

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**DESARROLLO DE MARCADORES SSR EN GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESADOS EN RESPUESTA A LA INCLUSIÓN DE DIETAS VEGETALES EN
TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)**

HUGO FABIAN CRUZ MONTT

SANTIAGO - CHILE

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

DESARROLLO DE MARCADORES SSR EN GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESADOS EN RESPUESTA A LA INCLUSIÓN DE DIETAS VEGETALES EN
TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

DEVELOPMENT OF SSR MARKERS IN DIFFERENTIAL EXPRESSED GENS IN
RESPONSE TO INCLUSION OF VEGETAL DIETS ON RAINBOW TROUT
(*Oncorhynchus mykiss*)

HUGO FABIAN CRUZ MONTT

Santiago, Chile

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

**DESARROLLO DE MARCADORES SSR EN GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESADOS EN RESPUESTA A LA INCLUSIÓN DE DIETAS VEGETALES EN
TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)**

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniero Agrónomo.

HUGO FABIAN CRUZ MONTT

PROFESOR GUÍA

CALIFICACIÓN

Sr. Cristian Araneda T.
Biólogo. Dr. Cs. Biomédicas

6,8

PROFESOR EVALUADOR

Sra. Natalia Lam P.
Ingeniero en Acuicultura, Dra.

6,5

Sr. Ricardo Pertuzé C.
Ingeniero Agrónomo, Dr. Genética Vegetal

6,5

Santiago, Chile
2017

AGRADECIMIENTOS

A la dicha de disfrutar la existencia, conciencia e individualización de una pequeña parte del universo y sus infinitas posibilidades.

Dedicado a mi familia, padres y hermanas, pilares de mi vida que me enseñaron los valores esenciales en mí. Por su amor y apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida, incluso en aquellos que desaparecía.

Agradezco profundamente a todos mis amigos y amigas, en especial a Ignacio Garrido por todos los buenos momentos.

A Camila Scott, por su confianza, apoyo y cariño en los tiempos más difíciles. Por ayudarme a ver la vida desde otras perspectivas. Estaré eternamente agradecido.

A Cristian Araneda, por el apoyo constante, infinita paciencia y consideración. Por su tutoría en el laboratorio, guía y apoyo incluso en metas futuras, como mi velero.

A todas las personas del Laboratorio de Genética y Biotecnología en Acuicultura, por los momentos compartidos y las tertulias de hora de almuerzo. En especial a Valentina Córdova por los divertidos momentos compartidos Raquel Becerra y Felipe Jilberto, por su ayuda en trabajos el laboratorio.

A María Angélica Larraín, por facilitar su laboratorio en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas; y Ximena Noriega por ayudarme en las pruebas realizadas en dicho laboratorio.

A todos los que hicieron posible este trabajo y aquellas personas que conocí en el camino que llega a este momento.

Ad astra, per aspera.

ÍNDICE

Contenido	
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS.....	6
Objetivo General	6
Objetivos Específicos	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
Lugar de estudio.....	7
Material biológico.....	7
EST de trucha arcoíris y partidores	7
Creación de cóntigos	8
Diseño de partidores.....	8
Obtención y Extracción de ADN.....	9
Optimización del PCR y amplificación de marcadores.....	9
Amplificación cruzada	10
Análisis genético poblacional	11
Prueba de segregación mendeliana	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
Análisis de Cóntigos.....	13
Diseño de partidores.....	13
Optimización del PCR y amplificación de marcadores.....	14
Amplificación cruzada	20
CONCLUSIONES.....	24
BIBLIOGRAFÍA.....	25
APÉNDICES	29

RESUMEN

Dentro de la acuicultura chilena, una de las especies más relevantes es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), ocupando actualmente el cuarto lugar en producción de especies comerciales en Chile con un volumen de 94.717 toneladas, registrando un retorno de 606 millones de dólares el año 2015. Los estudios relacionados a la genética de este animal se centran en la búsqueda de genes asociados a rasgos de interés productivo y su aplicación para el mejoramiento de su cultivo. En la actualidad, un área especialmente importante es el desarrollo de dietas más amigables con el medio ambiente, que se enfocan en el remplazo de insumos como proteínas y aceites de origen animal por otros de origen vegetal.

En esta memoria se realizó un estudio de bioinformática básica para identificar marcadores microsatélites o SSR (SimpleSequence Repeats) en EST (Expressed Sequence Tag) obtenidos de trucha arcoíris sometidas a dietas de remplazo de nutrientes animales por vegetales. La utilidad de los marcadores moleculares radica en su fácil asociación a los rasgos de interés productivo, fácil genotipado y los múltiples beneficios que se pueden obtener de estos.

Se diseñó primers para cinco marcadores SSR, de los cuales tres amplificaron con éxito. Estos se identificaron como *Omy176aUCh* (KT891428), *Omy176bUCh* (KT891429) y *Omy158UCh* (KT891427). Sin embargo no resultaron informativos en la población estudiada debido a que la heterocigosidad observada fue cero.

Adicionalmente, se probó amplificación cruzada de estos marcadores en otros salmónidos: *Oncorhynchus kisutch*, *Salmo trutta* y *Salmo salar*. El marcador *Omy158UCh* amplificó en todas las muestras de las tres especies; *Omy176aUCh* amplificó solo en *O. kisutch*; *Omy176bUCh* amplificó en cinco muestras de *O. kisutch*, seis de *S. salar* y ninguna en *S. trutta*.

PALABRAS CLAVE

Marcadores microsatélite, trucha arcoíris, EST-SSR, amplificación cruzada

ABSTRACT

In Chilean aquaculture, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is one of the most important species in Chile with a volume of production of 94.717 tons and revenue of 606 million USD by 2015. Genetic studies related to this animal are searching for genes associated to production traits and their applications to breeding and diets focused on the replacement of commodities such as animal proteins and oils by others of vegetable origin.

In this basic bioinformatics study, the objective is to identify microsatellite markers or SSR (Simple Sequence Repeats) in EST (Expressed Sequence Tag) obtained from rainbow trout submitted to diets with replacement of animal nutrients for vegetal ones.

Five SSR markers were identified, and only three amplified successfully. These were *Omy176aUCh* (KT891428), *Omy176bUCh* (KT891429), and *Omy158UCh* (KT891427). They were not informative for statistical analysis in the studied population because the heterozygosity observed was zero.

Cross-amplification was also tested with other salmonids: *Oncorhynchus kisutch*, *Salmo trutta* and *Salmo salar*. *Omy158UCh* amplified on all samples of the three species. *Omy176aUCh* amplified in *O. kisutch* only. *Omy176bUCh* amplified on five samples of *O.* and six of *S. salar*, with no amplification on *S. trutta*

KEY WORDS

Microsatellite markers, rainbow trout, EST-SSR, cross-amplification

INTRODUCCIÓN

La acuicultura tiene un rol importante en el sector de disponibilidad de alimento global y crecimiento económico de distintos países (FAO, 2016). Entre las especies más relevantes por su influencia en el mercado se encuentra la trucha arcoíris (*O. mykiss*) como uno de los salmónidos más estudiados y cultivados desde mediados del siglo pasado (Díaz, 2008). Chile es el tercer mayor productor de trucha arcoíris en el mundo y éste salmónido históricamente ha ocupado el segundo lugar en relevancia en el país (Colihueque y Estay, 2010). Dentro de las especies acuícolas con mayor producción en el país, ocupa el cuarto lugar con un volumen de 94.717 toneladas, registrando un retorno de 606 millones de dólares al año 2015 (FAO, 2017). Al ser una especie de alta importancia comercial, la investigación relacionada a su cultivo y en especial a su alimentación ha tenido especial relevancia en los últimos años, focalizándose las dietas en la sustitución de insumos de origen animal por otros de origen vegetal (Hardy, 2010). Esto último, considerando que los cultivos intensivos de peces carnívoros actualmente presentan una alta dependencia de harina y aceite de pescado como fuente principal de nutrientes de calidad (Iturra et al., 2011; Tacon y Metian, 2008).

En genética acuícola, el uso y desarrollo de marcadores genéticos moleculares ha tenido un fuerte impacto en la mejora de especies de cultivo. Los marcadores moleculares consisten en fenotipos moleculares originados por un gen, que se comportan de acuerdo a las leyes de herencia mendeliana (Díaz, 2002; Duran et al., 2013). Su utilidad radica en facilitar el estudio e identificación de genes y variaciones genéticas en el genoma (conocidas como polimorfismos) que controlan o se pueden asociar con la variación fenotípica en rasgos de interés productivo (Díaz et al., 2005; Liu y Cordes, 2004). Actualmente existe un amplio uso de marcadores moleculares en especies cultivadas de salmónidos incluyendo la trucha arcoíris (*O. mykiss*) para investigar la estructura genético poblacional (Williamson et al., 2002), conocer la variabilidad y diversidad genética, los niveles de cosanguinidad, determinar el origen geográfico de individuos (Gross et al., 2007), origen de escapes (Glover, 2008), conocer la paternidad/maternidad y el parentesco (Castillo, 2009), identificar la especie biológica, cepas o poblaciones naturales (Díaz, 2002; Díaz et al., 2005). Además de la identificación de loci asociados o ligados con características productivas de interés (Liu y Cordes, 2004; Rexroad et al., 2005). La caracterización de la diferenciación genética de poblaciones es fundamental para la crianza selectiva de la trucha arcoíris (Liu et al., 2016).

Dentro de los marcadores utilizados en la acuicultura, los microsatélites, SSR (Simple Sequence Repeats) o STR (Short Tandem Repeats) son uno de los más usados. Estos consisten

en secuencias de 2 a 6 nucleótidos repetidas en tándem, donde el polimorfismo se produce por variaciones en el número de repeticiones del motivo central (Díaz, 2002). Estos son codominantes y altamente polimórficos, presentando generalmente varios alelos (Duran et al., 2013). Según Liu y Cordes (2004), los microsatélites tienden a estar distribuidos de manera uniforme en todos los cromosomas, una característica ubicua que les otorga una amplia cobertura del genoma (Ellegren, 2004). La principal ventaja de este tipo de marcadores está relacionada a que están basados en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR y por lo tanto son fáciles de genotipar (Ellegren, 2004), y si bien en general son especie específicos también se pueden usar en forma heteróloga en especies filogenéticamente emparentadas, como se ha demostrado largamente en la construcción de mapas genéticos de salmones (Araneda et al., 2008).

La identificación de microsatélites puede lograrse a partir de diferentes métodos, siendo uno de ellos la minería de datos en bibliotecas de EST (Expressed Sequence Tag o etiquetas de secuencia expresada). Los EST corresponden a secuencias simples generadas de la secuenciación de clones de cDNA (ADN complementario) obtenidos desde mRNA (ARN mensajero) que se estaban transcribiendo en un tejido en un momento dado. Estos EST son eficientes para identificar genes y analizar su perfil de expresión (Liu y Cordes, 2004). Por este motivo, los marcadores microsatélites obtenidos a partir de EST son de uso común (Zhou et al., 2014; Santos et al., 2015), debido a que se encuentran en regiones expresadas del genoma (transcriptoma) y por lo tanto pueden ser fácilmente asociadas con la variación fenotípica controlada por los genes que los codifican (Yi et al., 2016). Además, proporcionan la posibilidad de construir mapas genéticos comparativos entre las distintas especies de salmónidos (Rexroad et al., 2005), debido a que los microsatélites originados de EST son más conservados entre especies emparentadas en comparación a los de origen genómico, y como resultado se esperan mejores resultados de una amplificación cruzada (inter-especies) de este tipo de marcadores (Aguilar et al., 2014). A diferencia de los microsatélites obtenidos por otros métodos que suelen ser muy laboriosos y costosos, los microsatélites obtenidos de EST poseen una importante ventaja en el tiempo y costo de desarrollo (Aguilar et al., 2014). Además, los marcadores SSR obtenidos de EST constituyen por lo general marcadores funcionales localizados en zonas transcritas, y su variación en el largo de esta pueden tener algún efecto fenotípico (Santos et al., 2015).

Por otra parte, cuando se desarrollan marcadores genéticos de cualquier tipo, resulta fundamental confirmar la segregación mendeliana de estos para poder aplicarlos en análisis poblacionales (Wood et al., 2003). Además, se debe analizar la diversidad genética obtenida con estos marcadores en un grupo representativo de individuos de la especie donde se desarrollaron. Las medidas más usadas de diversidad genética son: la heterocigosidad observada (H_o), que corresponde a la proporción de individuos que son heterocigotos para un

determinado locus; heterocigosidad esperada (*He*), que indica la probabilidad de que un par de alelos tomado al azar de la población sean diferentes entre sí, si el apareamiento fue al azar; el número medio de alelos por locus (*A*) que indica el número de alelos contabilizados en todos los loci por el total de loci, y el contenido de información polimórfica (*PIC*) que mide el nivel de polimorfismo de un marcador.

Resulta de gran interés informativo el desarrollo de marcadores microsatélites para aumentar la densidad de estos en los mapas genéticos de salmónidos, en especial los ubicados en secuencias expresadas (EST) por su posible relación con caracteres productivos en trucha arcoíris. Uno de estos caracteres es la adaptación a dietas con sustitución de nutrientes de origen animal (harina y aceite de pescado) por otros de origen vegetal. Por lo tanto, en esta investigación se utilizó secuencias EST obtenidas de genes diferencialmente expresados de trucha arcoíris en respuesta al uso de dietas con remplazo de proteína y aceite vegetal. Teniendo las secuencias de los EST es posible identificar marcadores microsatélites por medio de análisis bioinformático básico, estandarizar las condiciones de amplificación, comprobar la herencia mendeliana de éstos, y evaluar la amplificación cruzada con otras especies emparentadas de salmónidos. Todos estos procedimientos se realizaron en esta investigación a fin de obtener un pequeño panel de SSR que a futuro puedan usarse para análisis de asociación en salmónidos sometidos a alimentación con dietas basadas en proteína y aceites vegetales.

HIPÓTESIS

Es posible identificar marcadores microsatélites en secuencias EST de genes diferencialmente expresados en respuesta al uso de dieta con sustitución porcentual de proteína y aceite de pescado por otras de origen vegetal en trucha arcoíris (*O. mykiss*).

Objetivo General

Aumentar la densidad de marcadores disponibles para análisis genético en especies de salmones en respuesta a uso de dietas con inclusión de proteína y aceite vegetal.

Objetivos Específicos

1. Identificar marcadores microsatélites SSR en secuencias EST, expresadas en respuesta a la dietas con remplazo de nutrientes.
2. Desarrollar partidores y estandarizar las condiciones de amplificación de los marcadores SSR identificados.
3. Verificar la herencia mendeliana de los SSR identificados en familias de trucha arcoíris.
4. Realizar amplificación cruzada de los marcadores microsatélites identificados en trucha arcoíris, en individuos de salmón coho (*O. kisutch*), salmón del Atlántico (*S. salar*) y trucha café (*S. trutta*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

Los análisis moleculares se desarrollaron en el Laboratorio de Genética y Biotecnología en Acuicultura de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Material biológico

El material biológico utilizado fue:

- Ocho muestras de trucha arcoíris para la identificación de los microsatélites.
- Dieciséis muestras de trucha arcoíris para verificar la herencia mendeliana.
- Seis muestras de cada una de tres especies emparentadas seleccionadas para realizar la amplificación cruzada: salmón Coho, salmón del Atlántico y trucha café (n = 18).

Todas estas muestras fueron obtenidas del banco de muestras del Laboratorio de Genética y Biotecnología en Acuicultura del Departamento de Producción Animal de la Universidad de Chile.

EST de trucha arcoíris y partidores

Se realizó minería de datos usando EST obtenidos de la secuenciación de individuos de trucha arcoíris del proyecto “Genómica de Salmónidos: Identificación de Genes Asociados al Uso de Proteínas” (INNOVACHile-CORFO 07CN13PBT-41). En este proyecto se utilizaron dietas con sustitución de nutrientes de origen animal por vegetal, para identificar genes diferencialmente expresados (Iturra et al., 2012; Jilberto, 2015). Para efectos de este estudio la dieta específica utilizada en estos individuos no es relevante, ya que se pretende como una primera etapa buscar el polimorfismo de tipo microsatélite, y no las interacciones genotipo-nutriente (nutrigenómica o nutrigenética). Las secuencias utilizadas en este trabajo fueron

proporcionadas por el proyecto mencionado se encuentran almacenadas en el Laboratorio de Genética y Biotecnología en Acuicultura.

Creación de cóntigos

Los cóntigos fueron creados alineando y ensamblando las secuencias de origen del proyecto de nutrigenómica (INNOVACHile-CORFO 07CN13PBT-41) utilizando el programa Squencher™ 5.3 (Registration Number: 1412028, Gene Codes Corporation®, USA).

Diseño de partidores

Se usó la aplicación online MICAS (<http://micas.cdfd.org.in/>) para detectar motivos microsatélites en los cóntigos diseñados con el programa Squencher™ 5.3. Se usaron los parámetros propuestos por Duran (2013) para identificar los motivos SSR. De este modo se seleccionaron como microsatélites dinucleótidos, los que tenían como mínimo seis repeticiones del motivo de dos bases, trinucleótidos con un mínimo de cuatro repeticiones del motivo de tres bases, tetranucleótidos y pentanucleótidos con un mínimo de tres repeticiones de los motivos de cuatro y cinco bases respectivamente, y hexanucleótidos con un mínimo de dos repeticiones del motivo de seis bases. No se realizó una distinción entre microsatélites perfectos, imperfectos e interrumpidos.

Una vez localizados los microsatélites, se procedió a diseñar partidores usando la aplicación online Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>; Untergasser et al., 2007). Los parámetros utilizados para el diseño de partidores fueron de un tamaño óptimo de 21 pb (mínimo: 21 pb, máximo: 23 pb), temperatura de unión (T_m) óptima de 55°C (mínima: 50 °C, máxima: 70 °C), y un contenido de CG máximo del 70%. Los partidores diseñados fueron evaluados *in silico* con el programa Amplifx 1.7.0 (Nicolas Jullien, CNRS, Aix-Marseille Université, <http://crn2m.univ-mrs.fr/pub/amplifx-dist>), probando su funcionalidad a través de los parámetros establecidos.

Aquellas parejas de partidores que mostraron tener éxito en amplificación *in silico* fueron enviadas a síntesis al laboratorio IDT (Integrated DNA Technologies, USA). Una vez obtenidos los partidores desde el proveedor estos se resuspendieron a una concentración de trabajo de 10 µM.

Obtención y Extracción de ADN

Las muestras de ADN para los seis individuos de salmón Coho, seis individuos de salmón del Atlántico y seis ejemplares de trucha café fueron obtenidas del banco de ADN del Laboratorio de Genética y Biotecnología en Acuicultura. Adicionalmente para el análisis de segregación mendeliana, se extrajo ADN de ocho muestras de aletas de ejemplares de trucha arcoíris pertenecientes a la familia usada que se agregaron a las ocho muestras de ADN previamente obtenidas, para completar los 16 ejemplares. Todas las extracciones se realizaron por el método del fenol-cloroformo modificado por Taggar et al. (1992) y se cuantificaron en un espectrofotómetro Nano Drop® Modelo ND-2000 (Thermo Scientific^{MR}) en el Laboratorio de Ingeniería de Procesos y Calidad de Alimentos, Departamento de Ciencias de los Alimentos y Tecnología Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Todas las muestras se diluyeron a una concentración de trabajo de a $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

Optimización del PCR y amplificación de marcadores

Una vez diluidos los partidores y muestras de ADN se realizó una reacción de PCR estándar con gradiente de temperatura para identificar la mejor temperatura de alineamiento (T_m) para amplificar cada microsatélite, probándose ocho T_m diferentes desde los 50°C a los 55°C . La mezcla de reacción utilizada se preparó en un volumen final de $15 \mu\text{L}$ que contenía: $1,5 \mu\text{L}$ de tampón de PCR; $1,8 \text{ mM}$ de MgCl_2 , 45 mM de dNTP; $0,2$ unidades de enzima Taq polimerasa (ThermoFisherTM); $10,2 \mu\text{L}$ de agua más $0,9 \text{ mM}$ de los partidores obtenidos para comprobar su funcionalidad con el material disponible y $1 \mu\text{L}$ de muestra de ADN a $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

Los productos de la amplificación fueron resueltos en electroforesis en gel de agarosa ($1,8\%$ p/v), por 60 minutos a un voltaje de 80 voltios, usando buffer TBE $0,5\text{X}$; con bromuro de etidio a una concentración de $0,1 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$. Las ampliaciones se visualizaron bajo luz ultravioleta usando un transluminador UV Fotodyne 3-3002. Se fotografiaron los geles con una cámara Nikon Coolpix 990. Adicionalmente, se realizó la resolución de los fragmentos en electroforesis en gel de poliacrilamida, por 60 minutos a 10 watt y 30 mA . Las ampliaciones se revelaron con tinción de plata y se fotografiaron con una cámara Canon 5x16015. Los geles fueron preparados en el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Se utilizó la solución de acrilamida al 40% p/v, usando 3 mL , $150 \mu\text{L}$ APS al 10% , 1 mL de tampón TBE 5X y $1,5 \text{ mL}$ de agua

destilada. La tinción se realizó con el kit de tinción con plata BM-0860 de Winkler Ltda, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Para la determinación del tamaño de los alelos se utilizaron marcadores de tamaño molecular de 50 pb en gel de agarosa y de 25 pb y 10 pb en gel de poliacrilamida, de acuerdo al tamaño esperado de los fragmentos SSR. La imagen de los geles se trabajó con el programa Adobe Photoshop CC. La determinación del tamaño de alelos se hizo mediante observación, usando como referencia dos marcadores de tamaño: Hyperladder V (Bioline™) con resolución de 25 pb, y O'rangeruler readytouse con resolución de 10pb (Fermentas™).

Amplificación cruzada

La amplificación cruzada se realizó mediante PCR en seis muestras de cada una de las especies descritas previamente (salmón Coho, salmón Atlántico y trucha café), utilizando un protocolo similar al previamente estandarizado para trucha arcoíris. Como control se utilizó uno de los individuos utilizados de trucha arcoíris para obtener las secuencias de los EST.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos utilizados corresponden a los relacionados con la estimación de estadígrafos para medir la diversidad genética. Estos análisis genético poblacionales se realizaron utilizando el programa GENEPOP en la web (<http://genepop.curtin.edu.au/>). Adicionalmente, se realizaron pruebas de bondad de ajuste de chi-cuadrado para verificar la segregación mendeliana de los alelos usando el paquete *stats* del ambiente de análisis matemático R (<http://cran.r-project.org>).

Análisis genético poblacional

Se realizó sobre la base de ocho individuos de trucha arcoíris, donde se estimó la frecuencia y número medio de alelos para cada locus (A) además de la heterocigosidad promedio observada por locus (H_o) y heterocigosidad promedio esperada por locus (H_e) según el equilibrio Hardy-Weinberg. Además se cuantificó el contenido de información polimórfica (PIC) utilizando las siguientes fórmulas:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2$$

Donde f_i es la frecuencia del i -ésimo alelo e i el número de alelos.

Para calcular los índices se utilizaron las siguientes fórmulas:

Número medio de alelos por locus:

$$A = \text{N}^\circ \text{ de alelos en el total de loci analizados} / \text{N}^\circ \text{ de loci analizados}$$

Heterocigosidad observada:

$$H_o = \text{N}^\circ \text{ de genotipos heterocigóticos} / \text{N}^\circ \text{ total de genotipos analizados}$$

Heterocigosidad esperada:

$$H_e = 1 - \sum q_i^2$$

Donde q_i es la frecuencia del homocigoto para el alelo i -ésimo.

Prueba de segregación mendeliana

Para confirmar el patrón de herencia mendeliana se utilizaron ambos padres más 14 progenies. Para cada microsatélite se usó el genotipo de ambos padres para determinar la proporción genotípica esperada en la progenie, junto con el genotipo observado de esta por medio de una prueba de bondad de ajuste de chi-cuadrado o prueba exacta de Fisher (O'Reilly et al., 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de Cántigos

El resultado de la construcción de los cántigos ensamblados con Sequencher™ 5.3 se muestra en el Apéndice I. Se crearon un total de 61 cántigos con los EST obtenidos desde el proyecto INNOVACHile-CORFO07CN12PBT-41. Estos cántigos fueron sometidos a una búsqueda de similitudes en bases de datos públicas de secuencias con la herramienta online BLASTN 2.3.1 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se analizó un total de 61 cántigos, los cuales se utilizaron para identificar motivos microsatélites.

Las coincidencias de estos cántigos fueron asociados en su mayoría a fragmentos de mRNA de salmónidos, proteínas como la apolipoproteína A-I-2 y A-II en salmón del Atlántico, gen de lisozima tipo II en trucha arcoíris, receptor de lipoproteína somática, entre otros. Una tabla completa con las coincidencias se encuentra en el Apéndice I.

Diseño de partidores

A partir del análisis de los cántigos se identificaron cincuenta y siete secuencias microsatélites (Apéndice II). Las secuencias microsatélites fueron identificadas en 29 de 61 cántigos creados por EST. De estas secuencias microsatélites, solo cinco tenían regiones flanqueantes del tamaño adecuado para diseñar partidores. Estos fueron denominados siguiendo la nomenclatura estándar para salmónidos, es decir se usó el prefijo *Omy* que identifica la especie en que fueron desarrollados (*O. mykiss*), seguido del número del cántigo y finalizando con UCh que identifica la Universidad de Chile (Araneda et al., 2008). Las secuencias microsatélites fueron almacenadas en la base de datos públicas para nucleótidos de Genbank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>) (Cuadro 1) (Blaxter et al., 2016). A Partir de estas secuencias se diseñaron cinco parejas de partidores, respectivamente. Estos partidores probaron tener consistencia a través de amplificaciones visualizadas en geles de agarosa al 1,8%; sus características se pueden observar en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Secuencias de los partidores sentido y antisentido correspondientes a los marcadores diseñados a partir de EST de muestras de trucha arcoíris.

Marcador SSR	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Tm (°C)
<i>Omy176aUCh</i>	GATAGTACAGCACATCACAAGC	TAGTCTTCGAGGGAGAGACAC	54
<i>Omy176bUCh</i>	CATTGAGAGGGACCTCATAC	AGGAGGAGAGCAGCAGTT	54
<i>Omy158UCh</i>	AGATCCCTCCTCTGTGTTAG	CTGTCCTTTGTTCTGTTGAG	54
<i>Omy161UCh</i>	TCACTTACTCTCCTCCCTTTC	GTCTGTGTCAATGAGATCGAG	54
<i>Omy131UCh</i>	TGTATGACACACAGAGCAAAG	TACTGCTGTAGGTTGTCAAGG	54

Cuadro 2. Características de los marcadores microsatélites identificados a partir de EST de muestras de trucha arcoíris.

Marcador SSR	Genbank	Motivo	Repeticiones	Tamaño amplificado (pb)
<i>Omy176aUCh</i>	KT891428	TGT	5	161
<i>Omy176bUCh</i>	KT891429	CTC	4	102
<i>Omy158UCh</i>	KT891427	ATTTG	3	175
<i>Omy161UCh</i>	KT891430	TG	13	164
<i>Omy131UCh</i>	KT891431	CT	28	210

En comparación a otros estudios como Santos et al. (2015), que obtuvieron 43 microsatélites a partir de EST diferencialmente expresados en distintos géneros de castaños, con considerablemente más éxito, se utilizaron 24 parentales y sus progenies para realizar la evaluación de los marcadores, mientras que en el presente estudio solo se utilizó una familia.

Optimización del PCR y amplificación de marcadores

Una vez realizado el PCR con gradiente se determinó por observación de las amplificaciones que la temperatura óptima era de 54°C para todos los marcadores. En la Figura 1 se puede observar que los marcadores de *Omy176aUCh*, *Omy176bUCh* y *Omy158UCh* se amplifican eficientemente en las ocho muestras de trucha arcoíris. Por otro lado, el marcador

Omy161UCh presentó amplificación, aunque con menor consistencia que los tres marcadores mencionados previamente, pues algunos individuos no amplificaron (Figura 1). El marcador *Omy161UCh* no obtuvo resultados satisfactorios que ameritaran su posterior estandarización, pues se observó amplificación inespecífica en el gel de agarosa para los distintos individuos y fuera de los tamaños esperados de acuerdo al análisis bioinformático realizado previamente. El diseño de partidores fue posible para el 8,8% de los microsatélites encontrados. Partidores diseñados para *O. mykiss* en la presente investigación, tuvieron una tasa de éxito en amplificación por optimización PCR del 60% (3 de 5 pares de primers).

Posteriormente, se realizaron reacciones de PCR para cada uno de los cuatro microsatélites en ocho individuos a la temperatura determinada como óptima. El resultado de estas amplificaciones se muestran en las figuras 2 y 3, donde además es posible comprobar los tamaños en pares de bases de los distintos amplificados según el Cuadro 2.

Como se muestra en las figuras 2, 3 y 4, los microsatélites *Omy176aUCh*, *Omy176bUCh* y *Omy158UCh* claramente amplifican un solo producto de PCR en aproximadamente 160, 102 y 175 pb, respectivamente, lo que concuerda con el tamaño esperado obtenido del análisis bioinformático (Cuadro 2). Por otra parte, el marcador *Omy131UCh* presenta muchas amplificaciones inespecíficas (Figura 5), por lo que fue descartado para los análisis posteriores.

Todos los marcadores resultaron ser monomórficos. Esto puede encontrar explicación en el hecho de que se utilizó solo una familia con sus respectivos parentales para la amplificación de estos, lo que reduce el poder de resolución de este estudio. Otra razón se podría aproximar al hecho de que en contraste a los marcadores microsatélites de origen genómico, los microsatélites obtenidos de EST siempre muestran menos niveles de polimorfismo, al tener secuencias más conservadas en las regiones codificantes (Santos et al., 2015; Zhou et al., 2014). Sin embargo, poseen ventajas comparativas relacionadas a que son de acceso más fácil, están presentes en zonas ricas en genes y poseen un alto nivel de transferibilidad entre especies relacionadas (Zhou et al., 2014).

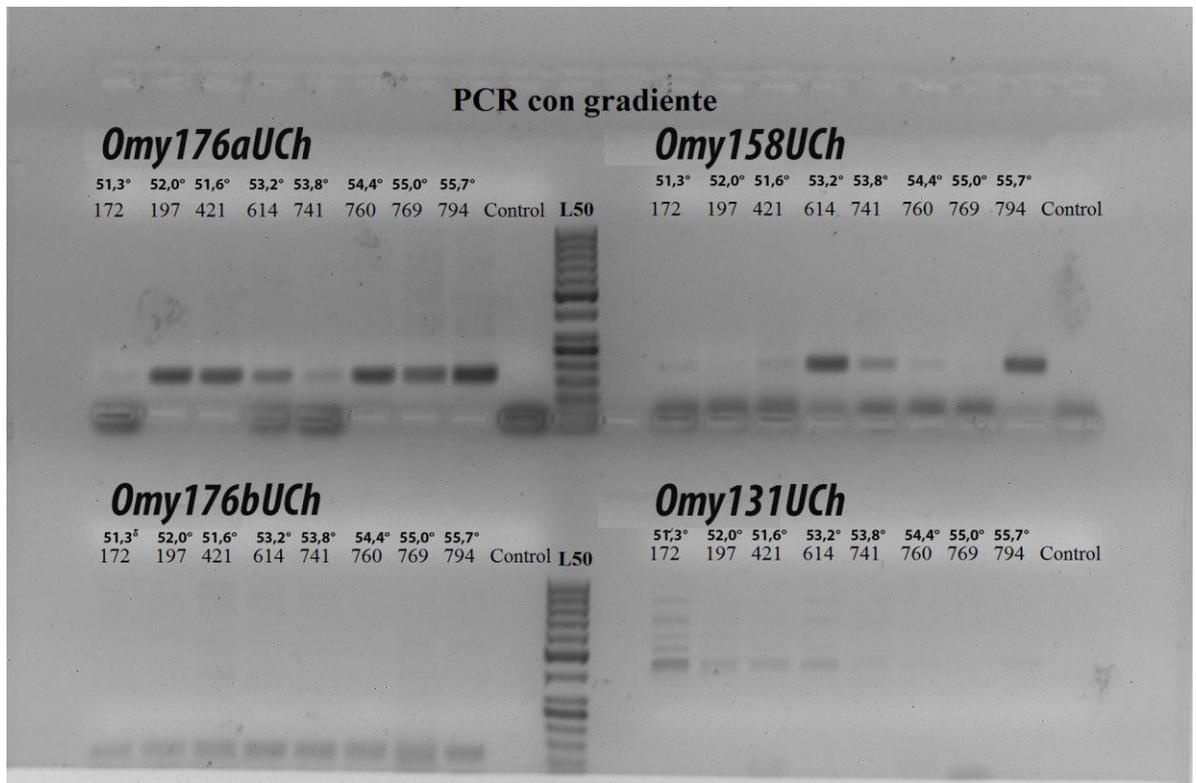


Figura 1. Gel de agarosa al 1,8% mostrando las amplificaciones, usando gradiente de temperatura en de los marcadores *Omy176aUCh*, *Omy176bUCh*, *Omy158UCh* y *Omy131UCh* en ocho individuos de trucha arcoíris (172, 197, 421, 614, 741, 760, 769 y 794). L50 indica el carril con el marcador de tamaño de 50 pb. Las temperaturas utilizadas en la gradiente fueron 51,3°C a 55,7°C.

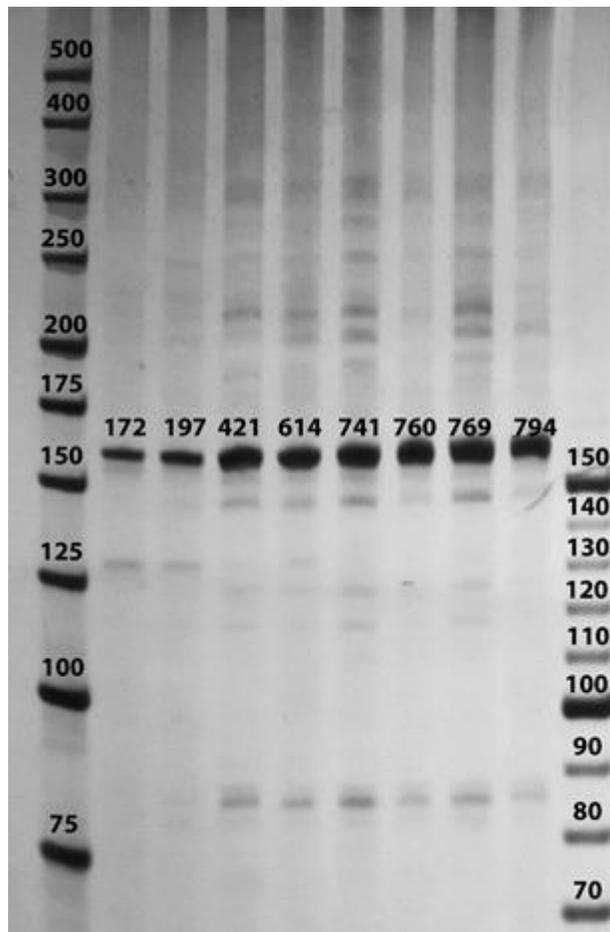


Figura 2. Gel de poliacrilamida al 40% para el marcador *Omy176aUCh* a una T_m de 54 °C en ocho muestras de trucha arcoíris (172, 197, 421, 614, 741, 760, 769 y 794). Se muestran los tamaños en pb de los estándares de tamaño usados.

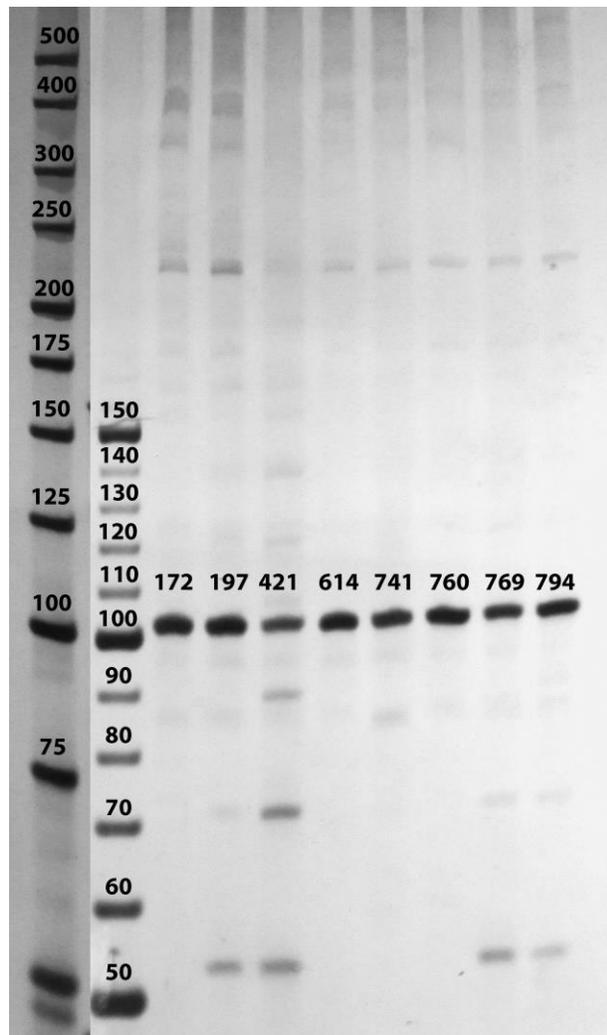


Figura 3. Gel de poliacrilamida al 40%, para el marcador *Omy176bUCh* a una T_m de 54°C en ocho muestras de trucha arcoíris (172, 197, 421, 614, 741, 760, 769 y 794). Se muestran los tamaños en pb de los estándares de tamaño usados.

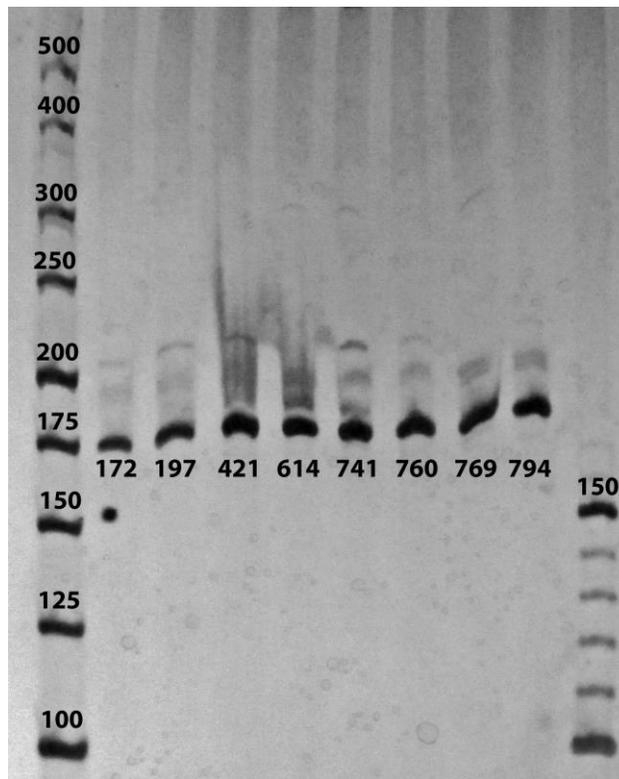


Figura 4. Gel de poliacrilamida al 40%, para el marcador *Omy158UCh* a una T_m de 54°C en ocho muestras de trucha arcoíris (172, 197, 421, 614, 741, 760, 769 y 794). Se muestran los tamaños en pb de los estándares de tamaño usados.

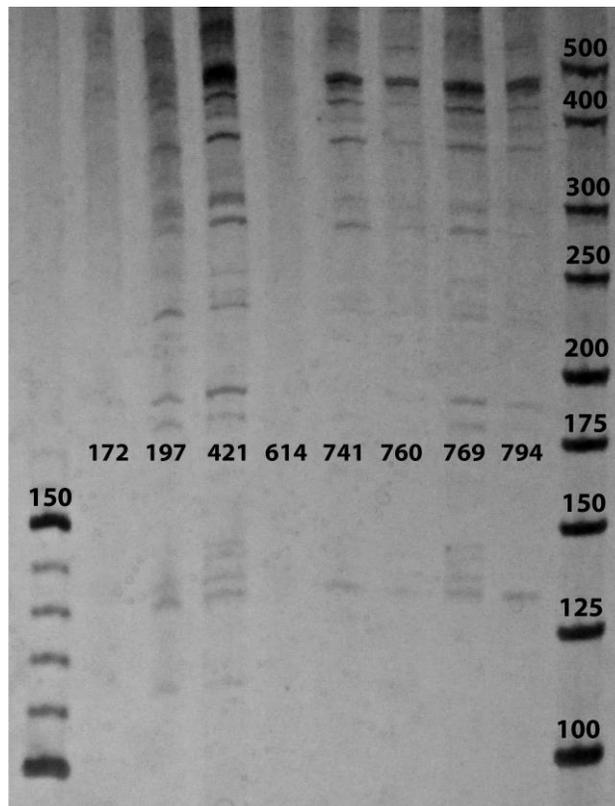


Figura 5. Gel de poliacrilamida al 40%, para el marcador *Omy131UCh* a una T_m de 54°C en ocho muestras de trucha arcoíris (172, 197, 421, 614, 741, 760, 769 y 794). Se muestran los tamaños en pb de los estándares de tamaño usados.

Amplificación cruzada

La amplificación de los tres marcadores en las especies emparentadas de salmónidos se realizó usando las condiciones estandarizadas para trucha arcoíris y se resolvieron en gel de agarosa al 1,8% teñidos con nitrato de plata. Los resultados de estas amplificaciones se muestran en el Cuadro 3. Los resultados en el gel de poliacrilamida se pueden revisar en los apéndices III al VII.

Del set de marcadores microsatélites tipo EST-SSR del presente estudio, tres fueron transferibles en las especies seleccionadas. En este caso los marcadores aquí desarrollados amplificaron en un 94% en *O. kisutch*, mientras que en *S. salar* amplificaron un 67% y en *S. trutta* un 33%.

El Cuadro 3 resume los resultados de la amplificación cruzada en las distintas especies, en este se muestra el número de individuos amplificados por marcador y por especie. Como se observa, la amplificación del marcador *Omy158UCh* se observó en todos los especímenes analizados, mientras que el marcador *Omy176UCh* solo amplificó en los individuos de salmón Coho. El marcador *Omy176bUCh* amplificó tanto en salmón Coho como del Atlántico.

Cuadro 3. Resultados de la amplificación cruzada de los marcadores *Omy176aUCh*, *Omy176bUCh* y *Omy158UCh* en seis individuos de salmón Coho, trucha café y salmón del Atlántico.

Especie	<i>Omy158UCh</i>	<i>Omy176aUCh</i>	<i>Omy176bUCh</i>
<i>O. kisutch</i> (Salmón coho)	6	6	5
<i>S. trutta</i> (Trucha café)	6	0	0
<i>S. salar</i> (Salmón del Atlántico)	6	0	6

En la amplificación cruzada en otras especies de salmónidos se observó que algunos de estos marcadores que amplifican en algunas de estas. Estos pueden servir para su transferibilidad y mapeo comparativo (Santos et al., 2015). Santos et al. (2015), obtuvo un rango de transferibilidad similar para especies emparentadas, con un promedio de 95,35%. Una ventaja que presentan los marcadores microsatélites desarrollados a partir de EST es la alta transferibilidad a especies relacionadas (Rexroad et al., 2005). En el caso de los resultados de este trabajo es posible que el mayor éxito en la amplificación de los microsatélites en *O. kisutch* se deba a que son especies del mismo género y por lo tanto, filogenéticamente más cercanas, produciendo una alta transferibilidad y permitiendo posterior análisis de diversidad genética entre especies (Santos et al., 2015). En otros estudios similares se ha observado un porcentaje de amplificación cruzada de 50% o más entre amplificación cruzada dentro del mismo género (Olsen et al., 1998). En el estudio de Kumar et al. (2015), de un total de 68 microsatélites tipo EST-SSR desarrollados en *Mentha piperita*, tuvo un éxito de amplificación entre otras especies del género *Mentha*, en el rango del 37% al 87%, reportando el amplio éxito de transferibilidad de los marcadores de este tipo. Es decir, los porcentajes de

amplificación cruzada para los SSR obtenidos en esta memoria están en el rango de los reportados por otros estudios.

Análisis genético poblacional

Los tres microsatélites analizados en las ocho muestras de trucha arcoíris resultaron ser homocigotas para el mismo alelo (figuras 2 al 6), por lo tanto los tres loci fueron monomórficos y no mostraron variación genética, siendo las medidas de diversidad genética similares para los tres y las más bajas, es decir $A=1$, $H_o=H_e=PIC=0$.

El número de alelos por locus fue uno para los tres microsatélites, por lo tanto sin genotipos heterocigotos. Esto hace que resulte inútil realizar los análisis de parentesco y otras pruebas de estadísticas relacionadas a la información que pueda entregar los microsatélites en las muestras analizadas, A pesar de este resultado no se descarta encontrar variación al analizar más muestras de la misma especie, o muestras proveniente de otras poblaciones.

A pesar de ser marcadores heredables, los diseñados en este trabajo fueron monomórficos en la muestra poblacional analizada. Este resultado, a primera vista, no los hacen útiles para posteriores usos en aplicaciones genéticas en trucha arcoíris ni las otras especies examinadas (Olsen et al, 1998). Sin embargo, se debe considerar que la muestra usada en el estudio fue reducida, y que se trabajó con un grupo de salmones que mostraron una tasa de crecimiento mayor al ser alimentadas con dietas con remplazo de nutrientes animales por vegetales (Jilberto, 2015). Esto puede significar que en estos EST puedan ser monomórficos porque hay una probabilidad de que en esta muestra de truchas se hayan seleccionado alelos que respondan mejor a este tipo de dieta.

La heterocigosidad y la diversidad alélica son ambas medidas de variación genética (Silverstein, 2004). En otros estudios de microsatélites tipo EST-SSR, como en Zhou et al. (2014), se encontraron polimorfismos más abundantes en los set desarrollados (1.222 alelos en 204 pares de partidores), pero se trabajó con 10 familias distintas de alfalfa (*Medicago sativa* L.). En el estudio de Santos et al. (2015), solo un 7% del set de 42 pares de microsatélites tipo EST-SSR resultó ser monomórficos, pero nuevamente se usaron 24 familias distintas de castaños para el estudio. Las truchas utilizadas en el presente estudio fueron escogidas directamente por su capacidad para responder a dietas con remplazo de aceite y proteínas vegetales, por lo que los EST de los cuales se obtuvieron los microsatélites se relacionan a ese fenotipo, por lo tanto una baja variación genética es probable.

Por otro lado, Ding et al. (2015) obtuvo una diversidad genética moderada de los marcadores EST-SSR utilizando 7 poblaciones de *Phoebe chekiangensis*. Sin embargo, no se reportaron marcadores monomórficos, siendo solo un total de 8 marcadores de un total de 41 los que tuvieron un *PIC* bajo (entre 0 y 0,25). En el caso de Yi et al. (2016) con 8 individuos *Torreya grandis*, de un total de 108 marcadores microsatélites detectados en minería de EST, 37 amplificaron productos estables y solo 18 resultaron monomórficos. Sin embargo fueron muestreados 29 individuos de poblaciones silvestres, elegidos aleatoriamente, los que se genotiparon.

En un estudio en trucha arcoíris realizados con microsatélites de origen genómico, Silverstein et al. (2007) usaron nueve microsatélites para caracterizar tres poblaciones de truchas arcoíris domesticadas, y concluyeron que las tres eran únicas con una amplia variación genética entre cada cepa, con un promedio de 71,5% entre las tres cepas estudiadas. Esto sugiere que mientras más diversa sea la población estudiada, mayor será la variación alélica, explicando la baja variación del presente estudio.

Se recomienda que los resultados obtenidos en este trabajo sean validados en un set de muestras más amplio de poblaciones de *O. mykiss* distintas al estudiado y posiblemente en otras especies del mismo género (Liu et al., 2016).

Prueba de segregación mendeliana

Al igual que para la diversidad genética, los tres marcadores fueron monomórficos en la familia analizada para segregación mendeliana, por lo que el cruzamiento no fue informativo para evaluar el modo de herencia de estos marcadores.

CONCLUSIONES

Existe un set original de tres microsatélites en trucha arcoíris, tipo SSR-EST, de fácil reproducción localizados en genes candidatos potencialmente asociados a caracteres relacionados al uso de dietas con remplazo de proteínas y aceites de origen animal por otros de origen vegetal.

Este set de microsatélites es monomórfico y no informativo en las muestras analizadas, por lo que las pruebas de segregación no indican información de su modo de herencia, por el hecho de no haber variación en los genotipos en los individuos analizados.

La amplificación cruzada muestra una alta transferibilidad dentro del género *Oncorhynchus* y parcialmente en el género *Salmo*, de acuerdo a lo esperado según la cercanía filogenética con trucha arcoíris.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, A.; N. Valderrama; R. Farlora; F. Lafarga de la Cruz and C. Gallardo. 2014. Development of novel polymorphic EST-SSR markers in Californian abalone *Haliotis rufescens* and genetic analysis in wild and hatchery-bred populations. *Aquaculture Research*, 45: 1942-1952.

Aqua Acuicultura + Pesca. 2016. Catastro de acuicultura 2014-2015 en Chile. [en línea]. Recuperado en <<http://www.aqua.cl/catastros/catastro-de-acuicultura-2014-15/>>. Consultado el: 21 de diciembre de 2016.

Blaxter, M.; A. Danchin; B. Savakis; K. Fukami-Kobayashi; K. Kurokawa; S. Sugano et al. 2016. Reminder to deposit DNA sequences. *Science*, 352: 780.

Castillo, H, 2009. Comparación y evaluación de metodologías de identificación familiar en salmónidos usando marcadores moleculares y marcas físicas. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 56 p.

Chen, H.; L. Qiao; L. Wang; S. Wang; M. Wohlgemuth and X. Cheng. 2015. Assessment of genetic diversity and population structure of mung bean (*Vigna radiate*) germplasm using EST-based and genomic SSR markers. *Gene*, 566: 175-183.

Colihueque, N. and F. Estay. 2010, jan/feb. Trout farming in Chile: Country leads global production, further growth possible. *Global aquaculture advocate*: 30-31.

Díaz, N.; C. Araneda; P. Iturra y R. Neira. 2005. El Uso de Marcadores Genético Moleculares en el Mejoramiento Genético de Peces. (Serie de Publicaciones para la Acuicultura N°4), Universidad de Chile. 63 p.

Díaz, N. 2002. La era de los marcadores microsatélites en estudios genéticos: Aplicación en especies de acuicultura en Chile. *Avances en producción animal*, 27:3-7.

Ding, Y.; J. Zhang; Y. Lu; E. Lin; L. Lou and Z. Tong. 2015. Development of EST-SSR markers and analysis of genetic diversity in natural populations of endemic and endangered plant *Phoebe chekiangensi*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 63: 183-189.

Duran, C.; R. Singhanian; H. Raman; J. Batley and D. Edwards. 2013. Predicting polymorphic EST-SSRs *in silico*. *Molecular Ecology Resources*, 13: 538-545.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Italia. 2016. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2016: Contribución a la Seguridad Alimentaria y la Nutrición Para Todos. Roma: 224 p.

Glover, K. 2008. Genetic characterization of farmed rainbow trout in Norway: intra-and inter-strain variation reveals potential for identification of escapees. *BMC Genetics*, 9: 1-10.

Gross, R.; P. Lulla, and T. Paaver. 2007. Genetic variability and differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains in northern and Eastern Europe. *Aquaculture*, 272S1: 139-146.

Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5: 435-445.

Hardy, R. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research*, 41: 770-776.

Iturra, P.; V. Cambiazo; M. González; R. Pulgar; A. Maass; A. Di Genova et al. 2012. Genómica de Salmónidos: Identificación de genes asociados al uso de proteínas y aceites vegetales en la nutrición en salmón del Atlántico y trucha arcoíris. *Versión Diferente*, 9: 36 – 40.

Jilberto, F. 2015. Marcadores SNPS para rasgos de crecimiento en genes diferencialmente expresados como respuesta a dietas con inclusión de nutrientes vegetales en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Memoria Ingeniero en Biotecnología Molecular. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 71p.

Johnson, N.; C. Rexroad; E. Hallerman; R. Vallejo y Y. Palti. 2007. Development and evaluation of a new microsatellite multiplex system for parental allocation and management of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstocks. *Aquaculture*, 266: 53-62.

Kumar, B.; U. Kumar and H. Kumar. 2015. Identification of EST-SSRs and molecular diversity analysis in *Mentha piperita*. *The Crop Journal*, 3: 335-342.

Lin, Y. and A. Zhan. 2016. Population genetic structure and identification of loci under selection in the invasive tunicate, *Botryllus schlosseri*, using newly developed EST-SSRs. *Biochemical Systematics and Ecology*, 66: 331-336.

Liu, S.; Y. Palti; K. Martin; J. Parsons and C. Rexroad. 2016. Assessment of genetic differentiation and genetic assignment of comercial rainbow trout strains using a SNP panel. *Aquaculture*, 468: 120-125.

Liu, Z. J. and J. F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.

Macrogen. 2016. Macrogen Humanizing Genomics. [en línea]. USA. Recuperado en: <<http://www.macrogen.com/eng/>> Consultado el: 22 de diciembre de 2016.

NCBI GenBank. 2016. [en línea]. Maryland, USA. Recuperado en: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> Consultado el: 20 de diciembre de 2016.

O'Reilly, P.T.; L. Hamilton; S. McConnell and J. Wright. 1996. Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmosalar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Canadian Journal Fish Aquatic Science*, 53: 2292-2298.

Olsen, J.; P. Bentzen and J. Seeb. 1998. Characterization of seven microsatellite loci derived from pink salmon. *Molecular Ecology Primer Notes*, 7: 1083-1090.

Ortiz, J. y Pérez, F. 2005. Desarrollo de marcadores genéticos tipo microsatélites en secuencias EST para mapeo genético en *Litopenaeus vannamei*. *Serie Zoológica*, 1: 44-50.

Rexroad, C. E.; M. Rodriguez; I. Coulibaly; K. Gharbi; R. Danzmann and J. DeKoning. 2005. Comparative mapping of expressed sequence tags containing microsatellites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics*, 6(54).

Santos, C.; T. Zhebentyayeva; S. Serrazina; C. Nelson and R. Costa. 2015. Development and characterization of EST-SSR markers for mapping reaction to *Phytophthora cinnamomi* in *Castanea spp.* *Scientia Horticulturae*, 194: 181-187.

Silverstein, J.; C. Rexroad and T. King. 2004. Genetic variation measured by microsatellites among three strains of domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*, 35: 40-48.

- Tacon, A. and M. Metian. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285: 146-158.
- Taggar, J.B.; R. Hynes; P. Prodöuhl and A. Ferguson. 1992. A Simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology*, 40: 963-965.
- Untergasser, A.; H. Nijveen; X. Rao; T. Bisseling; R. Geurts and J. Leunissen. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35: 71-74.
- Williamson, K. S.; J. Cordes and B. May. 2002. Characterization of microsatellite loci in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and cross-species amplification in other salmonids. *Molecular Ecology Notes*, 2: 17-19.
- Wood, A.; A. Beaumont; D. Skibinski and G. Turner. 2003. Analysis of a nuclear-DNA marker for species identification of adults and larvae in the *Mytilus edulis* complex. *Journal of Molluscan Studies*, 69: 61-66.
- Yi, G.; T. Zhao; Z. Yin; P. Tang; Y. Qiu and X. Yao. 2016. Mining and characterizing EST-SSR markers from ESTs of *Torreya grandis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 65: 124-128.
- Zhou, Q.; T. Chen; Y. Wang and Z. Liu. 2014. The development of 204 novel EST-SSRs and their use for genetic diversity analyses in cultivated alfalfa. *Biochemical Systematics and Ecology*, 57: 227-230.

APÉNDICES

Apéndice I. Cántigos ensamblados

Cántigo	Genebank	Pb	Gen codificante	E value
1	Sin coincidencias significativas	372		
2	NM_001124248	1284	Apolipoprotein A-I-2	
4	Sin coincidencias significativas	472		
5	NM_001124750	390	Reticulon 4 (rtn4), mRNA	0.0
6	NM_001124724	369	Simple type I keratin (LOC100136778), mRNA	1e-47
7	Sin coincidencias significativas	399		
8	AF281329	430	Haptoglobin fragment 1 mRNA, partial cds	5e-71
11	Sin coincidencias significativas	389		
12	Sin coincidencias significativas	407		
15	Sin coincidencias significativas	491		
16	Sin coincidencias significativas	422		
17	Sin coincidencias significativas	324		
18	Sin coincidencias significativas	450		
23	Sin coincidencias significativas	453		
24	Sin coincidencias significativas	422		
29	KT891428	406	Microsatellite my176aUCh sequence.	5e-81
32	AY471613	449	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 isoform B precursor (LEAP2B) gene, complete cds	0.0
33	NM_001161448	388	Apolipoprotein A-II (apoa2), mRNA	4e-176
34	Sin coincidencias significativas	400		
35	Sin coincidencias significativas	366		
40	KT891427		Microsatellite Omy158UCh sequence	7e-89
41	KT891430	401	Microsatellite Omy161UCh sequence	1e-82
44	Sin coincidencias significativas	411		
46	Sin coincidencias significativas	371		
49	Sin coincidencias significativas	444		
50	Sin coincidencias significativas	469		

Cóntigo	Genebank	Pb	Gen codificante	E value
52	Sin coincidencias significativas	715		
54	KP013084	310	Voucher Omykiss_1 mitochondrion, complete genome	LodgeLab 1e-126
55	Sin coincidencias significativas	399		
62	Sin coincidencias significativas	436		
64	Sin coincidencias significativas	451		
71	Sin coincidencias significativas	349		
72	Sin coincidencias significativas	581		
73	Sin coincidencias significativas	406		
75	Sin coincidencias significativas	217		
79	Sin coincidencias significativas	402		
85	Sin coincidencias significativas	340		
89	GU228520	408	Clock 1a protein (Clock1a) gene, partial cds	2e-165
92	Sin coincidencias significativas	351		
95	Sin coincidencias significativas	429		
98	NM_001124601	554	Differentially regulated trout protein 1 (LOC100136615), mRNA	4e-33
102	KJ851798	930	Clone 143K08 non-LTR retrotransposon jockey-like, complete sequence; sexually dimorphic on the Y chromosome protein (sdY) gene, complete cds; and transposon TC1-like and non-LTR retrotransposon Pol-like, complete sequence	0.0
103	AF452171	438	lysozyme type II gene, complete cds	0.0
110	KP013084	163	voucher Omykiss_1 mitochondrion, complete genome	LodgeLab 1e-53

Cóntigo	Genebank	Pb	Gen codificante	E value
113	LC050735	172	mitochondrial DNA, complete genome	4e-54
116	GU018123	145	voucher T1-Mkt 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	2e-51
118	AJ003118	1022	mRNA for somatic lipoprotein receptor, partial	0.0
122	Sin coincidencias significativas	516		
124	Sin coincidencias significativas	435		
128	BT073678	387	clone omyk-evo-502-337 Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 putative mRNA, complete cds	2e-65
129	Sin coincidencias significativas	104		
130	HE974763	338	mRNA for trout C-polysaccharide binding protein 1 (TCBP1 gene), isoform 1	2e-113
134	Sin coincidencias significativas	392		
138	Sin coincidencias significativas	208		
141	Sin coincidencias significativas	259		
142	Sin coincidencias significativas	254		
143	NM_001172496	492	CCAAT/enhancer binding protein alpha (LOC100379111), mRNA	4e-102
145	Sin coincidencias significativas	498		
151	NM_001124248	1209	apolipoprotein A-I-2 (apoa-i-2), mRNA	0.0
156	Sin coincidencias significativas	251		

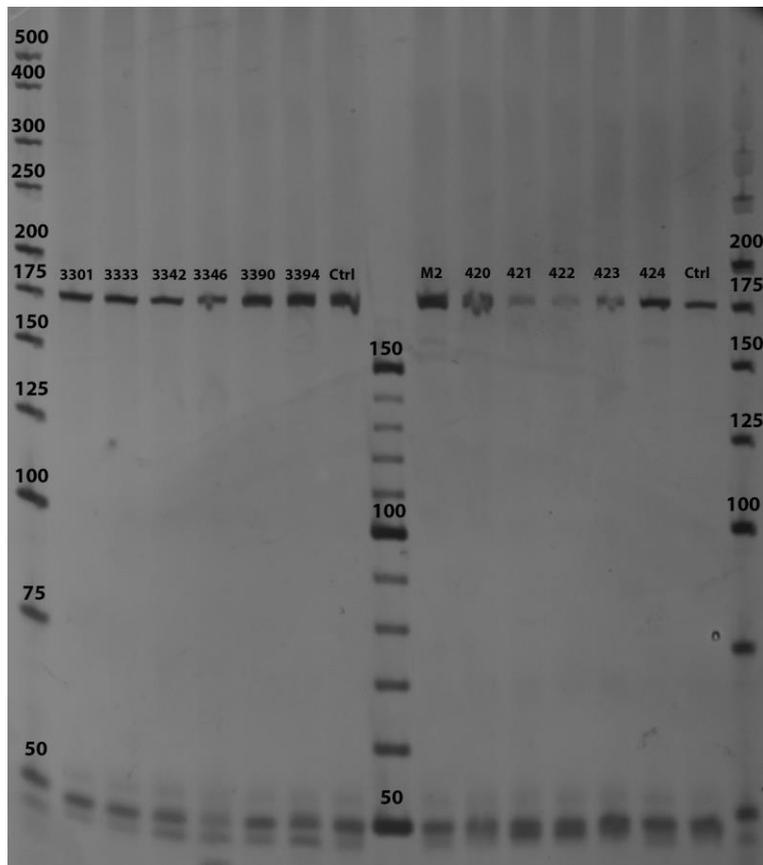
Apéndice II. Microsatélites encontrados en los cóntigos ensamblados a partir de las secuencias EST.

Cóntigo	Tamaño	Motivo microsatélite	Repeticiones	Principio	Fin	%p
1	372	CCTT	3	247	257	9%
2	1284	CT	7	147	159	7%
2	1284	TC	12	379	403	8%
2	1284	CCG	4	527	538	8%
2	1284	GCC	4	952	962	9%
2	1284	ACC	4	1159	1170	8%
7	398	ATAAAC	2	106	117	0%
7	398	CTC	4	248	259	0%
12	407	TGGATG	2	315	326	0%
15	491	CTGA	3	58	69	8%
15	491	AATT	3	151	162	8%
15	491	AT	7	224	236	7%
16	422	GGTGCT	2	201	212	0%
17	324	TC	6	118	129	8%
29	406	TGT	5	131	145	6%
29	406	G	6	233	238	0%
29	406	CTC	4	368	379	8%
33	388	TG	7	27	39	7%
34	398	TCACAC	2	233	244	0%
34	398	CA	6	264	274	9%
34	398	CA	8	313	328	6%

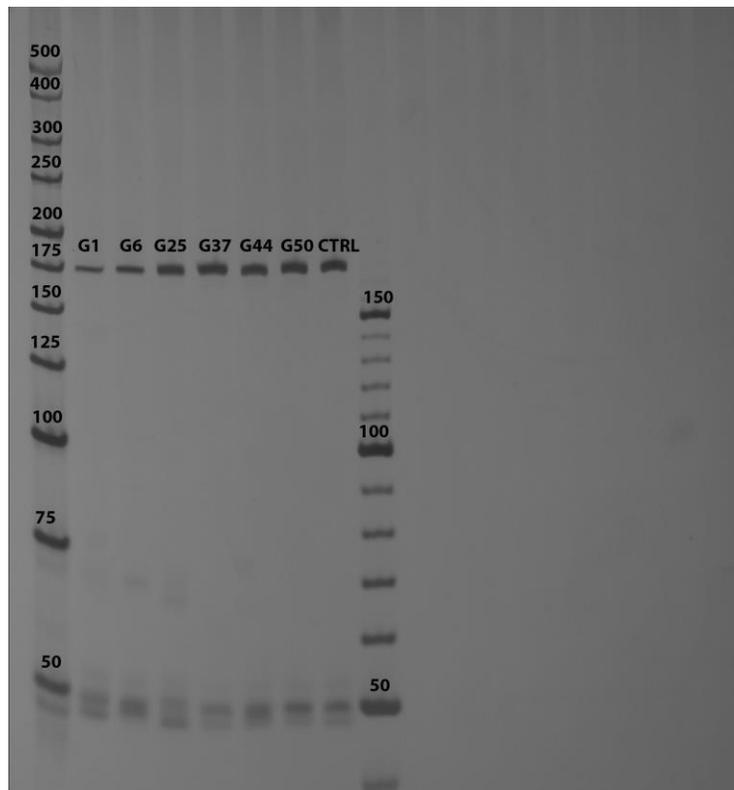
Cóntigo	Tamaño	Motivo microsatélite	Repeticiones	Principio	Fin	%p
40	394	ATTTG	3	284	297	7%
41	398	AGCTAC	2	60	71	0%
41	398	TG	13	214	238	4%
46	369	TAG	4	38	49	8%
49	443	CCTC	3	153	165	7%
52	715	TCCTTC	2	295	306	0%
62	436	CTGG	3	256	267	8%
62	436	CACTGA	2	359	370	0%
62	436	CAGC	4	389	404	6%
71	349	TGA	4	138	148	9%
71	349	TACAAT	2	250	261	0%
71	349	TGGATT	2	318	329	0%
79	401	T	11	43	53	0%
79	401	CTAAAT	2	314	325	0%
92	347	T	9	190	198	0%
122	508	ATGTCT	2	333	344	0%
122	508	ACT	4	365	376	8%
128	378	AC	6	152	163	8%
128	378	ATCCAA	2	376	378	0%
134	391	GAG	4	121	133	7%
138	207	GTA	4	25	35	9%

Cóntigo	Tamaño	Motivo microsatélite	Repeticiones	Principio	Fin	%p
141	241	G	9	139	147	0%
143	475	GT	14	21	48	7%
143	475	CTG	5	392	407	6%
145	484	GCTA	3	60	71	8%
145	484	TAGT	3	112	123	8%
145	484	ACAG	3	146	157	8%
145	484	CTAG	3	168	179	0%
145	484	GAG	5	390	403	7%
145	484	TGA	5	407	421	6%
151	1203	CA	12	109	120	8%
151	1203	CT	11	154	164	9%
151	1203	CT	59	383	441	5%
151	1203	TGCCGC	12	558	569	0%
151	1203	CTGA	11	949	959	9%
156	243	CCAA	11	58	68	9%

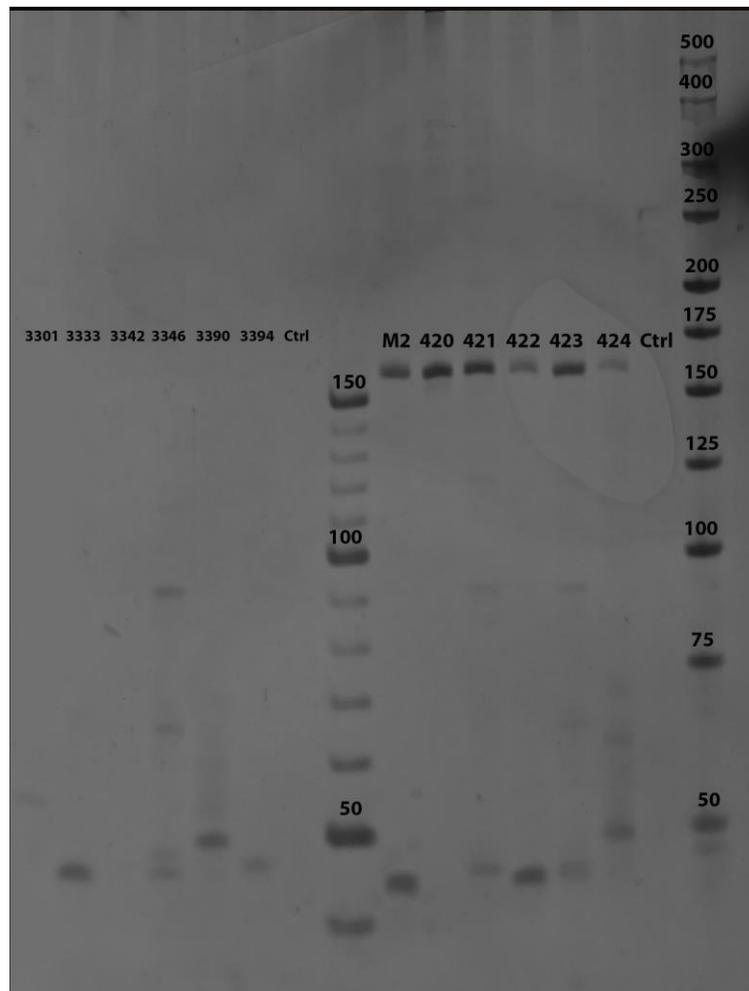
*%p= porcentaje de imperfección del microsatélite.



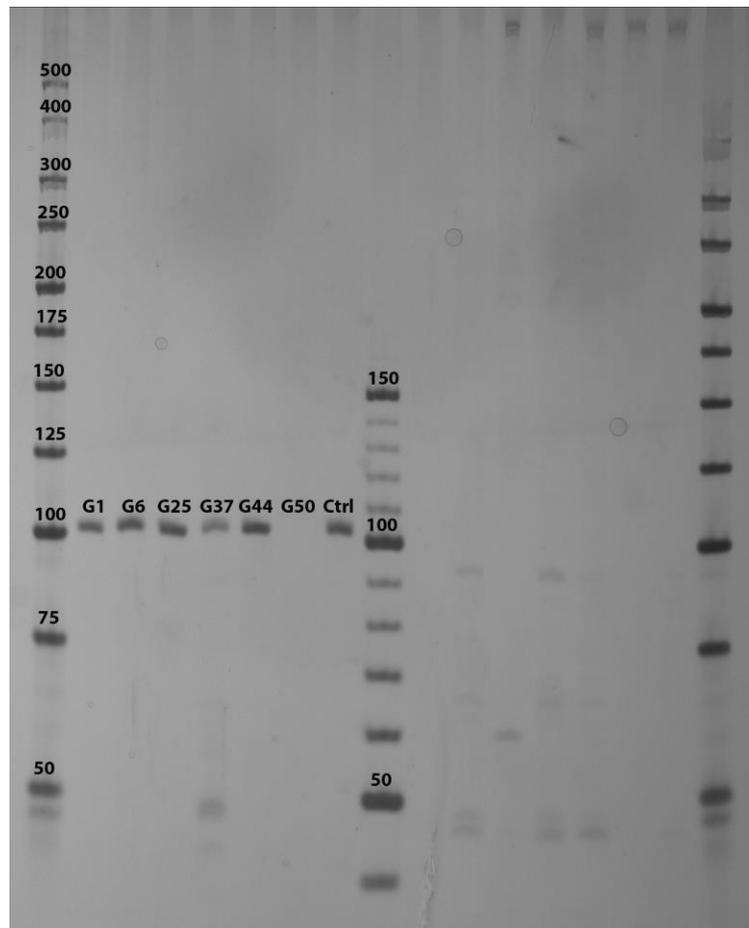
Apéndice III. Gel de poliacrilamida al 40% para el marcador *Omy158UCh* en seis muestras de salmón del Atlántico en la izquierda (muestras 3301, 3333, 3342, 3346, 3390, 3394) y salmón Coho a la derecha (muestras M2, 420, 421, 422, 423, 424), utilizando una muestra de trucha arcoíris como control positivo (Ctrl).



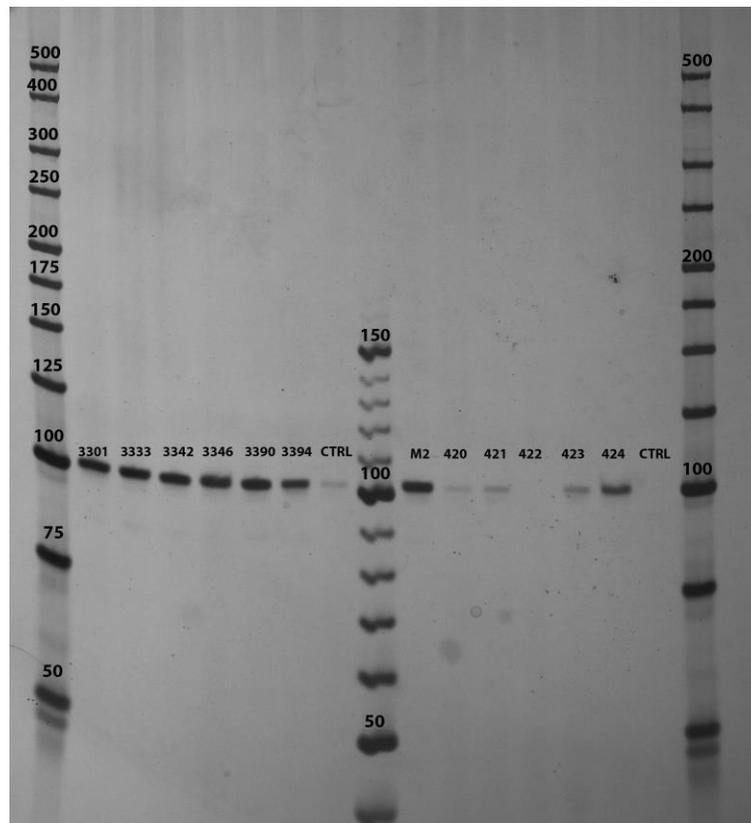
Apéndice IV. Gel de poliacrilamida al 40% para el marcador *Omy158UCh* en muestras de trucha café, usando muestra de trucha arcoíris como control positivo (Ctrl).



Apéndice V. Gel de poliacrilamida al 40% para el marcador *Omy176aUCh* en muestras de salmón del Atlántico a la izquierda y salmón Coho a la derecha, usando muestra de trucha arcoíris como control positivo (Ctrl).



Apéndice VI. Gel de poliacrilamida al 40% para el marcador *Omy176bUCh* en muestras de trucha café, usando muestra de trucha arcoíris como control positivo (Ctrl).



Apéndice VII. Gel de poliacrilamida al 40% para el marcador *Omy176bUCh* en seis muestras de salmón del Atlántico en la izquierda (muestras 3301, 3333, 3342, 3346, 3390, 3394) y salmón Coho a la derecha (muestras M2, 420, 421, 422, 423, 424), utilizando una muestra de trucha arcoíris como control positivo (Ctrl).