA

UNIVERSITEIT
GENT

KATHOLIEKE UNIVERSITEIT
LEUVEN

UNIVERSIDAD DE GANTE
BELGICA

UNIVERSIDAD CATOLICA
DE LOBAINA – BELGICA

FUNDACYT
FUNDACION PARA LA CIENCIA Y LA TECNOLOGIA

FUNDACION PARA LA CIENCIA Y LA TECNOLOGIA

VITA

Edna Constanza Erazo Maldonado, hija de Nina Maldonado y Jorge Erazo, nació el 12 de marzo de 1976 en Bogotá, Colombia. Recibió el título de Zootecnista en la Universidad Nacional de Colombia en el año 2000. Trabajó como auxiliar de investigación el el proyecto "Escala de Maduración Gonadal, Reproducción Inducida y Alevinaje del Yamú, *Brycon siebenthalae*. Universidad de los Llanos – COLCIENCIAS 1999-2000. Fue acepatada en el programa de Maestría en Acuicultura Marina de la Escuela Superior Politécnica del Litoral en septiembre del año 2000, becada por la Cooperación Técnica Belga.

DECLARACION EXPRESA

"La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL."

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

Edna Constanza Erazo
Maldonado.

TRIBUNAL DE TESIS

Eduardo Cervantes Ing.
Presidente del Tribunal

Filip Volckaert, Ph.D.
Director de Tesis

Franklin Perez, M.Sc.
Co-Director de Tesis
Miembro del Tribunal

Laurence Massaut, Ph.D.
Miembro del Tribunal

Ruby Montoya Ph.D.
Miembro del tribunal

DEDICATORIA

Redescubrirse buscando la paz infinita

de los universos interiores.

Retos de humildad y conocimiento.

Dejarlo todo para encontrarse.

Volver con el significado de cada paso.

Andar para volver…buscar a Itaca para encontrar

que en el camino y no en Itaca, esta la razón del viaje.

A mi amorosa familia, cimiento de mi vida.

En especial a ti Diana del Pilar,

por la ilusión de verte crecer.

AGRADECIMIENTOS

A Dios,por el infinito amor y el maravilloso don de la vida.

A mis padres, Jorge Miguel y Nina, y a mis hermanos Jorge y William por su amor y comprensión, por el apoyo constante en cada nuevo camino que he decidido recorrer.

A mi novio Rubén Guerrero y a su familia, por la compañia durante todo el tiempo dentro y fuera del Ecuador.

A mi co-director M. Sc. Franklin Perez por su amistad, guía y cooperación durante el desarrollo de este trabajo.

A Irma Betancourt, Mariuxi Zhinaula, Luis Tomalá y Maritza Medina por su colaboración en los trabajos de laboratorio y a mi compañera Martha Maldonado por su colaboración en la fase de levantamiento de familias.

A Adriana, Iván, Jaime, Pilar, Martha, Miguel, Carmen, Rómulo, Víctor, Carmela, Maritza y Jhony, por las lecciones de vida que aprendí durante los dos años que disfruté de su compañía, gracias mis amigos.

A la fundación CENAIM – ESPOL y las personas que en ella laboran, por que en algún momento recibí su ayuda gentil y desinteresada .

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
cM	centiMorgan
CTAB	cetyl-trimetyl-ammonium bromide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNTPs	dinucleotic triphosphate
EST	expressed sequence tags
g	gramo
L	litro
LOD	logarithm of odds ratio
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanogramo
PCR	polymerase chain reaction
pmol	picomol
QTLs	Quantitative Trait Loci
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSR	Simple Sequences Repeats
TAE	solución amortiguadora de Tris base, Acido Acético, EDTA
TE	solución amortiguadora de Tris HCl, EDTA
TBE	solución amortiguadora de Tris base, Acido Bórico, EDTA
U	unidades

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMEN

Se presenta el primer mapa genético de *Litopenaeus vannamei* basado en la técnica de AFLPs a partir de una familia proveniente de un cruce comercial y con la información genética de un solo progenitor y 42 hijos. Para su construcción se utilizó la estrategia de pseudocruce de prueba, generando para la hembra un mapa integrado por 212 marcadores distribuidos en 51 grupos de ligamiento, con una longitud total de 2771 cM, y un mapa para el macho con 182 marcadores agrupados en 47 grupos de ligamiento con un cubrimiento de 2116 cM. Se estimó que el cubrimiento del genoma fue del 62% para la hembra y 59% para el macho, siendo el mapa de la hembra 24% mayor en tamaño. Se identificó distorsión en la segregación en 2.8% de los marcadores generados para el mapeo, fenómeno que no ha sido descrito para otras especies de peneidos. Los protocolos de AFLPs y tinción de plata implementados en este estudio bajo condiciones locales permitieron la generación de una gran cantidad de datos a bajo costo, por lo cual el desarrollo del mapa genético de ligamiento fue exitoso.

1. INTRODUCCIÓN

La industria camaronera en los últimos años se ha enfrentado a graves problemas que han amenazado la producción, como el síndrome de Taura y el síndrome de la mancha blanca entre otros (Jiménez, 2000). Esta situación ha conducido a desarrollar estrategias para contrarrestar estas amenazas, como la domesticación de animales por medio de la generación de cultivos en ciclo cerrado y la creación de programas de selección y mejoramiento genético (Benzie, 1998).

Los programas de mejoramiento tradicionales basados en la cría y selección de individuos con características fenotípicas de interés comercial necesitan de mucho tiempo para su desarrollo (Argue *et al.*, 2002), esto debido en parte a la baja heredabilidad de algunas características como las relacionadas con la conversión alimenticia y la resistencia a enfermedades, ya que estas en su mayoría están gobernadas por múltiples genes. Experimentos con *Litopenaeus stylirostris*, requirieron de 5 años de selección masal para mejorar la tasa de crecimiento en líneas domésticas de Nueva Caledonia (Goyard *et al.*, 2002); de otra parte para *Litopenaeus vannamei* el Oceanic Institute necesitó de tres años de investigación para generar líneas mejoradas basadas en mayor crecimiento y resistencia a TSV, obteniendo finalmente una correlación negativa para estas dos características (Wilson *et al.*, 2002).

Sin embargo, gracias a los adelantos tecnológicos actuales, los procesos de mejoramiento genético tradicionales pueden ser acelerados al incluir técnicas moleculares basadas en

ADN para su desarrollo. Estas técnicas pueden facilitar estrategias como la identificación y el monitoreo de líneas, familias e individuos; el monitoreo y control de consanguinidad entre parentales y el diagnóstico de características hereditarias, dando como resultado el mejoramiento a través de la selección y combinación de genes favorables (Lester, 1999; Davis y Hetzel, 2000). Sin embargo, en cuanto a camarones peneidos se refiere, la información disponible acerca de su composición genética es fragmentada y las tecnologías dirigidas a solucionar problemas básicos en el área de ingeniería genética como los cultivos celulares, la fertilización *in vitro* y el mapeo genético aún no están disponibles o tienen un desarrollo limitado (Benzie, 1998).

El mapeo genético es una herramienta biotecnológica que se ha utilizado en diversas especies con el fin de conocer el orden y localización de los genes o de marcadores genéticos de interés. Los mapas genéticos resultantes pueden ser físicos, en los cuales se localizan los genes o marcadores genéticos directamente sobre los cromosomas o pueden ser mapas de ligamiento, basados en distancias de recombinación, producto de la meiosis durante la formación de los gametos. Ambos pueden ser desarrollados utilizando técnicas moleculares ya establecidas (Davis y Hetzel, 2000).

Los genes que hasta el momento se han caracterizado en camarones peneidos son muy pocos (Bagshawa y Quiel, 1998); sin embargo la investigación en mejoramiento genético de estas especies está encaminada hacia la búsqueda de genes y marcadores moleculares para ser usados en selección asistida. Actualmente existen avances en esta área en *Penaeus monodon* con el uso de RAPDs (García y Benzie, 1995), AFLPs (Wilson *et al.*, 2002) y

ETSs (Tong *et al.*, 2002) y en *Penaeus japonicus* con el uso de microsatélites y AFLPs (Moore *et al.,* 1999). Con estas técnicas se ha iniciado la construcción de mapas comparativos que a futuro permitirán probar la conservación de genes en familias y localizar posibles QTLs (loci de caracteres cuantitativos) en las especies cultivadas (Moore *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2002).

El presente trabajo pretende generar un mapa de ligamiento del genomio del camarón blanco *L. vannamei* utilizando la estrategia de pseudocruce de prueba combinada con la técnica de AFLP. Este primer mapa servirá como punto de partida para trabajos posteriores que permitan ubicar genes de resistencia u otros de interés comercial para integrarlos en forma acelerada en las líneas mejoradas producto de selección genética.

2. ANTECEDENTES

2.1. MAPA GENÉTICO

Un mapa genético describe la posición de genes o marcadores genéticos presentes en los cromosomas; entendiéndose por gen una secuencia específica de ADN que codifica para un polipéptido o ARN de un organismo y está sujeto a alteraciones mutacionales (Russell, 1992); y por marcador genético cualquier característica física o molecular heredable que difiere entre individuos y es detectable en condiciones de laboratorio (DOE Human Genome Program, 1992).

Los mapas genéticos pueden ser mapas físicos o mapas de ligamiento (Miesfeld, 1999). Los mapas genéticos físicos describen la localización de genes o marcadores genéticos directamente sobre los cromosomas, mientras que los mapas de ligamiento, son construidos en base a distancias de recombinación, las cuales resultan del entrecruzamiento o intercambio físico de ADN entre los cromosomas homólogos de los padres durante la meiosis (Russell, 1992).

Si dos o mas genes o marcadores genéticos son heredados de manera asociada, y no segregan en la progenie de manera independiente, es decir, no presentan herencia mendeliana, estos se encuentran ligados o localizados en el mismo cromosoma, por lo cual se dice que están en el mismo grupo de ligamiento. Si los genes se encuentran muy cerca uno del otro, su frecuencia de recombinación durante la meiosis será muy baja. Por otra parte a medida que se alejen uno del otro en el mismo cromosoma, su frecuencia de recombinación aumentará hasta llegar a un máximo de 50% de recombinantes (Russell, 1992).

El mapeo genético por recombinación es un análisis estadístico de los patrones de herencia de los genes y sus variantes (alelos). Estos pueden ser seguidos de una generación a la siguiente, basándose en la frecuencia en que las copias materna y paterna son intercambiadas por recombinación meiótica para producir nuevos genotipos. (Miesfeld, 1999). Sin embargo estas frecuencias de recombinación no son uniformes en todas las regiones del genoma y se observan desviaciones de estos valores causadas por múltiples entrecruzamientos durante la meiosis. Para corregir estos valores se utilizan las 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, donde una unidad de mapa equivale a la distancia entre pares de genes que han tenido 1% eventos de recombinación. Esta unidad también es llamada centiMorgan (cM) en honor a su descubridor Thomas Morgan (Miesfeld, 1999).

En un mapa genético de ligamiento se muestra la localización relativa de marcadores específicos a lo largo del cromosoma (Russell, 1992). Estos marcadores deben ser polimórficos, es decir, deben existir en formas alternativas entre individuos para que puedan ser detectados entre los diferentes miembros de una familia estudiada. Este polimorfismo está dado por variaciones en la secuencia de ADN. (DOE Human Genome Program, 1992).

Previo a la construcción de un mapa de ligamiento con marcadores moleculares, estos 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 a el ajuste que los marcadores presenten a las proporciones mendelianas 1:1 o 3:1, 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 analizados aumenta, se han diseñado programas de mapeo como Map Manager (Mainly *et al*, 2001) y Map Maker (Lander *et al*, 1987) que facilitan esta labor, permitiendo calcular fácilmente distancias genéticas de recombinación entre marcadores y obtener una visión gráfica de los mismos organizándolos por grupos de ligamiento.

2.2. MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético y poseen un patrón de herencia caracterizable (DOE Human Genome Program, 1992). Estas pueden ser proteínas (antígenos e isoenzimas) y ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida) (Montaldo y Meza-Herrera, 1998; Davis y Hetzel, 2000).

Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico (Miesfeld, 1999). Dentro de las técnicas más utilizadas para obtener marcadores moleculares se encuentran:

2.2.1. <u>RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism):</u>

Esta técnica involucra la extracción, purificación y producción de fragmentos de ADN de distinto peso molecular por digestión con una sola enzima de restricción (Grodzicker *et al.*, 1974; Botstein *et al.*, 1980). Los fragmentos resultantes son separados de acuerdo a su longitud en un gel de electroforesis y posteriormente son transferidos a un soporte sólido (membrana de nylon o nitrocelulosa) en el cual los fragmentos de interés son identificados por hibridación con sondas de ADN marcadas con radioisótopos. La visualización se realiza por autoradiografía (Beckmann y Soller, 1986). García *et al.* (1994) evaluaron la diversidad genética de tres poblaciones de *L. vannamei* libres de patógenos mediante RFLP, utilizando sondas de ADN mitocondrial, observando suficiente variabilidad genética para seleccionar individuos con características de interés. Sin embargo por ser una técnica que requiere de grandes cantidades de ADN, sondas pre-establecidas y elevados costos, esta ha sido reemplazada por otras (Moore y Lehnert, 1998).

2.2.2. <u>RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA):</u>

Es una técnica versátil que utiliza iniciadores de secuencias arbitrarias que amplifican por PCR (Polymerase chain reaction) áreas específicas distribuidas al azar por el genoma (Williams, *et al.*, 1990). Los fragmentos amplificados resultantes pueden ser separados en geles de agarosa o poliacrilamida, con el fin de obtener perfiles electroforéticos que variarán según el polimorfismo de los distintos individuos o grupos de individuos (Dinesh, *et al.*, 1995). Esta técnica es cómoda, rápida, requiere poco ADN, no presupone conocimientos previos sobre la secuencia. Sin embargo los fragmentos amplificados no suelen corresponder a ADN ligado a algún carácter, sino redundante y su repetibilidad puede variar si las condiciones experimentales cambian levemente (Benecke, 1998).

Los RAPDs han sido utilizados para la detección de polimorfismo intra e interespecifico en el Pez gato *Ictalurus punctatus* (Liu *et al.*, 1999), encontrando niveles bajos intraespecíficos y variables interespecíficos de polimorfismo, además de variabilidad en la reproducibilidad de los perfiles electroforéticos dependiendo del iniciador utilizado. En camarones esta técnica ha sido usada en *P. monodon* (García y Benzie, 1995), encontrando bajo polimorfismo (6 y 7%) en dos de los catorce iniciadores utilizados, y en *L. stylirostris* (Aubert y Lightner, 2000) identificando poblaciones genéticas diferentes de estos crustáceos en el Golfo de California.

2.2.3. SSR (Simple Sequences Repeats):

Es una técnica que utiliza secuencias polimórficas y abundantes en los genomas, denominadas "microsatélites", que consisten en mono-, di-, tri- y tetranucleótidos repetidos en tándem a lo largo del ADN (Weber y May, 1989). Estos microsatélites son clonados y secuenciados para generar iniciadores que por medio de PCR amplifiquen fragmentos específicos en un genoma determinado. Al ser separados en geles de electroforesis conforman marcadores de tipo codominante con patrón de herencia mendeliana (Senior *et al.*, 1998). Los SSR implican altos costos en la clonación y secuenciación de los fragmentos y aunque se han desarrollado variantes como los microsatélites amplificados selectivamente (SAM) que permiten obtener SSR sin previa secuenciación y con solo un iniciador específico para la región conservada que rodea las secuencias repetidas, estos solo son útiles en casos en donde se necesite un número bajo de marcadores informativos o en las etapas finales de los mapas de ligamiento donde se necesita unir los espacios entre grupos de ligamiento (Hayden y Sharp, 2001).

2.2.4. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism):

Esta técnica desarrollada por Vos *et al.* (1995), combina el uso de enzimas de restricción e iniciadores (oligonucleótidos) para PCR, de manera que se obtienen marcadores moleculares muy específicos sin necesidad de conocer la secuencia con anterioridad. El ADN es cortado con dos enzimas de restricción, una de corte frecuente y otra de corte poco frecuente. A los fragmentos se les ligan oligonucleótidos de extremos compatibles con las enzimas usadas y se amplifican los fragmentos resultantes por PCR (Savelkoul *et al.*, 1999) (Figura 1). Una ventaja especial de esta técnica es la de generar muchos marcadores moleculares de bajo peso en una sola reacción, por esta razón el resultado debe resolverse en geles de electroforesis de poliacrilamida, capaces de detectar los pequeños fragmentos (Savelkoul *et al.*, 1999).

AFLP es una técnica robusta en donde los resultados no son afectados por pequeños cambios en los parámetros de amplificación y donde la baja sensibilidad a las variaciones en la concentración del ADN molde, permite obtener patrones muy similares de bandeo utilizando cantidades que varían hasta 1000 veces su concentración (2.5 pg – 25 ng)

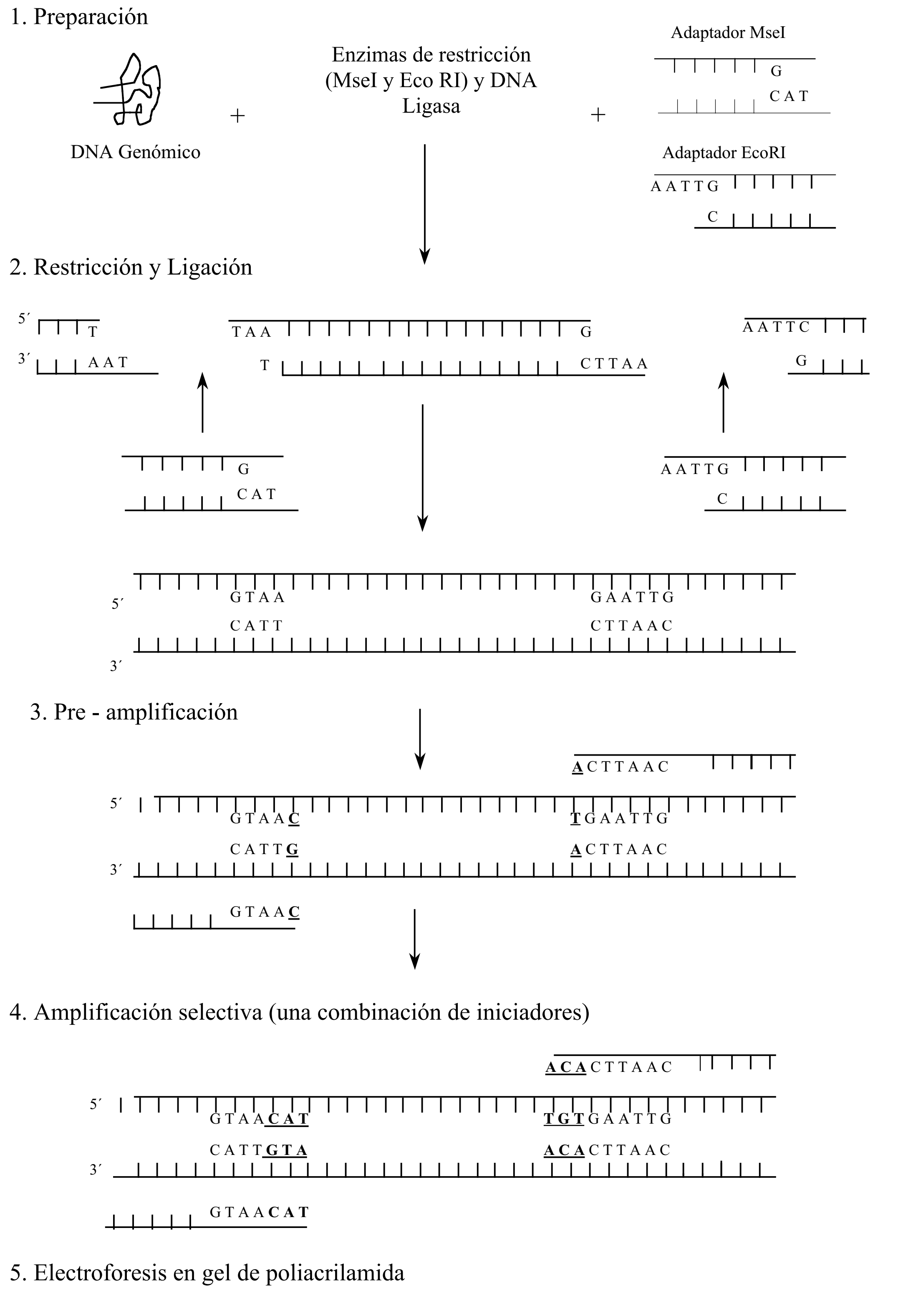

Figura 1. Representación esquemática de AFLP (Tomado de **Chen X. (2000)**).

resultando en una gran cantidad de fragmentos amplificados (20 a 100) (Vos *et al*., 1995). Sin embargo esta técnica necesita de ADN de alta calidad para su desarrollo, para lo cual el método de extracción de CTAB es uno de los más recomendados (Stewart y Via, 1993).

Para la visualización de los fragmentos los iniciadores pueden ser marcados con radio isótopos (Liu *et al*., 1998; Moore *et al*., 1999;) o tintes fluorescentes (Hookey *et al*., 1999; Agresti *et al*., 2000; Wilson *et al*., 2002) y ser observados por autoradiografía o scanner fluorescente respectivamente. Aunque estos métodos poseen un alto poder de resolución, son relativamente caros e inaccesibles para investigadores que no posean los equipos adecuados (Briard *et al*., 2000). Como alternativa se han desarrollado métodos como la tinción de plata (Briard *et al*., 2000; Mano *et al*., 2001) y la tinción con bromuro de etidio (Scott *et al*., 1998; Vandemark, 1999) que permiten visualizar los fragmentos producidos con alta resolución.

2.2.4.1. Uso de AFLPs en Acuacultura

En cuanto a especies acuícolas se refiere, la técnica de AFLP ha sido utilizada en la identificación de híbridos interespecíficos de Pez gato, *Ictalurus punctatus* e *Ictalurus furcatus* (Liu *et al*, 1998) y de Esturión, *Acipenser naccarii* y *Acipenser transmontanus* (Congiu *et al*., 2001) ; obteniendo en el primer caso alta reproducibilidad de la técnica y gran cantidad de bandas polimorficas interespecíficas (35 – 76%) útiles para el inicio del mapa genético de las dos especies (*I. punctatus* e *I. furcatus*), y en el segundo caso, el control de contaminación accidental de híbridos en poblaciones silvestres en peligro de extinción.

Se han publicado mapas genéticos de especies acuicolas desarrollados con la técnica de AFLP, como el de Medaka, *Oryzias latipes* (Naruse *et al.*, 2000), con 488 marcadores, constituyendo 24 grupos de ligamiento, correspondientes a 24 cromosomas de la especie, para un total de 1354,5 cM de longitud de genomio; y el mapa de Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Agresti *et al*, 2000) con 167 AFLPs ubicados en 24 grupos de ligamiento correspondientes a 22 cromosomas de la especie con una longitud de genomio de 1632 cM.

En camarones han sido publicados los mapas genéticos para *P. japonicus* (Moore *et al*, 1999) y *P. monodon* (Wilson *et al*, 2002) donde para el primero se generaron 246 AFLPs, incorporando 129 de ellos en 44 grupos de ligamiento, cubriendo aproximadamente 57% del genoma total; y en el segundo 63 AFLPs, ubicados en 20 grupos de ligamiento comunes para tres familias analizadas que cubrieron una distancia de 1412 cM. Ambos mapas desarrollados con familias procedentes de programas de mejoramiento, obteniendo un cubrimiento de baja densidad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Cuatro parejas de reproductores (macho y hembra) y sus progenies, provenientes de un laboratorio de larvicultura comercial con un esquema de domesticación mantenido por 5 generaciones fueron utilizados como material biológico inicial de trabajo.

Una vez comprobado el éxito de las cópulas con la eclosión de los nauplios, los reproductores fueron sacrificados preservando la mitad del tejido muscular en etanol al 99% mientras que la otra mitad fue congelada a temperatura de –20 ºC . Los nauplios obtenidos de los cuatro cruces fueron cultivados de forma separada en las instalaciones del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) inicialmente en tanques de 50 L a densidad de 100 nauplios/L, siguiendo los protocolos establecidos. A partir de el estadio de postlarva 12, los animales se trasladaron a tanques de 500 L a densidad de 1 camarón/L con aeración permanente, recambio de 70% de agua semanal, alimento de 40% de proteína dos veces al día a razón de 5% de la biomasa calculada. Los animales fueron cosechados 12 semanas después cuando alcanzaron 1g de peso promedio.

3.2 EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN fue extraído de músculo abdominal, siendo este, fresco en el caso de la progenie y congelado en el caso de los reproductores. El método utilizado para la extracción fue el de CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) descrito por Shahjahan *et al*. (1995), con algunas modificaciones. El protocolo completo modificado se describe en el anexo 1. La concentración de ADN fue determinada por espectrofotometría con un equipo Gene Quant, PHARMACIA®, utilizando una dilución de 1/20 para la lectura. La concentración del ADN por muestra fue estandarizada en 40 ng/µl. El DNA fue conservado en tampón TE 1X a temperatura de –20°C.

3.3. AFLPs

Los AFLPs se obtuvieron siguiendo la metodología propuesta por Vos *et al.* (1995). Se modificó la primera reacción usando un procedimiento de digestión-ligación en un solo paso, según lo descrito por Hawthorne (2001). Para esto se utilizó un termociclador PTC 200 MJ Research, enzimas de restricción de Invitrogen®, enzimas Ligasa y Taq polimerasa de Promega®, Tampón tango Y de MBI Fermentas® y oligonucleotidos (adaptadores e iniciadores) sintetizados por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Columbia Británica . Los protocolos para la elaboración de las soluciones concentradas y de uso se describen en el anexo 2.

Se realizaron pruebas preliminares con cada una de las enzimas utilizadas al igual que con las soluciones para pre-amplificación y amplificación comparando su acción con controles negativos (DNA completo sin cortar) con el fin de determinar el buen estado de los reactivos y la efectividad de la técnica bajo las condiciones locales del laboratorio.

3.3.1. Preparación de los adaptadores

Se utilizaron dos adaptadores para los sitios de corte de las enzimas *EcoRI* y *MseI* para las cadenas de ADN principal y complementaria, en concentración de 5 mM para *EcoRI* y de 50 mM para *MseI*. Estos se mezclaron dando como resultado dos soluciones, las cuales fueron denaturadas a 90 ºC por un minuto y luego renaturadas lentamente a temperatura ambiente, para ser usadas en el proceso de ligación.

3.3.2. Digestión y ligación de ADN

Dos microlitros de solución de ADN (40 ng/µL) fueron añadidos a 10 µL de solución de digestión y ligación, como se indica en la tabla 1.

Esta reacción fue incubada por un período de 3 horas a 37 ºC. Posteriormente se realizó una dilución 1:10 con agua MilliQ y esta se utilizó en el siguiente paso de preamplificación.

Tabla 1. Reactivos utilizados para la reacción de digestión y ligación.

Reactivo	Concentración original	Concentración final en muestra	Volumen por muestra
H_20 MilliQ			4,15 µL
Tango Y Tampón	10 X	2 X	2 µL
Adaptador *EcoRI*	5 µM	4 pmol	0,8 µL
Adaptador *MseI*	50 µM	50 pmol	1 µL
ATP	10 mM	0,5 mM	0,5 µL
Ligasa	1 U/µL	1 U/muestra	1 µL
MseI	10 U/µL	3 U/muestra	0,3 µL
EcoRI	10 U/µL	2,5 U/muestra	0,25 µL
DNA	40 ng/µL	40 ng/µL	2 µL

3.3.3. Preamplificación

Para la reacción de preamplificación se tomaron 2 µL de la solución de ligación y se mezclaron junto con agua, PCR-tampón, $MgCl_2$, dNTPs, Taq polimerasa y oligonucleótidos para *EcoRI* y *MseI*, con una base selectiva, como se observa en la tabla 2.

El perfil de ciclos de la preamplificación comprendió una temperatura inicial de 72 ºC por 20 segundos, denaturación a 94 ºC por 2 minutos seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, alineación a 56 ºC por 1 minuto y extensión a 72 ºC por 1 minuto. Finalmente se hizo una extensión adicional de 72 ºC por 1 minuto.

El producto preamplificado fue diluido en una relación 1:10 para ser utilizado en el siguiente paso.

Tabla 2.Reactivos utilizados para la reacción de pre-amplificación.

Reactivo	**Concentración original**	**Concentración final**	**Volumen por muestra**
H_20			14.5 µL
PCR-Tampón	10 X	1 X	1,85 µL
$MgCl_2$	25 µM	1,5 µM	1,14 µL
DNTPs	10 µM	0,20 µM	0,38 µL
TAQ	5 U/ µl	1 U/25 µL	0,15 µL
Eco +x	20 µM	0,20 µM	0,19 µL
Mse +x	20 µM	0,20 µM	0,19 µL
Producto de ligación			2 µL

3.3.4. Amplificación

El protocolo de amplificación se observa en la tabla 3. Se utilizó 1,3 µl del producto de preamplificación diluido y los oligonucleotidos para *EcoRI* y *MseI* con tres bases selectivas. El perfil de ciclos utilizado fue idéntico al descrito en la preamplificación.

Tabla 3. Reactivos utilizados para la reacción de amplificación.

Reactivo	Concentración original	Concentración final	Volumen por muestra
H_20			10,19 µL
PCR-Tampón	10 X	1 X	1,36 µL
$MgCl_2$	25 µM	1,5 µM	0,82 µL
DNTPs	10 µM	0,25 µM	0,34 µL
TAQ	5 U/µL	1 U/25 µL	0,11 µL
EcoRI iniciador	20 µM	0,6 µM	0,4 µL
MseI iniciador	20 µM	0,6 µM	0,4 µL
Producto de preamplificación			1,3 µL

3.4. GEL DE POLIACRILAMIDA

El volumen total de cada muestra amplificada fue mezclado con 2 µL de tampón de carga (anexo 2). De esta mezcla 12 µL se depositaron en geles de poliacrilamida al 8% (acrilamida/bisacrilamida 29:1) no denaturantes, de 1 mm de espesor, elaborados según el protocolo descrito en el anexo 3. Para la corrida de estos se utilizaron dos equipos de secuenciación manual, modelo S2 de Life Technologies Gibco BRL y modelo S3S de Owl con un tamaño de gel de 33 x 41,3 cm y 35 x 45 cm respectivamente. La cámara superior fue llenada con tampón TBE 0,5X y la inferior con TBE 1X (Anexo 2). Los geles se precorrieron a 1000 voltios por 30 minutos y posteriormente fueron cargados con 46 muestras correspondientes a los progenitores por duplicado y 42 hijos, además de el marcador de tamaño 100 bp DNA leader de Promega®. Finalmente estos fueron corridos a 1000 voltios por 4 horas, tiempo requerido para que la línea de xylene cyanol del tampón de carga saliera del borde inferior del gel.

3.5. TINCION DE PLATA

Una vez terminado el tiempo de corrida, los geles se desmontaron retirando el vidrio delantero y colocándolos suavemente en las cubetas con solución de tinción. Se usó 1,5 L de cada solución para tinción (tabla 4), siendo cada solución reutilizada 8 veces en promedio.

Tabla 4. Composición de las soluciones para tinción de plata y tiempo de reacción de cada una sobre el gel de poliacrilamida (Dinesh *et al.*, 1995).

PASO	SOLUCIONES	TIEMPO
Fijación	10 % Etanol + 5% Ácido Acético	15 minutos
Impregnación	0,011 M Nitrato de plata	25 minutos
Lavado	Agua desionizada	1 minuto
Revelado	0,75 M NaOH + 0,085 M formaldehído	10-15 minutos
Parada	0,07 M Carbonato de Sodio	5 minutos

Una vez terminada la tinción los geles fueron secados al aire durante una hora, posteriormente fueron protegidos con una película de acetato para evitar el deterioro de los mismos.

3.6. FOTOGRAFÍA

La fotografía de los geles se realizó sobre un caja de luz blanca, con una cámara Kodak DC120 y el programa EDAS (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120) de Kodak. Las fotografías fueron almacenadas como material de apoyo y confirmación.

3.7. ANÁLISIS DE LOS GELES

Los geles fueron examinados visualmente, codificando la presencia y ausencia de bandas (marcadores) como 1 y 0 respectivamente. Solo se tomaron en cuenta las bandas claramente visibles y definidas.

3.8. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO Y TAMAÑO DE GENOMA

Los datos fueron ingresados en una hoja de cálculo de Excel y desde allí fueron analizados inicialmente con la prueba de χ^2 seleccionando aquellos marcadores que se ajustaron a las proporciones mendelianas esperadas 1:1 y 3:1 con un valor $p > 0,05$.

Debido al desconocimiento del genotipo del padre, se utilizó una estrategia de pseudocruce de prueba (Gratapaglia *et al.*, 1994; Tan *et al.*, 2001) en donde a partir de la información genotípica de la madre y la progenie la información del padre es deducida.

Los marcadores seleccionados fueron codificados como fe# si su procedencia era materna y ma# si su procedencia era paterna, el número de cada marcador fue asignado de acuerdo al orden de aparición de la banda en el gel. Los datos codificados fueron exportados al programa Map Manager (Manly *et al.*, 2001) en donde un marco inicial de grupos de ligamiento o cromosomas fue determinada con un valor LOD (logarithm of odds ratio) de 3, el cual indica que los marcadores en cuestión tienen una probabilidad de 0,001 de no estar ligados.

Los marcadores no ligados en esta primera estructura fueron nuevamente ingresados con un valor LOD de 2 (p = 0,01) usando el comando "distribute". Como la fase de respulsión/acoplamiento en la que se encontraban los marcadores dominantes era desconocida, la fase de los marcadores remanentes no ligados fue invertida con el comando "Flip" y posteriormente fueron nuevamente asignados mediante el comando "Distribute" al grupo de cromosomas ya formando con un valor LOD de 2.

Una vez definidos los cromosomas, cada uno fue inspeccionado usando las ventanas de construcción y estadística. Los marcadores incorporados por el programa con valores de LOD menores a 2 fueron descartados.

Para evitar la expansión de dobles recombinantes en el mapa, este fue revisado utilizando la ventana de genotipo. Los genotipos fueron excluidos de los grupos de ligamiento específicos si se detectaban dobles cruzamientos en distancias menores a 20 cM. Las distancias genéticas fueron calculadas usando la función de Kosambi (Kosambi, 1944). Los grupos de ligamiento generados por el programa Map manager fueron revisados con el programa Mapmaker/EXP 3.0, el cual ha sido tradicionalmente usado para generar mapas de ligamiento. En este mediante los comandos "Group", "Compare" y "Ripple" con la opción "error detection" activada, se realizaron nuevamente los análisis correspondientes.

El tamaño del genoma fue estimado siguiendo los métodos 3 y 4 descritos por Chakravarti *et al*. (1991). El tamaño del genoma (Ge) según Método 3 corresponde a la fórmula:

$$Ge = \frac{N(N-1)K}{K}$$

Con un intervalo de confianza :

$$IC = \frac{Ge}{\left(1 \pm 1{,}96 / \sqrt{k}\right)}$$

Siendo N el número de marcadores en la estructura, N(N-1) el número de combinaciones pareadas, X la distancia máxima entre dos marcadores adyacentes en cM a un valor LOD mínimo y K el número de marcadores pares en el mismo valor LOD mínimo.

En cambio, el tamaño del genoma (Ge) según el método 4 de los mismos autores es:

$$Ge = C\left(\frac{M+1}{M-1}\right)$$

Donde C es la longitud de cada grupo de ligamiento y M el número de marcadores presentes en cada grupo.

Para estos cálculos se tomaron en cuenta únicamente los marcadores ligados con valores LOD entre 3 y 9 evitando la sobreestimación del tamaño del genoma debido a los marcadores estrechamente ligados.

Para evaluar la distribución aleatoria de los marcadores en los grupos de ligamiento, se realizaron histogramas y pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnoff) con los valores estandarizados de la distribución de las frecuencias de las distancias entre marcadores. Adicionalmente se realizó una correlación de Pearson entre el número de marcadores y la longitud total de los grupos de ligamiento, todo esto con el programa STATISTICA (Statsoft Inc. versión 6.0). Los grupos de ligamiento fueron graficados con el programa Mapinspect (http://www.dpw.wau.nl/pv/pub/)

4. RESULTADOS

4.1. PRUEBAS DE PATERNIDAD

Con el fin de verificar la correspondencia entre las progenies obtenidas y los reproductores utilizados, se realizó una prueba de paternidad con el ADN de parentales y 10 hijos de cada una de las cuatro familias, observando las bandas compartidas entre estos, generadas por ocho combinaciones diferentes de iniciadores. Dos de las cuatro parejas de parentales arrojaron patrones de bandeo incompatibles con las familias asignadas a estos cruces, al igual que los machos de las dos familias restantes. De las cuatro familias levantadas solo dos con sus respectivas hembras progenitoras fueron aptas para iniciar el trabajo de mapeo. Por esta razón se utilizó el ADN de la hembra progenitora y 42 de los hijos de una de las dos familias aptas como población para generar el mapa de *L. vannamei*.

4.2. GENERACIÓN DE AFLPs

Se analizaron 100 combinaciones de iniciadores (Tabla 5), elaborando un gel de poliacrilamida por combinación generada. En promedio se obtuvieron 54 bandas por combinación, de las cuales el 13.7% fueron bandas polimórficas segregantes (marcadores) (Figura 2). Para las 100 combinaciones de iniciadores se obtuvo un total de 741 marcadores segregantes, 7.41 en promedio por gel en un rango de 0 a 14 marcadores .

Tabla 5. Combinaciones de iniciadores *MseI* y *EcoRI* con tres bases selectivas y marcadores polimórficos en proporciones 1:1 producidos por cada combinación.

EcoRI	*MseI*							
	CAC	CAG	CAA	CAT	CGG	CGC	CGA	CGT
AAA	2	1	10		3	8	2	3
AAC					6	5	7	9
AAG	10	8	3	2	3	4	6	9
AAT	8		3	5	5	8	4	5
ACA	1	4	6	3	5	1	9	3
ACC	3	4	3	5	5	6	11	10
ACG	6	8	6	2	4	7	2	
ACT	14	5	6	7	7	5	13	2
AGA			4	4	8	2	7	5
AGC	2	2	3	4	7		2	3
AGG	5	4			6	4		4
AGT	2				7			1
ATA					9	7	1	5
ATC					3		7	1
ATG					2	6		3
ATT					11	4	3	3

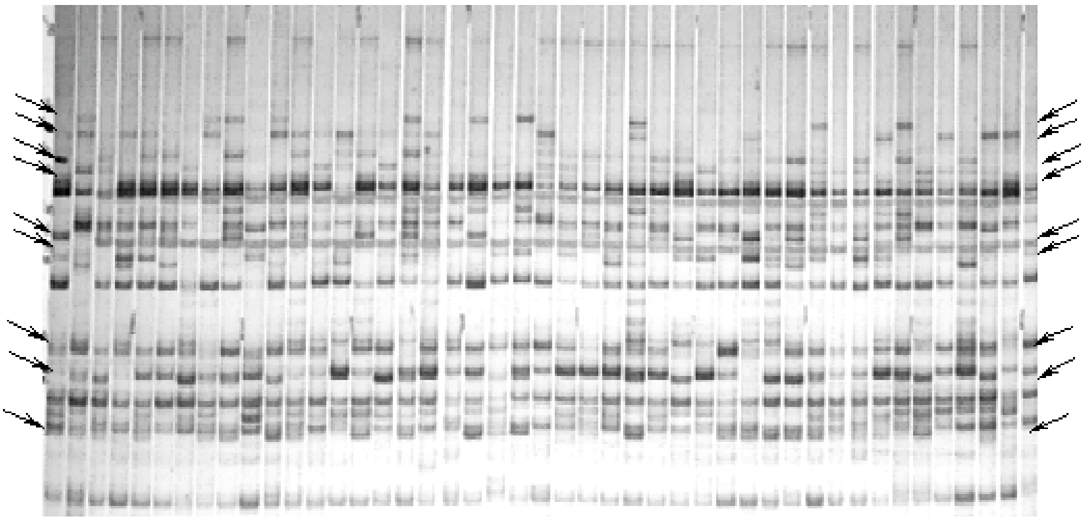

Figura 2. Patrones de bandas polimorficas segregantes generadas mediante la técnica de AFLPs en geles de poliacrilamida con tinción de plata.

4.3 CONSTRUCCIÓN DEL MAPA

La asignación de bandas marcadoras maternas y paternas se basó en un proceso secuencial. Inicialmente, se analizaron las proporciones de segregación de los marcadores obtenidos por medio del estadístico χ^2 buscando aquellos que se ajustaban a un patrón de segregación de proporciones 1:1 y 3:1 con un valor $p > 0,05$. El 63% de los marcadores segregantes se ajustaron a la proporción 1:1, el 24,0% a la proporción 3:1 y el 10.2% de los marcadores segregantes se ajustaron a ambas proporciones. El 2.8% de marcadores restante no se ajustó a ninguno de los modelos establecidos. Las bandas marcadoras con el patrón de segregación 1:1 fueron asignadas como maternas si estas se encontraban presentes en el patrón generado por la madre y paternas si sucedía lo contrario. Finalmente un total de 249 bandas segregantes en proporción 1:1 fueron asignadas como maternas y 228 como paternas.

Usando la estrategia de pseudocruce de prueba (Grattapaglia *et al.*, 1994; Tan *et al.*, 2001), se obtuvieron los mapas correspondientes al padre y la madre. El mapa de la hembra fue integrado por 212 marcadores distribuidos en 51 grupos de ligamiento cubriendo una longitud de 2771 cM (Figura 3). Un total de 155 marcadores fueron agrupados con valores LOD mayores a 3 y 57 marcadores con valores de LOD entre 2 y 3. El 86% de los marcadores derivados de la madre fueron ubicados en el mapa de la hembra. Un grupo de ligamiento formado por 2 marcadores con una distancia de ligamiento de 0 cM fue excluido de la figura 3 y de los cálculos de distancias promedio. Para el mapa de la hembra se

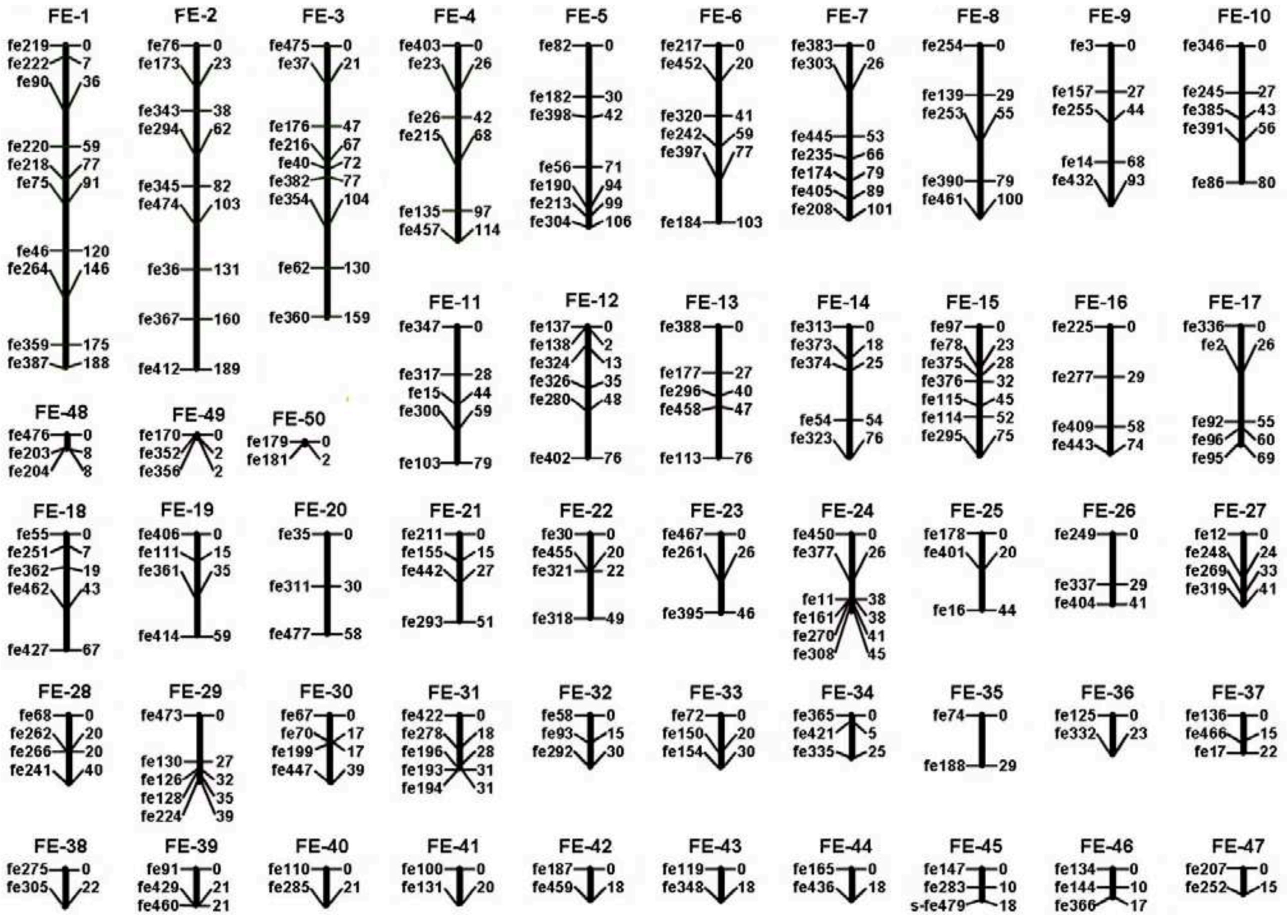

Figura 3. Mapa de ligamiento de la hembra de *Litopenaeus vannamei* con 51 grupos de ligamiento. En el lado izquierdo de cada grupo se observa el código asignado a cada marcador y en el lado derecho las distancias entre marcadores en cM.

creraron de 2 a 10 marcadores por grupo de ligamiento, con un promedio de 4,2 marcadores por grupo. La longitud total de estos grupos de ligamiento varió de 0 a 188 cM con 55,3 cM en promedio. La distancia promedio entre marcadores fue de 17,1 cM con un rango de 0 a 30 cM.

En el mapa del macho, 182 marcadores paternos fueron agrupados en 47 grupos de ligamiento cubriendo un total de 2116 cM (Figura 4). La estructura inicial del mapa comprendió 135 marcadores agrupados con valores LOD mayores a 3. A esta se le sumaron 47 marcadores con valores LOD entre 2 y 3. Los marcadores ma342 y ma410 fueron agrupados juntos con un valor LOD de 2. El 80% de los marcadores asignados como paternos fueron agrupados en el mapa del macho. La longitud de los grupos de ligamiento vario de 2 a 159 cM con un promedio de 45 cM. El rango del número de marcadores por grupo de ligamiento estuvo entre 11 y 2 con un promedio de 3,9. La distancia entre marcadores estuvo entre 2 cM y 30 cM con un promedio de 15,6 cM.

Aunque el análisis realizado por Map Manager y Mapmaker generó los grupos de ligamiento, se prefirió el programa Map Manager por que este permite una visualización más sencilla de las estadísticas de ligamiento, los genotipos y los mapas.

4.4. CARACTERÍSTICAS DEL MAPA

El tamaño del genoma estimado varió de acuerdo a los métodos de cálculo descritos por Chakravarti *et al.* (1991). El tamaño de genoma para la hembra fue de 5407 cM y para el

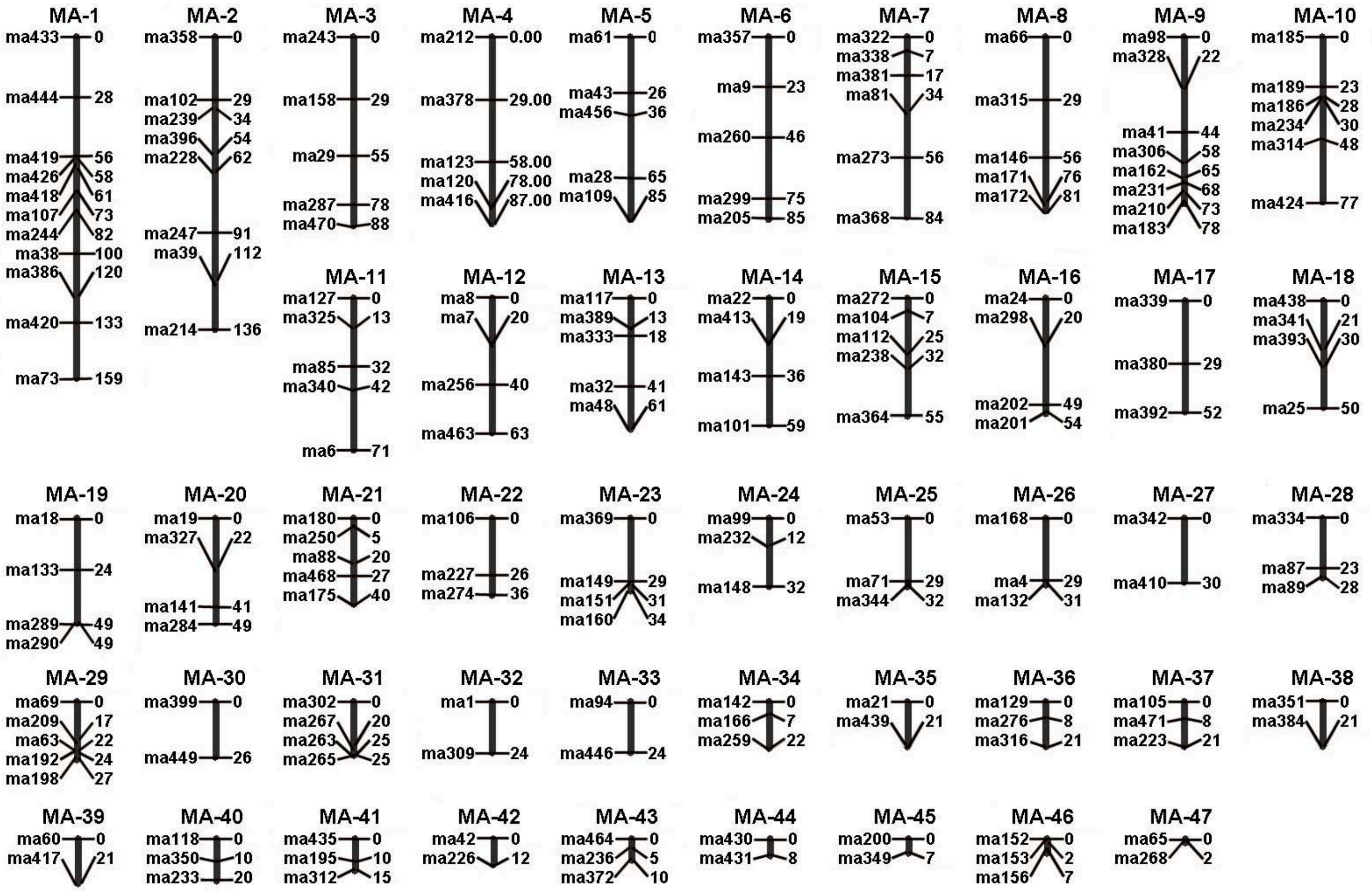

Figura 4. Mapa de ligamiento de el macho de *Litopenaeus vannamei* con 47 grupos de ligamiento. En el lado izquierdo de cada grupo se observa el código asignado a cada marcador y en el lado derecho las distancias entre marcadores en cM.

macho de 4333 cM según el método 3. El método 4 de el mismo autor arrojó un tamaño de mapa estimado de 4445 cM y 3584 cM para los genomas de la hembra y el macho respectivamente. Los intervalos de confianza para cada uno de los cálculos de cada uno de los métodos se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Tamaño de genoma calculado e intervalos de confianza para macho y hembra de *Litopenaeus vannamei* según métodos 3 y 4 de Chakravarti *et al*. (1991).

CARACTERISTICA	**HEMBRA *L. vannamei***	**MACHO *L. vannamei***
Tamaño de genoma (método 3)	5407 cM	4333 cM
Intervalo de Confianza (95%)	4701 cM – 6361 cM	3707 cM – 5207 cM
Tamaño de genoma (método 4)	4445 cM	3584 cM
Intervalo de Confianza (95%)	3865 cM – 5229 cM	3068 cM – 5342 cM

Considerando que el estimativo mas conservador es el derivado del método 4, se cubrió el 62% del genoma de la hembra y el 59% del genoma del macho de *L. vannamei* en este trabajo.

La prueba de normalidad de los datos del macho y de la hembra para la distribución de las frecuencias de las distancias entre marcadores mostraron una distribución no normal. Una inspección visual de los histogramas (Figura 5) muestra agrupamientos de las distancias genéticas estandarizadas en los extremos derecho e izquierdo de la distribución tanto para el mapa del macho como de la hembra.

El coeficiente de correlación de Pearson entre longitud y número de marcadores por grupo de ligamiento fue alto siendo para la hembra de 0,91 y para el macho de 0,89 con un nivel de significación de P < 0,001. Esto demostró que los marcadores AFLP de los mapas para hembra y macho de *L. vannamei* se distribuyeron aleatoriamente.

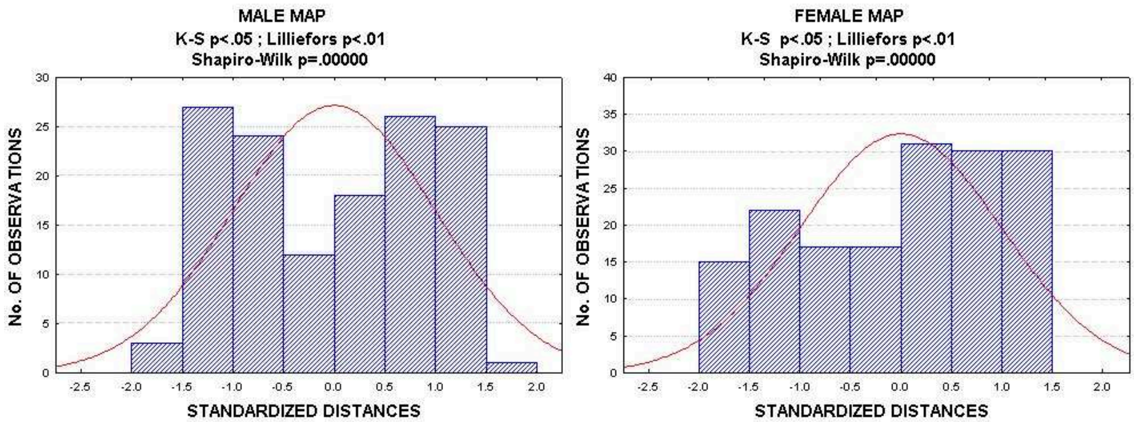

Figura 5. Histogramas de la distribución de las frecuencias de las distancias entre marcadores de macho y hembra de *Litopenaeus vannamei.*

En algunos casos se observó que marcadores amplificados con la misma combinación de iniciadores se localizaron en el mismo cromosoma, como en el caso del grupo de ligamiento fe-1. Durante la colección de los datos se encontró que marcadores diferentes en el mismo gel segregaron con un patrón idéntico. En este caso estos marcadores no fueron incluidos en el análisis.

5. DISCUSIÓN

Se generó el primer mapa genético de ligamiento de camarón blanco *L. vannamei* basado en AFLPs, a partir de una familia proveniente de un cruce comercial y con la información genética de la hembra progenitora y 42 hijos.

Los AFLPs son marcadores dominantes en donde una banda esta presente en el reproductor de genotipo homocigoto dominante (AA) o heterocigoto (Aa), y ausente en el reproductor de genotipo recesivo (aa), permitiendo ubicarla en uno de los reproductores y en el 50 o 100% de su progenie. En dos de las cuatro familias evaluadas con ocho combinaciones diferentes de iniciadores, el 100% de individuos utilizados para la prueba de parentesco (n=10 por familia) no presentaron en repetidas ocasiones algunas bandas existentes en el genotipo de los parentales asignados. La probabilidad de que un marcador perteneciente a un padre heterocigoto sea heredado por uno de sus hijos es de 0,5, por lo tanto haciendo un análisis binomial, la probabilidad de que este marcador no se presente en el perfil de diez hijos evaluados es de 0,00097 ($p < 0,001$). Teniendo en cuenta que el porcentaje promedio de bandas polimórficas por gel fue de 13,7% (7,1 marcadores) y que se probaron 8 combinaciones diferentes de iniciadores para cada familia, la presencia de marcadores en los padres y ausencia de los mismos en la progenie fue razón suficiente para que estas familias fueran descartadas de los análisis posteriores. En las dos familias restantes aunque el macho presentó el mismo problema, la correspondencia de los genotipos de la hembra con los individuos de la progenie fue total.

Se han realizado pruebas efectivas de parentesco para *P. monodon* con marcadores RAPDs, (García y Benzie, 1995) y para *P. monodon* y *P. japonicus* con microsatélites (Moore *et al.,* 1999; Wilson *et al.,* 2002). Para *L. vannamei* aún no han sido desarrollados microsatélites especie-específicos, siendo los AFLPs una alternativa ventajosa en situaciones de confusión, como las producidas por errores de manejo a nivel de producción masiva de larvas en laboratorio, o en selección de reproductores, en donde puede ser de gran utilidad confirmar el parentesco entre animales de interés.

Las estrategias de mapeo tradicionales usadas en camarones han utilizado la información genética de ambos progenitores y pedigríes específicos (Moore *et al.*, 1999; Wilson et *al.*, 2002). Para este estudio se realizó el mapa de ligamiento empleando el sistema de pseudocruce de prueba (Grattapaglia *et al*., 1994), en el cual la población mapeada proviene del cruce de dos padres heterocigotos no relacionados, donde el análisis de los AFLPs en fase de acoplamiento resulta en un mapa de ligamiento para cada parental, basado en los marcadores pertenecientes a los dos progenitores y segregantes en la progenie.

Esta técnica ha sido utilizada en especies animales donde la meiosis es suprimida en uno de los dos sexos (Tan *et al.*, 2001) y en cruces interespecíficos de plantas (Cervera *et al.*, 2001). Utilizando este sistema y AFLPs, la información genotípica de la hembra fue usada para deducir la información genotípica del macho, asignando el 47,8 % de los marcadores disponibles al mapa del macho y el 52,2 % al de la hembra.

El número promedio de bandas polimórficas detectadas en este trabajo por combinación de iniciador fue de 7,1, cercano a 6,7 reportado para *I. punctatus* (Liu *et al.*, 1998) y menor a 14,2 y 10 reportados para *P japonicus* y *P. monodon* respectivamente (Moore *et al.,* 1999; Wilson *et al.*, 2002). Para *P. stylirostris*, se demostró de forma indirecta a través de la heterosis asociada a microsatélites que poblaciones con alto grado de consanguinidad, presentan mayor proporción de genes en homocigosis que afectan de forma negativa el crecimiento o la supervivencia de la progenie (Bierne *et al.*, 2000). Debido al desconocimiento del pedigrí de la familia analizada, no es claro si el bajo polimorfismo presentado se debió a características intrínsecas del genoma de *L. vannamei* o a un alto grado de consanguinidad en la población mapeada.

El porcentaje de marcadores segregantes para *L. vannamei* fue de 64% para el modelo de proporción 1:1 (retrocruzamiento) y de 24,5% para el modelo de proporción 3:1 (entrecruzamiento). Estos porcentajes guardaron una relación similar a la reportada para *P. japonicus* de 72,3 % y 27,7% y para *P. monodon* de 71,05% y 28,05% respectivamente (Moore *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2002). Sin embargo a diferencia de estos dos trabajos anteriores, en *L. vannamei* se observaron bandas que no se ajustaron a ninguno de los dos modelos esperados, representando el 2.8% del total de bandas polimórficas generadas, valor que podría ser mayor teniendo en cuenta que no se incluyeron para el análisis algunos marcadores con demasiadas o muy pocas bandas presentes en la progenie y que inicialmente fueron considerados como artefactos del proceso.

El nivel de significación de la prueba de χ^2 para la inclusión de las bandas en el mapa de ligamiento fue de 5%. Tomando en cuenta que la probabilidad de que ocurran dos eventos independientes es la multiplicación de las probabilidades de estos eventos, el porcentaje esperado de bandas que no se ajustan a los modelos 1:1 y 3:1 es de 0,25 %. Sin embargo 2.8% de bandas no se ajustaron a los modelos propuestos. Una prueba de proporciones demostró que el porcentaje obtenido fue significativamente diferente al esperado, con un valor $p < 0,001$, comprobando de esta manera la presencia de distorsión en la segregación. Este fenómeno ha sido reportado anteriormente en plantas como la cebada con un nivel de 12% (Mano *et al.*, 2001) y en animales como la Tilapia con el 8% (Kocher *et al.*, 1998) y el Gusano de seda con un 54% (Tan *et al.*, 2001). La distorsión en la segregación puede ser causada por la presencia de genes letales o genes híbridos de esterilidad que causan abortos de los gametos o cigotos (Russell, 1992), o errores de muestreo en poblaciones muy pequeñas (Tan *et al.*, 2001) entre otros. En el caso de *L. vannamei* la distorsión en la segregación pudo ser causada por un nivel de consanguinidad alto, el cual favorecería la aparición de genes letales en homocigosis caso similar al descrito por Bierne *et al.* (2000) para dos poblaciones aisladas de *L. stylirostris.*

El genoma haploide de *L. vannamei* es de 44 cromosomas (Chow *et al.*, 1990). El mapa aquí reportado para hembra y macho fue conformado por 51 y 47 grupos de ligamiento respectivamente. Los grupos de ligamiento extra obtenidos pueden ser explicados por la ausencia de marcadores intermediarios conectores entre grupos de ligamiento que forman parte de un solo cromosoma. Un bajo cubrimiento del genoma puede contribuir también al no ligamiento de marcadores pertenecientes al mismo cromosoma, como se observó en este estudio.

Se espera que los marcadores AFLPs se distribuyan al azar a lo largo del genoma cuando el polimorfismo esta aleatoriamente distribuido (Vos *et al.*, 1995). Esta asunción fue evaluada por dos vías. Las pruebas de normalidad reflejaron la presencia de agrupamientos a cada lado de la curva. En el lado izquierdo de la distribución, los agrupamientos de distancias cortas pueden ser explicados por un fenómeno de supresión de la recombinación, en áreas cercanas al centrómero (Singer *et al.*, 2002). De otro lado, un mapa de baja saturación, puede mostrar agrupamientos de grandes distancias que obedecen a la existencia de espacios amplios que no han sido ocupados por marcadores. En este caso, la distribución no normal de las distancias entre marcadores y la presencia de grupos extra de ligamiento fueron causados probablemente por la ausencia de marcadores conectores.

El coeficiente de correlación de Pearson fue alto para ambos mapas (0,91 para la hembra y 0,89 para el macho), indicando que aunque las distancias entre marcadores no se distribuyeron normalmente, los marcadores se distribuyeron de forma aleatoria a lo largo del genoma, mostrando una relación lineal en la que los cromosomas de mayor tamaño tuvieron el mayor número de marcadores agrupados, confirmando que los marcadores AFLPs se distribuyeron de manera aleatoria a lo largo de los cromosomas.

El tamaño estimado de genoma para *P. japonicus* fue de 2300 cM (Moore *et al.*, 1999). El cubrimiento efectivo en este trabajo fue de 2771 cM para la hembras y 2116 cM para el macho, sin embargo la estimación del tamaño total del genoma de *L. vannamei* según el método 4 de Chakravarti *et al*. (1994) fue de 4445 cM para la hembra y 3583 cM para el macho. Los agrupamientos en el lado derecho de ambos mapas y la presencia de grupos extra de ligamiento indican que el mapa obtenido en este estudio tiene un cubrimiento de baja densidad. Los mapas de *P. japonicus* y *P. monodon* con una estimación menor del genoma pueden tener tasas de recombinación menores al ser comparadas con *L. vannamei*. Sin embargo es de resaltar que la estimación para el tamaño del genoma de *P. japonicus* fue hecha por el método de "Bootstrapping", una técnica que puede no ser efectiva con un cubrimiento bajo del genoma.

El mapa de la hembra tuvo un tamaño 24% superior a el mapa del macho, Wilson *et al*. (2002), encontró una tendencia similar en *P. monodon.* En especies como el pez Zebra (Singer *et al*., 2002) y el Salmón (Sakamoto *et al*, 2000) la tasa de recombinación genética no es uniforme a lo largo de los cromosomas y entre sexos, observando supresión de la recombinación en machos, generando para estos, genomas más pequeños a partir de mapas de ligamiento como se presentó en este estudio.

La integración de los mapas del macho y de la hembra no fue posible usando los marcadores 3:1 equivalentes a una configuración de entrecruzamiento. En los marcadores dominantes la configuración de entrecruzamiento (relación 3:1) solo brinda la información genética precisa de un cuarto de la población que corresponde a genotipos recesivos homocigotos sin bandas (aa), mientras que no es posible diferenciar específicamente los genotipos homocigotos dominantes de los heterocigotos (AA y Aa), ya que ambos generan bandas en el gel. La integración de los mapas de macho y hembra sería posible usando marcadores moleculares codominantes de tipo ESTs, microsatélites, RFLPs y SCARs, donde los tres genotipos (AA, Aa y aa) pueden ser identificados.

Los protocolos implementados permitieron la generación de una alta cantidad de datos a bajo costo. El uso de la tinción de plata para la visualización de los fragmentos de DNA brindó un nivel de detección promedio de 54 bandas por combinación de iniciadores, similar a lo producido Wilson *et al.* (2002) usando un sistema de detección fluorescente. La tinción de plata es una técnica fácilmente implementada y que no requiere el uso de equipo especializado como secuenciadores automáticos. En el curso de este trabajo se procesó un máximo de 8 geles por día con las mismas soluciones de tinción. Es probable que se pueda revelar una mayor cantidad de geles con las mismas soluciones, lo cual podría hacer este proceso aún más económico. Adicionalmente los protocolos de tinción de plata son realizados a temperatura ambiente evitando el uso de soluciones refrigeradas, siendo esta una ventaja frente al protocolo de tinción de plata tradicional desarrollado por Bassam *et al.* (1991) e implementado por PROMEGA®. El protocolo de AFLP y tinción de plata desarrollado en este estudio fue efectivo para generar información de ligamiento en *L. vannamei*.

Un mapa con alto cubrimiento, como el necesario para el mapeo de QTLs, requiere marcadores ligados a una distancia máxima de 20 cM. Debido a los agrupamientos observados en nuestro mapa y la talla de genoma calculado, alrededor de 300 loci codominantes deben ser mapeados. Alternativamente una estrategia combinada, usando marcadores dominantes y al menos 1 marcador codominante anclado a cada cromosoma podría ser posible.

6. CONCLUSIONES

Utilizando la técnica de AFLPs, fue posible identificar el parentesco entre individuos de *L. vannamei* en las etapas iniciales de la investigación y posteriormente elaborar el primer mapa genético para esta especie.

El tamaño de genomio de la hembra de *L. vannamei* fue 24% mayor que el del macho, demostrando que existen diferencias sexuales en la tasa de recombinación meiótica de esta especie. Por otro lado, se identificó el fenómeno de distorsión en la segregación de marcadores, el cual no ha sido reportado para otras especies de peneidos.

Mediante los AFLPs no fue necesario conocer el pedigrí de las familias mapeadas, por lo cual esta técnica es útil para mapear familias provenientes de cruces comerciales sin información previa de su árbol genealógico.

El bajo costo de esta técnica y su aplicabilidad, reflejados en que no fue necesario el uso de equipos secuenciación automática, visualización radioactiva o fluorescente de los marcadores, conocimiento previo de fragmentos de las secuencias de DNA ni la generación de líneas celulares, permitió que los AFLPs fueran desarrollados con éxito bajo condiciones locales.

El desarrollo de mapas genéticos comparativos a futuro permitirá localizar y clonar genes de interés en el genomio del camarón, haciendo posible la selección asistida por marcadores, la predicción de heterosis y la investigación en diferenciación genética entre líneas o entre individuos de diferentes orígenes.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agresti, J., S. Seki, A. Cnaani, S. Poompuang, E. Hallerman, N. Umiel, G. Hulata, G. Gall, y B. May. 2000. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. Aquaculture 185: 43-56.

Argue, B., S. Arce, J. Lotz, y S. Moss. 2002. Selective breeding of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. Aquaculture 204: 447-460.

Aubert, H. y D.V. Lightner, 2000. Identification of genetic population of the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. Marine Biology 137:875-885.

Bagshawa, J., y J. Quiel. 1998. Structure and polymorphism of ribosomal RNA genes in the marine shrimp *Penaeus vannamei* Aquaculture 159 (3-4): 333-343

Bassam, B.J., G. Caetano-Anolles y P.M. Gresshoff, 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 196: 80-3.

Beckmann, J. S. y M. Soller. 1986. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. Euphytica 35: 111-124.

Benecke, M. 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophageous insects (diptera, coleoptera) incriminal forensic studies: validation and use in practice. Forensic Science International 98:157-168

Benzie, J.A. 1998. Genetic improvement of prawns. 6th World congress on genetics applied to livestock production, 11- 16 January, Armidale, Australia.

Bierne, N., I. Bezuart, V. Vonau, F. Bonhomme y E. Bedier. 2000. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Aquaculture 184: 203-219.

Botstein, D., L. White, M. Skolnick y W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. The American Journal of Human Genetics 32: 314-331.

Briard, M., V. Clerc, D. Grzebelus, D. Senalik, y P. Simon. 2000. Modified protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLP analysis using silver stain or radioisotopes. Plant Molecular Biology Reporter 18: 235-241.

Cervera, M.T., V. Storme, B. Ivens, J. Gusmao, B. Liu, V. Hostyn, J. V. Slycken, M.V. Montagu y W. Boerjan. 2001. Dense genetic linkage maps of three populus species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. Trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. Genetics 158: 787-809.

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

Chen, X. 2000. Molecular Mapping of genes involved in carbohydrate metabolism and fluorescent AFLP-based tagging of QTL in tetraploid potato. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät Universität zu Köln. Köln, Alemania.

Chow, S., W. Dougherty y P. Sandifer. 1990. Meiotic chromosome complements and nuclear DNA contents of four species of shrimps of the genus Penaeus. Journal of Crustacean Biology 10 (1): 29-36.

Congiu, L., I. Dupanloup, T. Partanello, F. Fontana, R. Rossi, G. Arlatis y L. Zane. 2001. Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of sturgeon. Molecular Ecology 10: 2355-2359.

Davis, G. y 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. Phang. 1995. RAPD markers in fishes: an evaluation of resolution and reproducibility. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 3(2):112-118.

DOE Human Genome Program. 1992. The Primer on Molecular Genetics. U.S. Department of Energy, Washington, D.C., EE.UU.

Garcia, D., : Faggart, A. Rhoades, A. Alcivar-Warrant, J. Wyban, W. Carr, J. Sweeney y K. Ebert. 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3(5): 270-280.

García, D. Y J. Benzie. 1995. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. Aquaculture 130: 137-144.

Goyard, E., J. Patrois, J. Peignon, V. Vanaa, R. Dufour, J. Viallon, y E. Bedier. 2002. Selection for better growth of *Penaeus stylirostris* in Tahiti and New Caledonia. Aquaculture 204: 461-468.

Grattapaglia, D. Y R. Sederoff. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. Genetics 137: 1121-37.

Grodzicker, T., J. Williams, P. Sharp, P. y J. Sambrook. 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology 39: 439-446.

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.

Hawthorne, J. 2001. AFLP-based genetic linkage map of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*: Sex chromosomes and a pyrethroid resistance candidate gene. Genetics 158: 695-700.

Hayden, M. y P. Sharp. 2001. Targeted development of informative microsatellite (SSR) markers. Nucleic Acids Research vol. 29, no. 8 e 44.

Hookey, J., V. Edwards, S. Patel, J. Richardson y B. Cookson. 1999. Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism (fAFLP) to characterise methicilllin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Microbiological Methods 37: 7-15.

Jimenez, R., R. Barniol, L. De Barniol y M. Machuca. 2000. Periodic ocurrence of epithelial viral necrosis outbreaks in *Penaeus vannamei* in Ecuador. Diseases of Aquatic Organisms. 42: 91-99.

Kocher, D. T., W. Lee, H. Sobolewska, D. Penman y B. McAndrew. 1998. A genetic map of ciclid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). Genetics 148: 1225-1232.

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

Lander, E., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. Daly, S. Lincoln y L. Newburg. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1: 174-181.

Lester, J. 1999. Best management practices for domestication of aquatic species with an emphasis on *Penaeus vannamei*. V Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. 28 – 30 de Octubre. Guayaquil, Ecuador.

Liu, Z., A. Nichols, P. Li y A. Dunham. 1998. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus Punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*) and their F1, F2 and backcross hybrids. Molecular and General Genetics 258: 260-268.

Liu, Z., P. Li, B. Argue. y R. Dunham. 1999. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. Aquaculture 174: 59-68.

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

Mano, Y., S. Kawasaki, F. Takaiwa y T. Komatsuda. 2001. Construction of a genetic map of barley (*Hordeum vulgares*) cross "asumamugi" x "canto nakate gold" using a simple and efficient amplified fragment length polymorphism system. Genome 44: 284-292.

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

Montaldo, H. y C. Meza-Herrera. 1998. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. Electronic Journal of Biotechnology 1(2): 0717-3458.

Moore, S. y S. Lehnert. 1998. Advances in gene mapping in Penaeid shrimp. In Advances in shrimp biotechnology, National center for genetic engineering and biotechnology. Flegel (Ed). Bangkok, Tailandia.

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

Naruse, K., S. Fukamachi, H. Mitani, M. Kondo, T. Matsuoka, S. Kondo, N. Hanamura, Y. Morita, K. Hasegawa, R. Nishigaki, A. Shimada, H. Wada, T. Kusabe, N. Suzuki, M. Kinoshita, A. Kanamori, T. Terado, H. Kimura, M. Nonaka y A. Shima. 2000. A detailed linkage map of medaka *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution. Genetics 154 (4): 1773-1784.

Russell, P. 1992. Genetics, 3rd edition. Harper Collins Publishers.

Sakamoto, T., R. Danzmann, K. Gharbi, P. Howard, A. Ozaki, S. Khoo, R. Woram, N Okamoto, M. Ferguson L. Holm, R. Guyomard y B. Hoyheim. 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.

Savelkoul, P., Aarts, H., Hass, J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker W., Schouls L., y Lenstra J. 1999, Amplified Fragment Length Polymorphism analysis: The state of an art. Journal of Clinical Microbiology, Oct: 3083 – 3091.

Scott, D.,M. Walker, C. Clarck, C. Prakash y K. Deahl. 1998. Rapid assessment of primer combinations and recovery of AFLP products using Ethidium Bromide Staining. Plant Molecular Biology Reporter 16: 41–47.

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.

Senior, M., J. Murphy, M. Goodman y W. Stuber. 1998. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. Crop Science 38: 1088-1098.

Singer, A., H. Perlman, Y. Yan, C. Walker, G. Corley-Smith B. Brandhorst y J. Postlethwait. 2002. Sex-Specific Recombination Rates in Zebrafish (*Danio rerio*).Genetics 160: 649–657.

Stewart, N. Jr. y L. Via. 1993. A Rapid CTAB DNA Isolation Technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR aplications. BioTechniques 14 (5):748-749.

Tan, Y., C. Wan, Y. Zhy, C. Lu, Z. Xiang y H. Deng. 2001. An amplified fragment length polymorphism map of the Silkworm. Genetics 157: 1277-1284.

Tong, J., S.Lehnert, K. Byrne, H. Kwan y K. Chu. 2002. Development of polymorphic EST markers in Penaeus monodon: applications in penaeid genetics. Aquaculture 208 (1-2): 69-79.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23(21): 4407-4414.

Weber, J. y P. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal of Human Genetic 44: 388-396.

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

Williams, J., A. Kubelik, K. Livak, J. Rafalski, y S. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535

ANEXOS

ANEXO I

METODO DE EXTRACCION DE ADN CTAB (Modificado Shahjahan *et al*,1995)

- Colocar en un tubo ependorf de 1.5 mL una muestra de tejido (50-100 mg).
- Adicionar 500 µl de CTAB tampón y 2.5 µL de proteinasa K (100 mg/mL).
- Mezclar por 5 segundos.
- Incubar en baño de maría a 66 ºC por 8 horas.
- Macerar la muestra.
- Incubar en baño de maría a 66 ºC por 1 hora .
- Adicionar 250 µL de fenol buferado y 250 µL de cloroformo.
- Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.
- Recuperar 350 µL del sobrenadante en un nuevo tubo y añadir 350 µL de cloroformo.
- Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.
- Tomar la fase acuosa y colocarla en un nuevo tubo.
- Adicionar 500 µL de etanol 100% helado.
- Colocar a –20ºC por 1 hora.
- Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.
- Retirar el etanol y agregar 500 µL de etanol al 70%.
- Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
- Disolver el pellet en 100 µL de TE 1X.
- Preservar el DNA a –20 ºC o a 4 ºC.

ANEXO II

SOLUCIONES UTILIZADAS

TAMPÓN TE 50X (Tris-EDTA)

Tris HCl	3,94 g
EDTA	0,93 g

Diluir en 30 ml de H_2O y ajustar pH a 8. Llevar luego hasta 50 mL.

TAMPÓN DE CARGA (Sambrook *et al*, 1989)

Azul bromofenol	0,25%
Xylene cyanol FF	0,25 %
Glicerol en agua	30%

Conservar a 4º C

TAMPÓN TRIS BORATO 5X (TBE 5X) (Sambrook *et al.*, 1989)

Tris base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA 0.5 M (pH 8)	20 mL

H_2O a 1 L.

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

Acrilamida	29 g

N,N' methylenebisacrilamida	1 g
H_2O a 100 mL	

Calentar la solución a 37 ºC para disolver los químicos.

AMONIO PERSULFATO 10% (Sambrook *et al.*, 1989)

Amonio persulfato	1 g
H_2O a 10 mL	

Conservar la solución a –4ºC.

SOLUCION PARA GEL DE POLIACRILAMIDA 8% (100 mL) (Sambrook *et al*, 1989)

H_2O	52,7 mL
Acrilamida 30 %(Acrilamida:bisacrilamida 29:1)	26,6 mL
TBE 5X	20 mL
Ammonium persulfato 10%	0,5 mL
TEMED	0,1 mL

ANEXO III

PROTOCOLO DESARROLLADO PARA EL ENSAMBLE Y PREPARACION DE GELES DE POLIACRILAMIDA BASADO EN Sambrook *et al*, (1989)

MATERIALES

Vidrios de secuenciación manual (frontal y posterior)

Espaciadores plásticos y regleta espaciadora dentada

Cinta adhesiva para geles 3M

Ganchos de presión

Alcohol al 99%

Solución antiadherente de silicona para vidrios

Solución 1:1 ácido acético: glass bond

Bandeja plástica

Guantes

DESARROLLO

- **Lavado de los vidrios y espaciadores**: Estos deben ser lavados intensamente con jabon neutro hasta retirar la suciedad y la grasa. Finalmente deben ser enjuagados con agua desionizada y secados al aire, con la precaución de no tocar las superficies ya lavadas.
- **Preparación**: Una vez secos, los dos vidrios son colocados sobre un mesón, con una de sus caras expuestas hacia arriba. Estas caras serán las que estén en contacto con el gel, por lo que deben ser limpiadas a profundidad. Para esto se esparce sobre ellas alcohol al 99% y este es diseminado con una toalla de papel, la operación se

repite varias veces hasta asegurarse que las dos superficies están completamente limpias.

Posteriormente la cara del vidrio delantero debe ser impregnada con la solución de silicona andiadhesiva para vidrios, cubriendo toda la superficie con esta solución. Acto seguido, en el vidrio trasero se debe esparcir por todos los bordes 600 µL de la solución 1:1 ácido acético:glass bond (la cual debe ser preparada en el momento inmediatamente anterior a su depósito sobre el vidrio), teniendo en cuenta de dejar un margen de 1 cm, en el cual irán los espacidores. Esta solución debe ser distribuida por los bordes con un papel toalla.

- **Ensamble**: Sobre el vidrio posterior, son colocados los espaciadores de tal forma que queden a raz con cada uno de los bordes. Con cuidado, el vidrio superior es colocado sobre estos, teniendo en cuenta que las dos superficies preparadas queden frente a frente, separadas por 1 mm por los separadores plásticos. En este momento todos los bordes, excepto el superior, son sellados cuidadosamente con la cinta adhesiva para geles, asegurándose que no quede ningún orificio por donde la solución del gel pueda escapar. Una vez sellados, son colocados cuatro ganchos de presión para asegurar que los vidrios estén suficientemente apretados para que el gel no se escape hasta polimerizar.
- **Llenado**: Los vidrios sellados y presionados, son colocados en una bandeja plástica apoyandolos sobre un borde de la misma, quedando estos en diagonal. En este momento pueden ser llenados suavemente con una pipeta de 10 mL con la solución de poliacrilamida al 8%, anexo 2. Una vez lleno y eliminando las burbujas que pudieran formarse, se deben colocar los vidrios horizontalmente. Seguidamente y de

forma inmediata, debe ser introducida la peineta para formar los pozos dentro del gel. Colocada esta, se deja polimerizar el gel por una hora.

- **Desmoldado**: Después de verificada la polimerización, la peineta es suavemente retirada al igual que la cinta adhesiva de la parte inferior de los vidrios. Los pozos dejados por la peineta son llenados con solución TBE 0,5X y luego los vidrios son colocados en el secuenciador manual donde son precorridos durante 30 minutos a 1000 voltios. En este momento las muestras pueden ser depositadas y corridas para su análisis posterior.

Es importante durante toda la operación, llevar guantes plasticos y bata, por las características tóxicas de los reactivos utilizados.