

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y  
BIOTECNOLOGÍA**



**“Desarrollo de nuevos marcadores microsatelitales  
específicos para el elefante marino del norte,  
*Mirounga angustirostris*”**

Tesis para obtener el grado de  
Maestría en Ciencias

Presenta

Biol. Alejandro Dueñes Meza

Ensenada, Baja California. Diciembre de 2011  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

**“Desarrollo de nuevos marcadores microsatelitales  
específicos para el elefante marino del norte,  
*Mirounga angustirostris*”**

TESIS QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS PRESENTA

**BIÓL. ALEJANDRO DUEÑES MEZA**

Aprobada por:



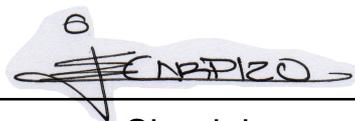
---

Co-Directora de Tesis  
Dra. Yolanda Schramm Urrutia



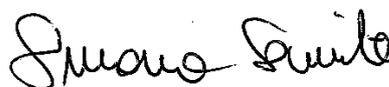
---

Co-Director de Tesis  
Dr. Pedro Cruz Hernández



---

Sinodal  
Dr. Eugenio Carpizo Ituarte



---

Sinodal  
Dra. Simona Sanvito

## RESUMEN

El elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) fue cazado intensamente durante el siglo XIX, lo que llevó a la población a un cuello de botella severo; sólo sobrevivieron de 20 a 100 individuos. Aunque la población actual se ha recuperado demográficamente, análisis con diferentes marcadores moleculares como son las alozimas, secuenciación del mtDNA, minisatélites, MHC (Major Histocompatibility Complex) y cebadores de microsatélites desarrollados para otras especies de pinnípedos, han revelado una diversidad genética muy baja; esto ha complicado obtener los niveles de resolución que se requieren para realizar estudios poblacionales. Además se han desarrollado 7 pares de cebadores específicos para *M. angustirostris*, pero sólo uno es polimórfico con 2 alelos. Estos cebadores específicos fueron desarrollados a partir de genotecas tradicionales, las cuales tienen una tasa de éxito menor en comparación con las genotecas desarrolladas con protocolos enriquecidos. Por lo tanto, el objetivo del trabajo fue diseñar cebadores específicos mediante el desarrollo de genotecas enriquecidas, para obtener microsatélites polimórficos que permitan incrementar la cantidad de cebadores polimórficos disponibles para esta especie. A partir de muestras de DNA de 6 machos y 6 hembras de *M. angustirostris* de las Islas San Benito, Baja California, México se construyeron 4 genotecas enriquecidas de microsatélites por medio de las sondas biotiniladas (CT)<sub>15</sub>, (GT)<sub>15</sub>, (CTGT)<sub>6</sub> y (GATA)<sub>10</sub>. Se seleccionaron las clonas positivas, y a partir de 160 secuencias se detectaron 89 loci de microsatélites (55%), esta proporción es superior a lo reportado en otros pinnípedos cuando se usaron genotecas tradicionales, y similar o superior cuando se comparan con resultados de genotecas enriquecidas. La mayoría de los microsatélites fueron del tipo puro (90%), dinucleótidos (56%) y tetranucleótidos (30%), en estos tipos de microsatélite es donde se ha observado más polimorfismo. Se diseñaron 48 pares de cebadores y se lograron estandarizar las condiciones de amplificación por medio de PCR de gradientes en 24 pares de cebadores. Se lograron genotipar exitosamente 22 loci, en donde se observó un promedio de alelos por locus de  $1.7 \pm 1.2$  (rango de 1-6 alelos), estos valores son similares a otros estudios en donde se utilizaron cebadores de microsatélites de otras especies de pinnípedos en *M. angustirostris*. Los niveles de variación de microsatélites reportados en el presente trabajo se encuentran entre los más bajos encontrados en pinnípedos, similar a la foca monje del Mediterráneo (*Monachus monachus*) y la foca monje de Hawaii (*Monachus*

*schauinslandi*), las cuales también presentaron un cuello de botella genético y caza intensiva. Se obtuvieron 9 loci polimórficos con un promedio de alelos por locus de  $2.7 \pm 1.3$  (rango de 2-6 alelos) los cuales se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg con un promedio de  $H_o=0.434$  y  $H_e=0.403$ . Sin embargo, estos valores son bajos comparados con los obtenidos en el desarrollo de marcadores de microsatélite específicos en otras especies de pinnípedos. Los niveles bajos de polimorfismo en *M. angustirostris*, se pueden atribuir al cuello de botella que sufrió la especie durante el siglo XIX, análisis con diferentes marcadores moleculares también han revelado un bajo nivel de variación genética debido a esta reducción de la población. Cuando no se tiene la suficiente resolución para realizar estudios poblacionales o de comportamiento reproductivo, es necesario incrementar el número de loci utilizados, es por eso que aunque con niveles de polimorfismo y heterocigosidad por debajo del promedio de otras especies de pinnípedos, los cebadores microsatelitales diseñados para el *M. angustirostris* contribuirán a incrementar los niveles de resolución que se requieren para realizar estudios poblacionales en *M. angustirostris* y otras especies de pinnípedos.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a la Dra. Yolanda Schramm Urrutia por su acertada co-dirección en esta tesis y aceptarme bajo su tutoría, sin su valioso apoyo académico y personal, la realización de esta tesis no hubiera sido posible. Su gran ánimo y disposición a todo momento fueron muy valiosos.

Al Dr. Pedro Cruz Hernández por la co-dirección de esta tesis, sus comentarios y enseñanzas fueron muy importantes para comprender todo el proceso de aislamiento de microsatélites.

A la Dra. Simona Sanvito, por su constante apoyo técnico y teórico para la realización de esta tesis.

Al Dr. Eugenio Carpizo Ituarte, por sus atinados comentarios y revisiones en esta tesis que fueron de gran ayuda.

A la M. en C. Yareli Esquer por su apoyo en la primera fase de este trabajo, gracias por tus enseñanzas en el laboratorio.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de la maestría (registro núm. 217567).

Al Elephant Seal Research Group por financiar esta tesis y facilitar las muestras de DNA para realizar este trabajo.

Al Dr. Faustino Camarena por la facilitación del laboratorio del Biología Molecular en la Facultad de Ciencias.

A los profesores del Posgrado en Ecología Molecular y Biotecnología por sus enseñanzas durante las clases de la Maestría.

A mis compañeros del Posgrado, por su apoyo y las experiencias vividas.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular, por su apoyo y consejos.

A los compañeros del laboratorio de Genética Acuícola y del laboratorio de Biotecnología Marina del CIBNor por su apoyo durante mi estancia en La Paz.

Pero sobre todo quiero agradecer a las personas más importantes en mi vida: mi Padre Alejandro, mi Madre Blanca Estela y Hermano Edgar Isaí por su comprensión y apoyo incondicional durante todo el transcurso de mi Maestría, muchas gracias.

Gracias a todos.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>1</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>7</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>8</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>8</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
<b>Extracción de DNA genómico</b> .....	<b>9</b>
<b>Aislamiento de microsatélites</b> .....	<b>10</b>
Digestión del DNA y unión de los fragmentos de DNA a adaptadores Super SNX.....	10
Enriquecimiento de los fragmentos con microsatélites y captura con perlas magnéticas.....	12
Recuperación del DNA enriquecido mediante PCR .....	15
Clonación del DNA enriquecido .....	16
Detección de clonas positivas.....	16
<b>Secuenciación</b> .....	<b>17</b>
<b>Análisis de secuencias</b> .....	<b>18</b>
<b>Diseño de los cebadores</b> .....	<b>18</b>
<b>Estandarización de cebadores</b> .....	<b>19</b>
<b>Genotipado</b> .....	<b>20</b>
<b>Análisis de genotipos</b> .....	<b>21</b>
<b>Análisis de variación genética</b> .....	<b>22</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
<b>Digestión del DNA y unión de los fragmentos de DNA a adaptadores Super SNX</b> .....	<b>23</b>
<b>DNA enriquecido con microsatélites</b> .....	<b>24</b>
<b>Aislamiento de microsatélites</b> .....	<b>25</b>
<b>Diseño de los cebadores</b> .....	<b>27</b>
<b>Estandarización de cebadores</b> .....	<b>27</b>
<b>Genotipado de muestras</b> .....	<b>28</b>
<b>Análisis de variación genética</b> .....	<b>31</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>32</b>
<b>Enriquecimiento de microsatélites</b> .....	<b>32</b>
<b>Aislamiento de microsatélites</b> .....	<b>32</b>
<b>Diseño de los cebadores</b> .....	<b>33</b>
<b>Estandarización de cebadores</b> .....	<b>36</b>
<b>Análisis de genotipos</b> .....	<b>37</b>
<b>Análisis de variación genética</b> .....	<b>42</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>44</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>46</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>47</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>52</b>

<b>Anexo 1.</b> Muestras de DNA de <i>M. angustirostris</i> genotipadas. ....	<b>52</b>
<b>Anexo 2.</b> Paneles de los loci de microsatélite diseñados para su genotipificación. Tamaño en pares de bases (pb).....	<b>53</b>
<b>Anexo 3.</b> Características de los 48 cebadores diseñados que cumplen con los valores de referencia, obtenidos a partir del programa de cómputo Primer3 v0.4.0. Máxima complementariedad (MC), Máxima complementariedad en 3' (MC-3'). Al cebador reverse se le agregó la secuencia universal M13(-21) (5' TGAAAACGACGGCCAGT 3'). .....	<b>55</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tamaño en pares de bases (pb) de los fragmentos digeridos con la enzima RSA1.....	23
<b>Figura 2.</b> Fragmentos del DNA digerido con RSA1 y unido a los adaptadores Super SNX. El tamaño de los fragmentos está entre los 300 y 2000 pb.....	24
<b>Figura 3.</b> Tamaño de los fragmentos de DNA enriquecidos con las repeticiones (GT) <sub>15</sub> , (CT) <sub>15</sub> , (GATA) <sub>10</sub> y (CTGT) <sub>10</sub> .....	25
<b>Figura 4.</b> Electroferograma de la muestra A07_0005 del locus Mang26, como ejemplo. Todas las muestras presentaron el mismo patrón .....	38
<b>Figura 5.</b> Electroferogramas de dos muestras del locus Mang31 en el genotipado A038_P1. a) La mayoría de las muestras presentaron el tamaño que se observó en gel, b) Las muestras A07_0005, A07_0008, A07_0542, A07_0549, A07_0559, A07_0574, A07_0575 y A07_0590 presentaron un tamaño y patrón de picos diferente a lo esperado.....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Éxito de aislamiento de microsatélites usando genotecas enriquecidas por medio de sondas biotiniladas, a partir de DNA de elefante marino del norte ( <i>Mirounga angustirostris</i> ).....	26
<b>Tabla II.</b> Tipo de microsatélites aislados usando genotecas enriquecidas por medio de sondas biotiniladas, a partir de DNA de elefante marino del norte ( <i>Mirounga angustirostris</i> ). .....	26
<b>Tabla III.</b> Cantidad de cebadores, de los 48 diseñados, que cumplen con el valor de referencia. La cantidad de cebadores está expresada como porcentaje. En el Anexo 3 se encuentran las características para cada par de cebadores.....	27
<b>Tabla IV.</b> Condiciones óptimas de amplificación de PCR de los microsatélites que fueron diseñados para <i>M. angustirostris</i> . Los ciclos de PCR fueron: 5 min a 95°C, 35 ciclos de 20 seg a 95°C, 20 seg de la temperatura de alineamiento (Ta) y 30 seg a 72°C; 8 ciclos de 20 seg a 95°C, 20 seg a 47°C y 30 seg a 72°C; finalmente un ciclo de 10 min a 72°C.....	28
<b>Tabla V.</b> Muestras, problemas observados en el primer genotipado y confirmación de asignación de alelos en los loci de <i>M. angustirostris</i> que se genotiparon por segunda ocasión.....	29
<b>Tabla VI.</b> Unidad de repetición, tamaño aproximado observado en gel (To), tamaño del producto asignado por electroforesis capilar y número de alelos de los loci genotipados de <i>M. angustirostris</i> . NA= No asignado. ....	30
<b>Tabla VII.</b> Número de alelos, heterocigosidad observada (H <sub>o</sub> ), heterocigosidad esperada (H <sub>e</sub> ), valor de P y desviación estándar (s.d.) en los loci polimórficos de <i>M. angustirostris</i> .....	31

## ANTECEDENTES

El elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) fue cazado intensamente durante el siglo XIX, lo que llevó a la especie a un cuello de botella severo de 20-100 individuos (Bartholomew y Hubbs, 1960; Hoelzel *et al.*, 1993). En 1810 comenzó la caza con fines comerciales (Townsend, 1885), posteriormente en 1860 la cacería se volvió inviable debido a sobreexplotación (Townsend, 1885) por lo que la especie fue considerada tres veces extinta, en 1870, 1884 y 1892 (Townsend, 1885; Townsend, 1912). En 1922 la población se estimó en 350 individuos y en ese año los elefantes marinos fueron protegidos por las leyes en Estados Unidos y en México (Bartholomew y Hubbs, 1960). A raíz de esta protección, la población se fue recuperando considerablemente, los censos de 1960 estimaron 15,000 individuos (Bartholomew y Hubbs, 1960); en 1980 la población aumentó a 120,000 individuos (Le Boeuf y Bonnell, 1980) y para 1991 se reportaron 127,000 individuos (Stewart *et al.*, 1994). Lo anterior permitió que se recuperara la distribución original de la especie, desde la Isla Natividad en Baja California Sur hasta Point Reyes en California (Stewart *et al.*, 1994).

Aunque la población actual se ha recuperado demográficamente, análisis con diferentes marcadores moleculares como son las alozimas (Bonnell y Selander, 1974), secuenciación del mtDNA (Hoelzel *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 2000; Abadía, 2005), minisatélites (Hoelzel *et al.*, 1999a) y MHC (Major Histocompatibility Complex) (Hoelzel *et al.*, 1999b; Weber *et al.*, 2004) han revelado una diversidad genética muy baja. Lo anterior, ha complicado obtener los niveles de resolución que se requieren para realizar estudios poblacionales como puede ser la estructura genética y comportamiento reproductivo.

Como ejemplo de los resultados antes mencionados, se puede citar la primera evaluación de variabilidad genética en *M. angustirostris*. Se analizaron 24 loci de alozimas, en 159 individuos y no se encontró polimorfismo (Bonnell y Selander, 1974). Posteriormente se analizaron 67 individuos en 43 loci y tampoco se encontró variabilidad genética (Hoelzel *et al.*, 1993). Sin embargo, los loci antes mencionados, resultan polimórficos en la mayoría de las especies de mamíferos (O'Brien *et al.*, 1980), incluso en el elefante marino del sur (*Mirounga leonina*) (Hoelzel, 1999).

Uno de los marcadores genéticos considerados como poderosos, por su alta tasa de mutación, y consecuente polimorfismo intrapoblacional, son los microsatélites (Weber, 1990; Schlötterer y Pemberton, 1994). Por ello, su uso en estudios poblacionales ha aumentado en los últimos años, como lo es el análisis sobre la estructura poblacional, parentesco, paternidad, ciencia forense y DNA antiguo (Zane *et al.*, 2002).

Los microsatélites son secuencias simples de repeticiones en serie de 2 a 6 pares de bases, que se encuentran distribuidos a lo largo del genoma, principalmente en regiones no codificantes (Weber, 1990; Schlötterer y Pemberton, 1994). Otras características de los microsatélites es que presentan herencia mendeliana codominante y se clasifican con base en el tipo y repetición que presentan (Weber, 1990; Schlötterer y Pemberton, 1994). Por ejemplo, repeticiones di, tri o tetranucleótidas con diferentes arreglos; entre ellos se encuentran los puros o perfectos, como (AC<sub>9</sub>); los puros interrumpidos, como (CA<sub>2</sub>)AA(CA<sub>12</sub>); los compuestos (GT<sub>2</sub>)(TG<sub>10</sub>); los compuestos interrumpidos (CT<sub>4</sub>)(GT<sub>2</sub>)CTAT(GT<sub>15</sub>) o los complejos (ACC<sub>8</sub>)TG(GA<sub>12</sub>)(TTA<sub>5</sub>)GC(TTA<sub>4</sub>) (Weber, 1990; Schlötterer y Pemberton, 1994).

Cuando no existen “primers” o cebadores para microsatélites diseñados a partir de la especie de interés (cebadores específicos), se pueden utilizar los cebadores diseñados a partir de especies cercanas (Zane *et al.*, 2002). Existen microsatélites desarrollados para especies cercanas a *M. angustirostris*, como son los de la foca gris, *Halichoerus grypus* (Allen *et al.*, 1995; Gemmel *et al.*, 1997); foca común, *Phoca vitulina* (Coltman *et al.*, 1996; Goodman, 1996); lobo fino del sur, *Arctocephalus australis* (Gemmell *et al.*, 1997); morsa, *Odobenus rosmarus* (Buchanan *et al.*, 1998); foca de Weddell, *Leptonychotes weddellii* (Davis *et al.* 2002); foca cangrejera, *Lobodon carcinophagus* (Davis *et al.*, 2002); foca leopardo *Hydrurga leptonyx* (Davis *et al.*, 2002; Gelatt *et al.*, 2009); lobo marino de California, *Zalophus californianus* (Hernández-Velázquez *et al.*, 2005); lobo fino de la Antártica, *Arctocephalus gazella* (Hoffman *et al.*, 2008); lobo marino de Galápagos, *Zalophus wollebaeki* (Hoffman *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2005) y lobo marino de Steller, *Eumetopias jubatus* (Huebinger *et al.*, 2007).

Sin embargo, se ha observado que los cebadores inespecíficos pueden mostrar bajos niveles de polimorfismo cuando se incrementa la distancia evolutiva (Rubinsztein *et al.*, 1995 y Morin *et al.*, 1998).

El análisis de polimorfismo en el elefante marino del norte, mediante cebadores de microsatélites desarrollados para especies de pinnípedos, cercanas a *M. angustirostris*, han revelado poca variabilidad genética (Garza, 1998; Sanvito y Galimberti, com. pers.)<sup>1</sup>.

Los Drs. Sanvito y Galimberti, del Elephant Seal Research Group (ESRG), actualmente trabajan con cebadores de loci de microsatélites diseñados para pinnípedos y obtenidos de la literatura, para analizar la paternidad en colonias de *M. angustirostris*. El ESRG

---

<sup>1</sup> Drs. Simona Sanvito y Filippo Galimberti, Elephant Seal Research Group.

probó 95 pares de cebadores en *M. angustirostris*, de los cuales 37 de ellos son polimórficos, con un promedio de  $2.7 \pm 1.1$  alelos por locus y un máximo de 6 (Sanvito y Galimberti, com. pers.)<sup>2</sup>.

También existen 7 pares de cebadores específicos para *M. angustirostris*, pero sólo uno es polimórfico con 2 alelos (Allen, 1996; Garza, 1998; Hoelzel *et al.*, 1999a; Hoelzel *et al.*, 2001; Sanvito y Galimberti, com. pers.<sup>2</sup>). Estos cebadores específicos fueron desarrollados a partir de genotecas tradicionales, las cuales tienen una tasa de éxito menor en comparación con las genotecas desarrolladas con protocolos enriquecidos (Zane *et al.*, 2002). Es decir, el éxito obtenido a partir de genotecas tradicionales, es de entre 0.04 a 12%; mientras que con protocolos a partir de genotecas enriquecidas, éste es de entre 20 a 90% (Zane *et al.*, 2002). Por lo tanto, el uso de bibliotecas enriquecidas podría permitir diseñar mayor cantidad de cebadores específicos.

Mediante la creación de genotecas tradicionales, los loci de microsatélite son aislados a partir de la creación de bibliotecas genómicas parciales (con un tamaño pequeño de inserto) de la especie de interés, seleccionando las clonas a través de hibridación de la colonia a través de sondas con repeticiones de microsatélites. Esta estrategia funciona bien en organismos con abundantes loci de microsatélite, sin embargo, este enfoque no es eficiente cuando las repeticiones de microsatélite son menos abundantes (Zane *et al.*, 2002; Glenn y Schable, 2005).

Por lo tanto, dos clases de estrategias de enriquecimiento han sido desarrolladas: 1) por extensión del cebador (Ostrander *et al.*, 1992; Paetkau *et al.*, 1999) y 2) por medio de la captura de microsatélite por hibridación (Armour *et al.*, 1994; Kandpal *et al.*, 1994; Kijas *et*

---

<sup>2</sup> Drs. Simona Sanvito y Filippo Galimberti, Elephant Seal Research Group.

*al.*, 1994; Glenn y Schable, 2005). La captura por hibridación es la estrategia de mayor uso, ya que permite la selección de loci de microsatélites antes de la clonación, y por lo tanto, es más rápido y más fácil de trabajar para la amplificación simultánea de varios microsatélites (*multiplexing*), en comparación con el enriquecimiento por extensión del cebador, el cual requiere la aprobación de cada biblioteca a través de dos cepas de bacterias (Glenn y Schable, 2005).

Actualmente, el método más eficiente para la detección y aislamiento de microsatélites es el de genotecas enriquecidas por medio de sondas biotiniladas (Glenn y Schable, 2005).

Aunque existen diferentes estrategias para el genotipado de microsatélites, actualmente el método de marcado de fragmentos de PCR con fluorescencia, propuesto por Smith *et al.* (1986) y modificado por Schuelke (2000), es de los más económicos.

Esta técnica consiste en la utilización de tres cebadores: un cebador específico *forward* (o *reverse*) con una adición del cebador universal M13(-21) en su extremo 5', un cebador específico *reverse* (o *forward*) y un cebador universal M13(-21) marcado con fluorescencia. Durante los ciclos de PCR los cebadores específicos *forward* con M13(-21) y *reverse* se alinean al DNA templado y se amplifica el producto de PCR; después, en un ciclo con temperatura de alineamiento específica del cebador M13(-21) se alinean los productos que contienen cebadores específicos con M13(-21) con los cebadores M13(-21) marcados con fluorescencia, de esta forma se obtienen productos de PCR, que incluyen el cebador universal, marcados con fluorescencia para su posterior detección por electroforesis capilar (Schuelke, 2000). Debido a su alta precisión por la adición del cebador M13(-21), la asignación de alelos es mucho más sencilla (Boutin-Ganache *et al.*,

2001), además se pueden utilizar diferentes marcadores fluorescentes para realizar *multiplexing* (Schuelke, 2000).

Por lo tanto, el presente trabajo busca diseñar cebadores microsatelitales específicos para *M. angustirostris*, a partir de la construcción de genotecas enriquecidas, por medio de sondas biotiniladas y genotipificación de los microsatélites mediante el marcado de fragmentos de PCR con fluorescencia.

## HIPÓTESIS

En base a la abundancia y utilidad reportada de los marcadores tipo microsatélite en otras especies relacionadas con *M. angustirostris*, se esperan obtener por medio de la construcción de genotecas enriquecidas, marcadores con elevado polimorfismo que permitan incrementar la cantidad de cebadores polimórficos disponibles para esta especie.

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar cebadores microsatelitales específicos para el elefante marino del norte, *Mirounga angustirostris*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Caracterizar microsátélites presentes en *M. angustirostris*.
- 2) Diseñar cebadores específicos para *M. angustirostris*.
- 3) Estandarizar condiciones de PCR para los cebadores diseñados, en *M. angustirostris*.
- 4) Evaluar el polimorfismo en *M. angustirostris*.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de 12 muestras de tejido epidérmico de 6 machos y 6 hembras de *M. angustirostris*, recolectadas en las islas San Benito, Baja California, México, durante 2004 y 2005. Las muestras y la extracción fueron facilitadas por la Dra. Simona Sanvito; la extracción se realizó por medio del kit Qiagen DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) siguiendo el protocolo para cola de ratones con pequeñas modificaciones para mejorar la digestión del tejido y la extracción de ADN.

La calidad y concentración del DNA extraído de cada individuo se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, se emplearon como estándares, un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb), marca Invitrogen y un marcador de bajo peso molecular (20 ng/μL, Invitrogen). De acuerdo a la concentración (ng/μL) de DNA en cada muestra, se calculó el volumen necesario para obtener una mezcla de DNA con una concentración de 3 a 4 μg totales. La mezcla de DNA (de las 12 muestras) se precipitó con 100 μL de etanol (EtOH) 100% y 24 μL de acetato de sodio 3M, y se colocó a -20°C durante 15 horas. Se realizó un lavado del DNA con EtOH 70%, se centrifugó la muestra a 14,000 rpm durante 5 min y se eliminó el resto de EtOH con una centrifuga de vacío. La mezcla de DNA se resuspendió en 200 μL de agua milli-Q (mQ). Para verificar que la mezcla de DNA presentara una buena concentración (50 ng/μL) se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.2% y se comparó con un marcador de baja masa molecular.

## **Aislamiento de microsatélites**

Para el aislamiento de marcadores microsatelitales en *M. angustirostris* se partió de la construcción de una librería genómica parcial enriquecida, por medio del método de propuesto por Glenn y Schable (2005) y siguiendo las modificaciones del trabajo realizado por Esquer-Garrigos (2008).

### *Digestión del DNA y unión de los fragmentos de DNA a adaptadores Super SNX*

Con el objetivo de obtener fragmentos de DNA con un tamaño entre los 500 y 1500 pb se digirió una porción del DNA con una solución que contenía: 2.5 µL de la enzima RSA1 (10 U/µL) (sitio de restricción GT<sup>A</sup>AC), 2.5 µL del buffer RsaI 10X y 20 µL de la mezcla de DNA. Esta reacción se incubó a 37°C durante 24 horas. Mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, se comprobó el intervalo en tamaño de los fragmentos de DNA. Como estándar se empleó el marcador de peso molecular de 100 pb.

Los fragmentos de DNA obtenidos de la digestión se unieron a los adaptadores Super SNX-24 forward (5'GTTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATC) y Super SNX-24 + 4P reverse (5'pGATTCTGCTAGCTAGGCCTTAAACAAAA).

Como primer paso se crearon adaptadores de doble cadena (*ds*) para lo cual se mezclaron volúmenes iguales en cantidades equimolares (ej. 50 µL de cada adaptador con una concentración de 10 mM c/u) y se le añadió 2 µL de NaCl 5M. Esta mezcla se calentó a 95°C durante 5 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se preparó una reacción de ligación del DNA digerido a los adaptadores de doble cadena, esta se llevó a cabo en un volumen final de 40.6 µL, con 1.72 mM de Super SNX-24 *ds*,

16000 unidades de DNA Ligasa T4, solución amortiguadora de ligasa T4 1x, 739 unidades de la enzima Xmn1 y 20  $\mu$ L de DNA digerido.

La reacción de ligación se dejó en incubación a 16°C durante ~15 horas. Transcurrido este tiempo, se realizó una reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para comprobar que la reacción de ligación resultó eficiente. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L, que contenía una masa de 15 a 20 ng de DNA ligado a adaptadores, solución amortiguadora para Taq DNA polimerasa 1x (Invitrogen),  $MgCl_2$  2mM (Invitrogen), dNTPs 200  $\mu$ M (Invitrogen), Super SNX-24 forward, 0.4  $\mu$ M (Invitrogen), y 2 unidades de Taq DNA polimerasa (Platinum Taq, Invitrogen).

Las condiciones del termociclador para la amplificación por PCR incluyeron: un periodo inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C, seguido de 30 ciclos. Cada uno de estos ciclos consistió en 20 segundos (seg) de desnaturalización a 95°C, 20 seg de reincorporación o acoplamiento de los cebadores a 60°C y 30 seg de extensión a 72°C. Por último, un ciclo de 2 min de extensión final a 72°C.

El intervalo en tamaño y la concentración del producto de PCR se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa 1.2%, se emplearon como estándares el marcador de peso y de baja masa molecular. Una vez que se comprobó que la ligación resultó eficiente, se realizaron 3 reacciones más de la PCR de la ligación; una por cada sonda a emplear durante el enriquecimiento.

### *Enriquecimiento de los fragmentos con microsatélites y captura con perlas magnéticas.*

El producto de la PCR de la ligación fue hibridado a sondas que contenían repeticiones de microsatélites. Las sondas empleadas fueron los dinucleótidos CT<sub>15</sub> y GT<sub>15</sub> y los tetranucleótidos CTGT<sub>6</sub> y GATA<sub>10</sub>. Estas sondas fueron sintetizadas con biotina en su extremo 5'.

Para cada reacción de hibridación se preparó un volumen final de 50 µL, que contenía 10 µL de DNA ligado a adaptadores (producto de PCR), sonda biotinilada 1 µM, solución de hibridación 2x (12x SSC: NaCl 1.8 M, citrato de sodio 0.18 M, pH 7.0; SDS -dodecil sulfato sódico- 0.2%).

De acuerdo con la concentración de las sondas y la concentración de sales en la reacción, se calculó la temperatura de incorporación o hibridación (T<sub>m</sub>), de cada sonda en el programa OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies). A partir de esta T<sub>m</sub> se programó el ciclo de la PCR para la hibridación. El ciclo de la PCR para las sondas de dinucleótidos incluyó: periodo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 minutos (min), seguido de un descenso rápido de temperatura hasta los 80°C y una disminución de 0.2°C cada 5 seg durante 99 pasos, la temperatura se mantuvo a 60°C durante 10 min, posteriormente descendió 0.5°C cada 5 seg durante 20 pasos hasta alcanzar los 40°C. Por último se mantuvo en espera a 15°C.

El ciclo de PCR para las sondas de tetranucleótidos incluyó: periodo inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguido de un descenso rápido de temperatura hasta los 75°C y disminuyendo 0.2°C cada 5 seg por 99 pasos y permaneció a 55°C por

10 min, después descendió 0.5°C cada 5 seg durante 20 pasos hasta alcanzar los 35°C. Por último se mantuvo en espera a 15°C.

El propósito de este programa de PCR es permitir que los fragmentos de DNA que contienen microsatélites se unan a las sondas de repetición. Al emplear un intervalo tan amplio de temperatura durante el ciclo de PCR se favorece la hibridación de repeticiones largas.

Después del ciclo de la PCR se realizó un lavado de perlas magnéticas (50 µL por cada reacción de hibridación). Por cada sonda empleada se tomaron 50 µL de perlas magnéticas marcadas con estreptavidina (Dynabeads M-280, Invitrogen), y se realizaron los siguientes lavados:

- a) Dos lavados con 250 µL de TE (Tris 10 mM y EDTA 1 mM). En cada lavado se recuperaron las perlas en solución mediante una unidad magnética colectora (ó *MPC* por Magnetic Particles Colector).
- b) Dos lavados con 250 µL de la solución de hibridación Hyb 1x (6x SSC: NaCl 0.9 M, citrato de sodio 0.09 M, pH 7.0; SDS 0.1%). En cada lavado se recuperaron las partículas empleando el *MPC*.

Posteriormente, se resuspendieron las perlas en 150 µL de la solución Hyb 1x y a este volumen se le añadió el producto de la hibridación. Después se colocaron las muestras en un agitador vertical a baja velocidad y a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se separaron los fragmentos de DNA (que contenían

repeticiones complementarias a las sondas) unidos a las perlas magnéticas mediante el *MPC*.

Se realizaron los siguientes lavados:

- a) Dos lavados con 400  $\mu$ L de SSC 2x, SDS 0.1%. Entre cada lavado se capturaron los fragmentos de DNA unido a las perlas mediante el *MPC* y se eliminó el sobrenadante.
  
- b) Dos lavados con 400  $\mu$ L de SSC 1x, SDS 0.1%. En este paso las soluciones de dinucleótidos se calentaron a 65°C durante 3 min inmediatamente después del primer lavado y a 68°C después del segundo lavado. Las soluciones de tetranucleótidos se calentaron a 55°C durante tres min inmediatamente después del primer lavado y a 58°C por tres min durante el segundo lavado. Entre cada lavado se eliminó el sobrenadante empleando el *MPC*.

A cada muestra se le añadió 200  $\mu$ L de TLE (TrisHCl 10 mM, LDAO 0.025 y EDTA 1 mM, pH 7.0), se mezcló y se incubó a 95°C durante 5 min en un block de calentamiento. Transcurrido este tiempo, se recuperó inmediatamente el sobrenadante con ayuda del *MPC* y se colocó en un nuevo tubo. Esta solución se conoce como "*pure gold*"; contiene el DNA enriquecido con microsatélites. Las soluciones se recuperaron inmediatamente después del calentamiento, para evitar que los fragmentos de DNA que contienen microsatélites vuelvan a unirse a las perlas magnéticas.

A cada producto del enriquecimiento se le añadieron 22  $\mu$ L de NaOAc 3M, se mezcló y se le agregaron 444  $\mu$ L de EtOH 95%. Se almacenaron las muestras a -20°C durante 12 horas.

Se centrifugaron las muestras a 14000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se realizó un lavado de las muestras con EtOH 70%, se removió el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 14000 rpm durante un minuto. Se removió todo residuo de EtOH con una centrifuga de vacío. Finalmente se resuspendió el DNA enriquecido en 25 µL de TLE y se mantuvo en hidratación durante al menos 30 min antes de proceder con el paso siguiente.

### *Recuperación del DNA enriquecido mediante PCR*

Para recuperar la doble cadena del DNA enriquecido con microsatélites, se realizó una PCR para cada enriquecimiento. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL, que contenía solución amortiguadora para Taq DNA polimerasa 1x (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 2mM (Invitrogen), 400 µM de dNTP Mix (Invitrogen), 0.6 µM de Super SNX-24 forward (Invitrogen), 2 unidades de Taq DNA polimerasa (Platinum Taq, Invitrogen) y 5 µL de DNA enriquecido.

Las condiciones del termociclador para la amplificación por PCR incluyeron: un periodo inicial de desnaturalización de 4 min a 95°C, seguido de 30 ciclos. Cada uno de estos ciclos consistió en 20 seg de desnaturalización a 95°C, 20 seg de reincorporación o acoplamiento de los cebadores a 60 °C y 40 seg de extensión a 72°C. Por último, un ciclo de 2 min de extensión final a 72°C.

Para comprobar la concentración y el intervalo en tamaño del DNA enriquecido se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% empleando un marcador de peso y baja masa molecular como estándar.

### *Clonación del DNA enriquecido*

Cada producto de PCR del DNA enriquecido fue clonado mediante el empleo del producto comercial TOPO TA Cloning Kit for sequencing (Invitrogen). Se utilizó el vector pCR 4-TOPO, para transformar las células *E. coli* TOP 10 incluidas en el kit y siguiendo las especificaciones del proveedor.

Para realizar la inserción del DNA enriquecido o "*pure gold*" al vector de clonación, se tomaron 2  $\mu$ L de DNA enriquecido, 1  $\mu$ L del Vector pCR 4-TOPO TA (Invitrogen), 1  $\mu$ L de solución salina ( $\text{NaCl}_2$  1.2 M,  $\text{MgCl}_2$  0.1 M) y 2  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$  mQ (para la construcción de cada genoteca). La mezcla se incubó 20 min a temperatura ambiente, después se agregaron 2  $\mu$ L del inserto a las bacterias competentes *E. coli* (Invitrogen), por medio de choque térmico a 42°C por 30 seg y se dejó incubar 30 min. en hielo.

### *Detección de clones positivas*

La detección de colonias recombinantes que contuvieron el plásmido con inserto se efectuó en placas de agar LB con ampicilina (100 mg/mL). La presencia del inserto de interés se verificó tomando una pequeña muestra de las colonias con un palillo estéril y sumergiéndolo en 5  $\mu$ l de agua mQ en un tubo de PCR. Para la reacción de PCR se utilizó una mezcla de los cebadores M13 Fw (5' GTAAAACGACGGCCAG 3'), M13 reverse (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') y una sonda con la repetición de interés (CT<sub>15</sub>, GT<sub>15</sub>, CTGT<sub>6</sub> o GATA<sub>10</sub>), de acuerdo con el método sugerido por Wang, *et al.* (2007). De cada colonia amplificada se realizó un duplicado en cajas de Petri nuevas con medio LB sólido y ampicilina (100mg/mL), en caso de que la clona contuviera un inserto de interés.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ , que contenía solución amortiguadora para Taq DNA polimerasa 1x (Invitrogen),  $\text{MgCl}_2$  2.5 mM (Invitrogen), 440  $\mu\text{M}$  de dNTP Mix (Invitrogen), 440  $\mu\text{M}$  de sonda biotinilada, M13 forward 440  $\mu\text{M}$ , M13 reverse 440  $\mu\text{M}$ , 0.5 unidades de Taq DNA polimerasa (Platinum Taq, Invitrogen) y 5  $\mu\text{L}$  de DNA enriquecido.

Las condiciones del termociclador para la amplificación por PCR incluyeron: un periodo inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C, seguido de 30 ciclos. Cada uno de estos ciclos consistió en 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de reincorporación o acoplamiento de los cebadores a 50 °C y 1 min de extensión a 72°C. Por último, un ciclo de 10 min de extensión final a 72°C.

Mediante electroforesis en gel de agarosa 1.2% se detectaron y seleccionaron las clonas que mostraban un patrón de barrido acorde a la presencia de microsatélites. Las clonas seleccionadas fueron reamplificadas para su secuenciación empleando únicamente los cebadores M13 forward y M13 reverse y bajo las condiciones y ciclo de PCR ya descrito.

## **Secuenciación**

El tamaño y la concentración de los productos amplificados se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa 1.2% empleando como estándares el marcador de peso molecular y la escalera de baja masa molecular. Se seleccionaron para secuenciar las clonas que amplificaron productos entre los 500 y 1500 pb y que contenían una concentración de al menos 100 ng/ $\mu\text{L}$ . Las clonas fueron secuenciadas con los cebadores M13F (5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') y M13R-pUC (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') empleando un secuenciador automático 3730x1 DNA analyzer (Macrogen, Corea).

## **Análisis de secuencias**

La detección de microsatélites se realizó con la ayuda del programa ChromasPro versión 1.31 (Technelysium Pty). Como criterios para la selección de secuencias útiles para el posterior diseño de cebadores se consideró: a) tipo de microsatélite (ej., puro, interrumpido ó compuesto) y longitud de la unidad de repetición (ej., al menos 4 repeticiones), b) distancia entre la ubicación del microsatélite y la zona que contenía parte de la secuencia del vector de clonación y del adaptador SuperSNX24 y c) presencia de largas repeticiones de poli-A ó poli-T en las regiones adyacentes al microsatélite.

## **Diseño de los cebadores**

El diseño de cebadores se realizó en el programa en línea Primer3, versión. 0.4.0 (Rozen y Skaletsky, 2000) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) respetando los parámetros ya establecidos en el programa (ej. longitud óptima de los cebadores de 20 pb, temperatura óptima de alineamiento de 60°C, contenido de GC 20-80%).

Se utilizó el programa Reverse Complement (Bioinformatics Organization, <http://www.bioinformatics.org/sms/index.html>) para convertir la secuencia del cebador reverse a 3'-5'.

Mediante el programa OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies) se analizó la posible formación de estructuras secundarias tipo "*hairpin*", homodímeros y heterodímeros en los cebadores diseñados.

## Estandarización de cebadores

Se utilizaron 8 muestras de *M. angustirostris* para realizar la estandarización de la Tm de los cebadores mediante PCR de gradientes. Esta estandarización se realizó en diferentes etapas:

1) Se realizaron PCR con gradiente de temperaturas, en donde el volumen final de la reacción fue de 15  $\mu$ L, que contenía solución amortiguadora para Taq DNA polimerasa 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTP Mix 200  $\mu$ M, cebador forward 0.3  $\mu$ M, cebador reverse 0.75  $\mu$ M que incluía la secuencia universal M13(-21) (5' TGTAACGACGGCCAGT 3'), marcador fluorescente (Hex, Fam, Ned) unido a la secuencia universal M13(-21) 0.3  $\mu$ M (Schuelke, 2000) y 0.02 unidades de Taq DNA polimerasa (Promega). Las condiciones del termociclador para la amplificación por PCR incluyeron: un periodo inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C, seguido de un periodo de 35 ciclos y otro de 8 ciclos. En el primer periodo, los ciclos consistieron en 20 seg de desnaturalización a 95°C, 20 seg de reincorporación o acoplamiento de los cebadores en un gradiente de 40 a 64°C y 30 seg de extensión a 72°C. En el segundo periodo los ciclos consistieron en 20 seg de desnaturalización a 95°C, 20 seg de reincorporación o acoplamiento de los cebadores a 47°C y 30 seg de extensión a 72°C. Por último, un ciclo de 10 min de extensión final a 72°C. Finalmente, se usó el ciclo de espera a 4°C.

2) Para verificar la amplificación y tamaño del producto, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.7%.

3) En los cebadores que presentaron una condición óptima (banda intensa y limpia en el gel) se amplificaron por PCR 22 muestras de DNA de *M. angustirostris* (Anexo 1) más un

control negativo con cada par de cebadores que se logró estandarizar exitosamente. Las condiciones del termociclador incluyeron: un periodo inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C, seguido de un periodo de 35 ciclos y otro de 8 ciclos. En el primer periodo, los ciclos consistieron en 20 seg de desnaturalización a 95°C, 20 seg de reincorporación o acoplamiento de los cebadores a la temperatura estandarizada de cada cebador y 30 seg de extensión a 72°C. En el segundo periodo los ciclos consistieron en 20 seg de desnaturalización a 95°C, 20 seg de reincorporación o acoplamiento de los cebadores a 47°C y 30 seg de extensión a 72°C. Por último, un ciclo de 10 min de extensión final a 72°C. Finalmente, se usó el ciclo de espera a 4°C.

4) Si desde la etapas anteriores no se identificaron condiciones óptimas (como falta de amplificación, amplificación débil, amplificación sucias o con especificidad, etc.), se cambiaron las condiciones (temperatura y/o concentración de  $MgCl_2$ ) y se repitió la PCR con gradiente, para después seguir desde la etapa 2.

5) Si con la etapa anterior aún no se obtenía amplificación, se les aumentó la concentración final de cebador reverse con TAG a 0.3 mM.

## **Genotipado**

Se utilizaron las 22 muestras de DNA de *M. angustirostris* amplificadas por PCR (Anexo 1) más un control negativo de cada par de cebadores que se logró estandarizar exitosamente, para realizar el genotipado.

Para preparar los productos de PCR para su genotipado; se realizaron cuatro paneles (multiplexes) de 6 loci de microsatélites, cada uno dividido con base en el tamaño (pb)

aproximado del producto de PCR como fue observado en gel de agarosa y tipo de marcador fluorescente de manera que los loci no se traslaparon (Anexo 2). En cada panel se realizó una mezcla de los productos de PCR con una concentración variable (Anexo 2) en un volumen final de 10  $\mu$ L en cada una de las muestras. Se hizo una dilución de 1:5 con H<sub>2</sub>O DDE; se tomaron 2  $\mu$ L de esta dilución y se mezclaron con 10  $\mu$ L de una mezcla de formamida (Applied Biosystems) con la escalera de DNA GeneFlo™ 625 adicionada con marcador fluorescente ROX(ChimerX). Esta mezcla final se envió al laboratorio Biotechnology Center of the University of Wisconsin para ser genotipado en un secuenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems) (Envío A038\_P1). Las muestras que no presentaron señal, la señal fue débil o confusa en los resultados del genotipado, se mandaron a genotipar de nuevo (Envío A053\_P1).

### **Análisis de genotipos**

Los resultados del genotipado se analizaron con el programa GeneMarker versión 1.85 (SoftGenetics LLC) de acuerdo a los parámetros establecidos en el programa y se asignaron los tamaños de los alelos. Los parámetros utilizados fueron los siguientes:

Auto ajuste (Auto Range): Elimina la zona donde se encuentran los dímeros formados por los cebadores y reactivos no consumidos.

Eliminación de ruido (Smooth): Esta función suaviza la línea de base mediante la eliminación de pequeños picos de ruido.

Corrección de saturación (Saturation correction): Los instrumentos de genotipado saturan los picos intensos, que son mayores a 8000 RFU (Unidades Relativas de Fluorescencia,

por sus siglas en inglés), por lo que la cima del pico se parte en dos y puede aparecer un pico de *pull-up*. Esto también se puede deber a un exceso de DNA templado producto de PCR.

Eliminación de línea de base (Baseline subtraction): Elimina la línea de base para que el eje de las Y se eleve por encima del nivel del ruido.

Corrección por suma de picos (*Pull-up Correction*): Elimina los picos causados por la longitud de onda de otros marcadores fluorescentes.

Eliminación de burbujas (*Spike Removal*): Elimina los picos causados por subidas de tensión provocados por micro-burbujas de aire o suciedad.

Asignación del tamaño (*Size Call*): Estima el tamaño de los picos mediante el método "*Local Southern*", el cual realiza una interpolación de los puntos de la escalera de DNA para asignar el tamaño a los alelos, la escalera de DNA utilizada fue GeneFlo™ 625.

Asignación de alelos (*Allele Call*): Encuentra alelos y les asigna su tamaño, para asegurarse que el programa los asignó de manera correcta se revisaron de forma manual por dos personas hasta llegar a una concordancia en su atribución.

## **Análisis de variación genética**

El análisis de heterocigosidad esperada, heterocigosidad observada y desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó mediante el programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier *et al.*, 2005).

## RESULTADOS

### Digestión del DNA y unión de los fragmentos de DNA a adaptadores Super SNX

En la Figura 1 se muestra el producto de la digestión de la mezcla del DNA de las muestras, con la enzima RSA1; el tamaño se encontró entre los 100 y 2000 pb. Los fragmentos del DNA digerido y ligado a los adaptadores Super SNX, se puede observar en la Figura 2.

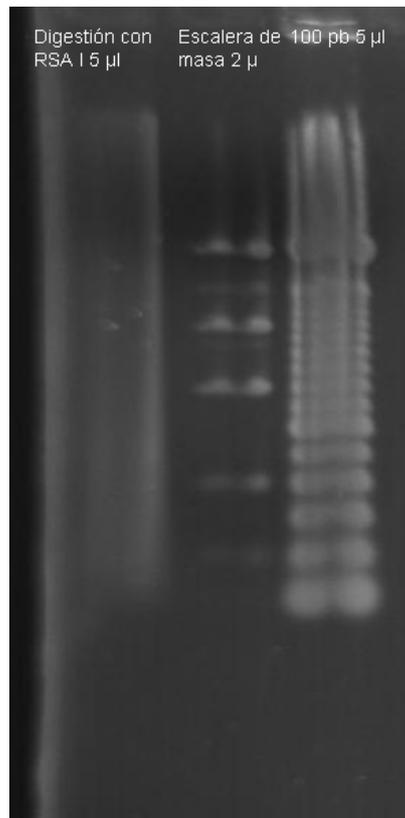


Figura 1. Tamaño en pares de bases (pb) de los fragmentos digeridos con la enzima RSA1.

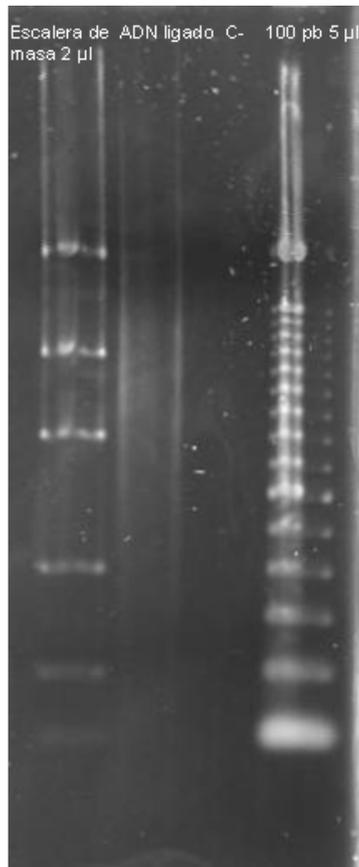


Figura 2. Fragmentos del DNA digerido con RSA1 y unido a los adaptadores Super SNX. El tamaño de los fragmentos está entre los 300 y 2000 pb.

### **DNA enriquecido con microsatélites**

Los fragmentos con la repetición  $(GT)_{15}$  se encontró entre 300 y 900 pb, los fragmentos enriquecidos con la repetición  $(CT)_{15}$  se encontraron entre los 500 y 2000 pb, el enriquecimiento del DNA con la repetición  $(GATA)_{10}$  comprendió entre los 500 y 2000 pb y los fragmentos enriquecidos con  $(CTGT)_{10}$  tuvieron un tamaño entre los 500 y 2000 pb (Figura 3).

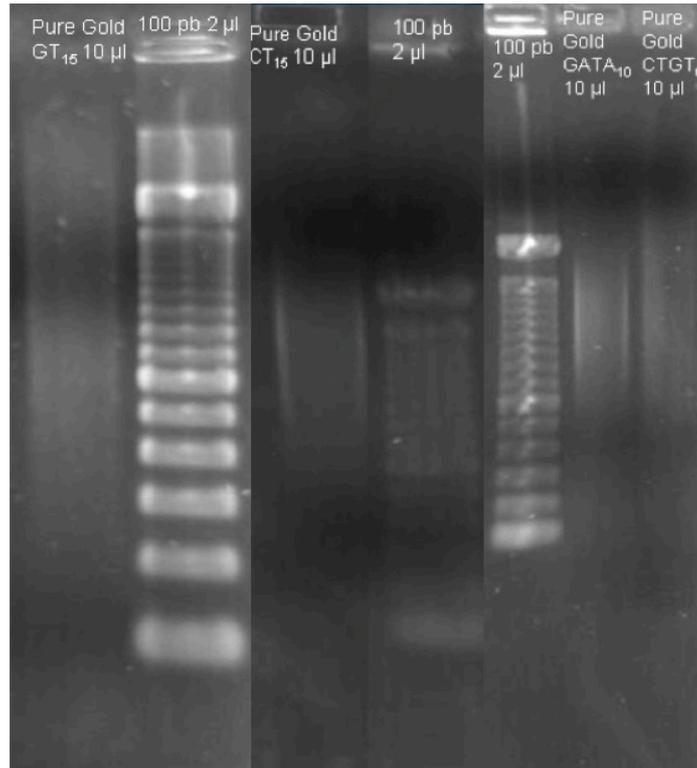


Figura 3. Tamaño de los fragmentos de DNA enriquecidos con las repeticiones (GT)<sub>15</sub>, (CT)<sub>15</sub>, (GATA)<sub>10</sub> y (CTGT)<sub>10</sub>.

### Aislamiento de microsatélites

El éxito global en el aislamiento de microsatélites por medio de genotecas enriquecidas, fue de 55% (Tabla I). En algunos casos las clonas con microsatélites secuenciados no presentaron la sonda correspondiente, es decir, alguno de los microsatélites no corresponden a la sondas utilizada [(GT)<sub>15</sub>, (CT)<sub>15</sub>, (CTGT)<sub>6</sub>, (GATA)<sub>10</sub>].

Tabla I. Éxito de aislamiento de microsatélites usando genotecas enriquecidas por medio de sondas biotiniladas, a partir de DNA de elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*).

<b>Genoteca</b>	<b>Clonas secuenciadas</b>	<b>Clonas con microsatélites</b>	<b>Éxito de aislamiento (%)</b>
(GT) <sub>15</sub>	36	28	78
(CT) <sub>15</sub>	27	15	55
(CTGT) <sub>6</sub>	17	4	24
(GATA) <sub>10</sub>	80	41	51
<b>Total</b>	<b>160</b>	<b>88</b>	<b>55</b>

Con base en el número de repeticiones, la mayoría de los microsatélites aislados, fueron dinucleótidos (Tabla IIa) y con base a su pureza, los más abundantes fueron los puros y los puros interrumpidos (Tabla IIb).

Tabla II. Tipo de microsatélites aislados usando genotecas enriquecidas por medio de sondas biotiniladas, a partir de DNA de elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*).

a) Cantidad de microsatélites por repetición

<b>Tipo de microsatélite</b>	<b>Cantidad</b>
Dinucleótido	50
Trinucleótido	10
Tetranucleótido	27
Trinucleótido-Tetranucleótido	1
Dinucleótido-tetranucleótido	1
<b>Total</b>	<b>89</b>

b) Cantidad de microsatélites por pureza

<b>Tipo de microsatélite</b>	<b>Cantidad</b>
Puro	39
Puro interrumpido	41
Compuesto	1
Compuesto interrumpido	7
Complejo	1
<b>Total</b>	<b>89</b>

## Diseño de los cebadores

Se diseñaron 48 pares de cebadores a partir de 89 loci de microsatélites. Las características de los cebadores diseñados son superiores a los valores de referencia (Tabla III).

Tabla III. Cantidad de cebadores, de los 48 diseñados, que cumplen con el valor de referencia. La cantidad de cebadores está expresada como porcentaje. En el Anexo 3 se encuentran las características para cada par de cebadores.

<b>Característica</b>	<b>Valor de referencia</b>	<b>Cantidad de cebadores (%)</b>
Máxima complementariedad	$\leq 8$	100
Máxima complementariedad en 3'	$\leq 3$	85
Tamaño en pb	$\geq 18$	75
Temperatura de reincorporación, Tm (°C)	$\geq 50$	98
% de GC	$\geq 20$	100

## Estandarización de cebadores

De los 48 pares de cebadores diseñados, se lograron amplificar 24 loci microsatélites. Las condiciones óptimas de amplificación para cada par de cebadores diseñados y el contenido de mezcla óptima se encuentran en la Tabla IV.

Tabla IV. Condiciones óptimas de amplificación de PCR de los microsatélites que fueron diseñados para *M. angustirostris*. Los ciclos de PCR fueron: 5 min a 95°C, 35 ciclos de 20 seg a 95°C, 20 seg de la temperatura de alineamiento (Ta) y 30 seg a 72°C; 8 ciclos de 20 seg a 95°C, 20 seg a 47°C y 30 seg a 72°C; finalmente un ciclo de 10 min a 72°C.

<b>Locus</b>	<b>[Cebador reverso] (µM)</b>	<b>[MgCl<sub>2</sub>] (mM)</b>	<b>Ta (°C)</b>
Mang01	0.3	1.5	55
Mang03	0.75	1.5	55
Mang04	0.75	1.5	55
Mang05	0.75	1.5	55
Mang06	0.75	1.5	55
Mang09	0.75	1.5	52
Mang14	0.3	1.5	55
Mang16	0.75	1.5	58
Mang17	0.75	1.5	55
Mang21	0.75	1.5	55
Mang23	0.75	1.25	57
Mang26	0.75	1.2	60
Mang27	0.75	1.5	55
Mang31	0.75	2.25	52
Mang33	0.75	1.5	55
Mang34	0.75	1.7	61
Mang35	0.75	1.5	53
Mang36	0.75	1.5	55
Mang37	0.75	1.5	56
Mang38	0.75	1.5	56
Mang41	0.75	1.5	55
Mang43	0.75	1.5	55
Mang44	0.75	1.5	55
Mang48	0.75	1.5	55

### **Genotipado de muestras**

Nueve loci microsatélite demostraron polimorfismo. Después del primer genotipado (A038\_P1) se observó que algunas muestras en el electroferograma no presentaron señal, la señal fue débil o confusa, por lo que se genotiparon de nuevo (A053\_P1). Aunque solo en algunas muestras de los loci Mang09 y Mang31 no fue posible asignar alelos tras el primer genotipado, se genotiparon de nuevo todas las muestras de estos

dos loci ya que el número de muestras con problemas fue grande. En la Tabla V se observa cuales muestras presentaron problemas.

Tabla V. Muestras, problemas observados en el primer genotipado y confirmación de asignación de alelos en los loci de *M. angustirostris* que se genotiparon por segunda ocasión.

<b>Locus</b>	<b>Muestras</b>	<b>Problemas observados</b>	<b>Confirmación de alelos</b>
Mang01	A07_0007, A07_0560, A07_0561, A07_0562, A07_0565	Sin señal	Sí
Mang05	A07_0575	Señal débil	Sí
Mang09	A07_0007, A07_0543, A07_0546, A07_0549, A07_0560, A07_0562, A07_0571, A07_0573, A07_0574, A07_0580	Señal débil y señal confusa.	Sí
Mang21	A07_0559, A07_0590.	Señal débil	Sí
Mang23	Todas las muestras	Señal confusa	Sí
Mang26	Todas las muestras	Señal confusa	No
Mang27	A07_0007	Señal débil	Sí
Mang31	A07_0005, A07_0008, A07_0542, A07_0549, A07_0559, A07_0574, A07_0575 y A07_0590	Señal confusa	No
Mang33	A07_0560, A07_0592	Señal débil	Sí
Mang34	A07_0005, A07_0007, A07_0562, A07_0571	Señal débil	Sí
Mang38	A07_0571, A07_0573, A07_0574, A07_0575, A07_0580, A07_0590, A07_0592	Sin señal	Sí

El número de alelos para cada uno de los 24 loci que se amplificaron exitosamente y el tamaño del producto amplificado se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI. Unidad de repetición, tamaño aproximado observado en gel (To), tamaño de los productos asignados por electroforesis capilar y número de alelos de los loci genotipados de *M. angustirostris*. NA= No asignado.

<b>Locus</b>	<b>Unidad de repetición</b>	<b>To</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	<b>Núm. de alelos</b>
Mang01	(CT) <sub>2</sub> GT(CT) <sub>4</sub> ...(CT) <sub>10</sub>	230	230 234	2
Mang03	(TA) <sub>5</sub>	150	165	1
Mang04	(GA) <sub>9</sub>	120	123	1
Mang05	(GT) <sub>5</sub>	140	130	1
Mang06	(GT) <sub>9</sub> ...(GA) <sub>14</sub>	180	177 179	2
Mang09	(TATC) <sub>6</sub> CATC(TATC) <sub>7</sub> ATC(TATC) <sub>3</sub> ...(TATC) <sub>12</sub>	250	248 252 253 256 257 260	6
Mang14	(CT) <sub>3</sub> GT(CT) <sub>3</sub>	150	147	1
Mang16	(CT) <sub>7</sub>	250	245	1
Mang17	(CA) <sub>6</sub> TG(CA) <sub>5</sub>	170	171	1
Mang21	(GT) <sub>5</sub> CTCT(GT) <sub>3</sub>	150	150	1
Mang23	(CA) <sub>11</sub>	150	154	1
Mang26	(GT) <sub>3</sub> AT(GT) <sub>3</sub> (GATA) <sub>14</sub>	170	NA	NA
Mang27	(GT) <sub>2</sub> GA(GT) <sub>16</sub>	130	127 129	2
Mang31	(GT) <sub>42</sub>	250	NA	NA
Mang33	(CT) <sub>3</sub> T(CT) <sub>6</sub>	300	291	1
Mang34	(GT) <sub>7</sub> GCA(TG) <sub>6</sub> CA(TG) <sub>4</sub>	250	214 216 218	3
Mang35	(CA) <sub>14</sub>	250	263 266	2
Mang36	(CCAT) <sub>3</sub> ...(CCAT) <sub>4</sub> ...(CCAT) <sub>2</sub> ...(CCAT) <sub>5</sub>	350	357 361	2
Mang37	(TC) <sub>4</sub>	140	122	1
Mang38	(GATA) <sub>4</sub> GATTA(GATA) <sub>13</sub>	250	235	1
Mang41	(GATA) <sub>3</sub> ...(GATA) <sub>6</sub> GAT(GATA) <sub>2</sub> GAT(GATA) <sub>3</sub> ... (GATA) <sub>3</sub> ...(GATA) <sub>3</sub> GAT(GATA) <sub>10</sub>	300	294	1
Mang43	(GATA) <sub>2</sub> GAT(GATA) <sub>11</sub>	250	256 261 265	3
Mang44	(GATA) <sub>14</sub> ...(GATA) <sub>2</sub> GAT(GATA) <sub>2</sub>	200	194 202 206	3
Mang48	(GT) <sub>16</sub> (GA) <sub>10</sub>	300	288	1

El promedio de número de alelos por locus, considerando 22 loci fue de  $1.7 \pm 1.2$ . Para el cálculo del promedio de alelos por locus se tomaron en cuenta todos los loci a excepción de los loci Mang26 y Mang31, ya que en estos dos loci no fue posible atribuir alelos.

### Análisis de variación genética

En la Tabla VII se muestran los resultados del análisis de equilibrio de Hardy Weinberg para los nueve loci que presentaron polimorfismo (2 ó más alelos).

Tabla VII. Número de alelos, heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), valor de P y desviación estándar (s.d.) en los loci polimórficos de *M. angustirostris*.

Locus	Núm de alelos	$H_o$	$H_e$	Valor de P	s.d.
Mang01	2	0.545	0.495	0.681	0.000
Mang06	2	0.091	0.089	1.000	0.000
Mang09	6	0.773	0.771	0.724	0.000
Mang27	2	0.273	0.304	0.537	0.001
Mang34	3	0.591	0.559	0.201	0.000
Mang35	2	0.364	0.359	1.000	0.000
Mang36	2	0.273	0.241	1.000	0.000
Mang43	3	0.182	0.173	1.000	0.000
Mang44	3	0.818	0.635	0.107	0.000

El promedio del número de alelos por locus para los loci polimórficos es de  $2.8 \pm 1.3$ .

# DISCUSIÓN

## **Enriquecimiento de microsatélites**

Entre los productos de digestión de la enzima RSA1 se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 500 pb. Posteriormente en el enriquecimiento con sondas biotiniladas los tamaños de los fragmentos obtenidos fueron los ideales (entre 300 y 2000 pb) ya que los fragmentos de aproximadamente 500 pb son más fáciles de secuenciar y se mantiene una alta probabilidad de tener suficiente DNA que flanquee el microsatélite para que los cebadores se puedan diseñar (Glenn y Schable, 2005).

## **Aislamiento de microsatélites**

El éxito global en el aislamiento de microsatélites fue de 55%, esto se encuentra dentro de lo reportado cuando se utilizan genotecas enriquecidas (20-90%) (Zane *et al.*, 2002); específicamente para mamíferos se reporta un éxito entre 25 a 75% (Zane *et al.*, 2002). El valor de éxito que aquí se reporta, es superior al que de manera general se obtiene en trabajos con protocolos tradicionales (0.04-12%) (Zane *et al.*, 2002).

El porcentaje de éxito obtenido (55%) es superior a lo reportado en otros pinnípedos cuando se han usado genotecas tradicionales, y similar o superior cuando se comparan con resultados de genotecas enriquecidas. A partir de genotecas tradicionales, se ha reportado un éxito de 2.7% en el lobo marino de California (Hernández-Velázquez *et al.* 2005) ó 21 clonas positivas en el elefante marino del norte (Garza 1998) contra las 88 que se obtuvieron en este trabajo.

En otros trabajos en donde se aislaron microsatélites en pinnípedos por medio de genotecas enriquecidas, el éxito fue similar o menor a lo que aquí reportamos. Hoffman *et al.* (2008) tuvieron un éxito de 56% con el lobo fino de la Antártica; con el lobo marino de Steller el éxito fue de 1.9% (Huebinger *et al.* 2007); con el lobo marino de California obtuvieron un éxito de 9% (Hernández-Velázquez *et al.* 2005) y en *Z. wolfebaeckii* se aislaron 65 clonas positivas, pero no reportan el total de clonas (Wolf *et al.* 2005).

La mayoría de los microsatélites aislados con base en su motivo de repetición fueron del tipo dinucleótidos (50), algo que no es raro pues son los más abundantes en el genoma (Zane *et al.* 2002). Con base a su pureza, la mayoría fueron puros (39) o puros interrumpidos (41), lo que favorece la búsqueda de marcadores microsatelitales polimórficos, ya que los microsatélites puros se encuentran entre los más polimórficos (Zane *et al.*, 2002).

En algunos casos (4) los microsatélites encontrados no correspondieron a la sonda utilizada, lo que estrictamente se consideró como clona negativa, para esa sonda. Sin embargo, no es poco común que se encuentren por casualidad otros tipos de microsatélites durante el proceso, ya que éstos están distribuidos a lo largo del genoma (Schlötterer y Pemberton 1994).

### **Diseño de los cebadores**

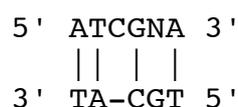
Se diseñaron 48 pares de cebadores a partir de 89 loci de microsatélites (1 clona positiva tuvo 2 loci de microsatélite). Estos resultados ubican a este trabajo en el de mayor éxito en cuanto a la cantidad de cebadores de microsatélites diseñados (48 cebadores) en

pinnípedos, y el segundo en cuanto a la proporción de cebadores por clonas positivas (55%).

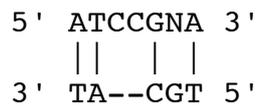
El único trabajo con elefante marino del norte reporta un éxito del 10% en cuanto a la proporción de cebadores diseñados por el número de clonas positivas obtenidas (Garza 1998). En el lobo marino de California el éxito obtenido fue entre el 29 y 36% (Hernandez-Velazquez *et al.* 2005); con el lobo fino de Galápagos se reportó un 42% (Wolf *et al.* 2005); 37% en el lobo marino de Steller (Huebinger *et al.* 2007) y 81% en el lobo fino de la Antártica (Hoffman *et al.* 2008).

Los 48 cebadores diseñados con el programa en línea Primer3 versión. 0.4.0 (Rozen y Skaletsky, 2000) cumplieron con los valores de referencia del programa, a continuación se describen los principales parámetros a considerar para obtener cebadores con altas probabilidades de amplificar:

Máxima complementariedad: Se refiere a la puntuación máxima de alineamiento permisible entre un solo cebador y entre cebadores *forward* y *reverse*. Esta puntuación se utiliza para predecir la tendencia de los cebadores para alinearse el uno al otro sin causar necesariamente dímeros en la PCR. El sistema de puntuación da 1.0 para las bases complementarias, -0.25 para una alineación de cualquier base (o N) con una N, -1.00 por cada no alineamiento, y -2.00 por un vacío. Sólo un par de bases con vacíos están permitidas para la evaluación, por ejemplo, el siguiente alineamiento:



está permitida al presentar sólo un vacío y da un resultado de 1.75, sin embargo el alineamiento:



no es considerado al presentar dos vacíos, y una puntuación de 0 indica que no hay un alineamiento local considerable entre dos cebadores (Rozen y Skaletsky, 2000). El 100% de los cebadores diseñados cumplieron con este valor de referencia.

Máxima complementariedad en 3': Se refiere a la puntuación máxima de alineamiento permisible en el extremo 3' entre un solo cebador y entre cebadores *forward* y *reverse*. Esta puntuación se utiliza para predecir la probabilidad de que se amplifiquen dímeros en la PCR, por ejemplo el alineamiento:



presenta una puntuación de 7.0, los criterios de calificación son los mismos que el de máxima complementariedad. Una puntuación de 0 indica que no hay suficiente alineamiento entre los extremos 3' para formar dímeros (Rozen y Skaletsky, 2000). Un total de 41 cebadores (85%) cumplieron con este valor de referencia.

Tamaño del cebador: Este parámetro se relaciona con la especificidad y la temperatura de reincorporación ( $T_m$ ). Cebadores que tienen entre 18 y 25 pb tienden a ser muy específicos si la temperatura de alineamiento de la PCR es similar a la temperatura de reincorporación de los cebadores (Dieffenbach *et al.* 1993; Sharrocks, 1994). El 78% de los cebadores tienen una longitud mayor de 18 pb.

Porcentaje de G-C (Uniones Guanina-Citosina): La composición de los cebadores es un factor que también influye en la  $T_m$ . Los cebadores deben mantener una proporción de razonable de G-C para tener un alineamiento específico, por lo que se sugiere que el

intervalo de G-C sea de entre 45 y 65% (Dieffenbach *et al.* 1993). Sin embargo se puede aceptar hasta un mínimo de 20% (Rozen y Skaletsky, 2000). El 100% de los cebadores cumple con el 20% mínimo de G-C.

### **Estandarización de cebadores**

La concentración de los cebadores *forward* y *reverse* para la preparación de la mezcla para PCR, se utilizó de manera desequilibrada (*forward* 0.3  $\mu\text{M}$ , *reverse* 0.075  $\mu\text{M}$ ) ya que el cebador *reverse*, al tener la secuencia universal M13(-21) sólo se utiliza durante los primeros 35 ciclos de la PCR; en los posteriores 8 ciclos se utiliza la secuencia universal M13(-21) marcada con fluorescencia para amplificar los productos de PCR (Schuelke, 2000). Sólo en dos loci se utilizó una concentración equilibrada de cebadores (Mang01 y Mang14), ya que no se presentaba producto final de PCR cuando se utilizaba una concentración desequilibrada.

En los cebadores Mang31 y Mang34 se utilizó una concentración de  $\text{MgCl}_2$  de 2 mM y 1.7 mM respectivamente, ya que el producto de amplificación de estos dos loci fue bajo al utilizar 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ . En los cebadores Mang23 y Mang26 se utilizó una concentración de  $\text{MgCl}_2$  de 1.25 mM y 1.2 mM respectivamente ya que el producto de amplificación de estos dos loci fue un poco inespecífico. Experimentalmente, se ha comprobado que una mayor concentración de  $\text{MgCl}_2$  produce una mayor cantidad de producto de amplificación aunque esto podría causar amplificación de productos inespecíficos y una menor concentración de  $\text{MgCl}_2$  produce productos más específicos (Sambrook y Russell, 2001).

Las temperaturas de desnaturalización de los cebadores no deben ser superiores a 85°C, ya que efectuarán una completa separación de las cadenas de DNA durante el ciclo de

desnaturalización, y que la temperatura de alineamiento de los cebadores al DNA templado se encuentre 3-5°C por debajo de la temperatura de desnaturalización de los cebadores. Por lo cual las temperaturas de alineamiento para cada juego de cebadores (52°C-61°C) optimizadas en el presente trabajo, se encuentra dentro de lo recomendado para una óptima amplificación. Temperaturas muy altas causan un mal alineamiento entre cebadores provocando poco DNA amplificado y temperaturas muy bajas causan la amplificación de DNA inespecífico (Sambrook y Russell, 2001).

### **Análisis de genotipos**

En todos los loci, a excepción de Mang26 y Mang31, el patrón de picos en los electroferogramas fue claro y el tamaño de los alelos fué similar a los observado en los geles de agarosa. A continuación se detallan los problemas presentados en los loci Mang26 y Mang31:

Mang26: El electroferograma de las muestras genotipadas muestra un patrón de picos en el cual no es posible asignar alelos (Figura 4). En todas las muestras se presenta una serie de *stutter* de 11 picos (4 grupos de 2 picos y uno de 3) con un tamaño de entre 166 a 185 pb.

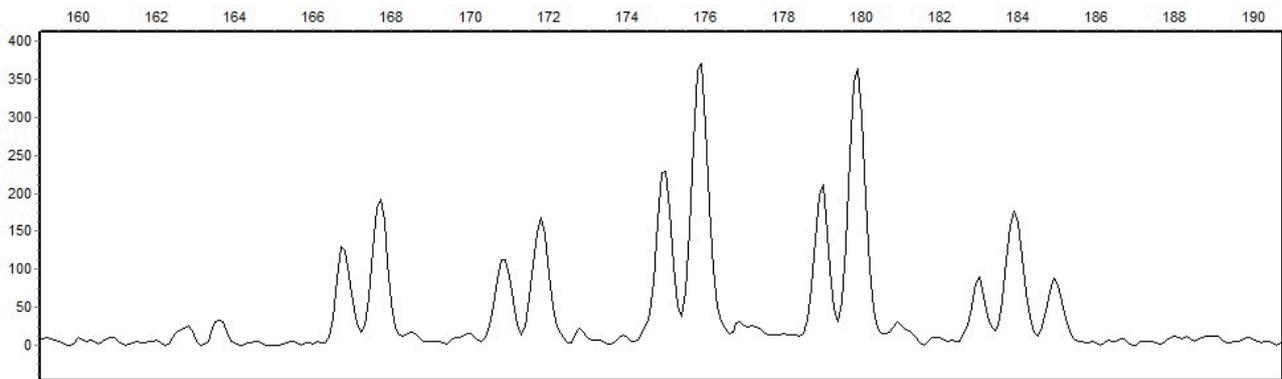


Figura 4. Electroferograma de la muestra A07 0005 del locus Mang26, como ejemplo. Todas las muestras presentaron el mismo patrón.

Al presentar el mismo patrón de picos en todas las muestras del locus Mang26, lo más probable es que se trate de un solo alelo, aunque esto no se puede decir con certeza debido a que las amplitudes relativas de los diferentes picos no siempre son perfectamente iguales. Si se quiere utilizar este locus para futuros estudios poblacionales y de comportamiento, se requeriría mejorar las condiciones de amplificación y ciclos de amplificación más complejos como PCR touchdown para eliminar los picos espurios y obtener mayor especificidad (Don *et al.* 1991).

Mang31: Los resultados del genotipado A038\_P1 revelaron que algunas muestras presentaron un tamaño y patrón de picos diferentes al esperado (250 pb de acuerdo a lo observado en gel de agarosa), aunque en gel no presentaron producto visible, los picos 266 y 296 solo se vieron con electroforesis capilar y en la mayoría de los casos con una intensidad mucho mas baja que las muestras con pico a 250. En la Figura 5 se muestran ejemplos del electroferograma cuando se presentó un tamaño y patrón de picos diferentes al esperado (266 pb y 296 pb) y cuando se presentó el tamaño esperado (250 pb).

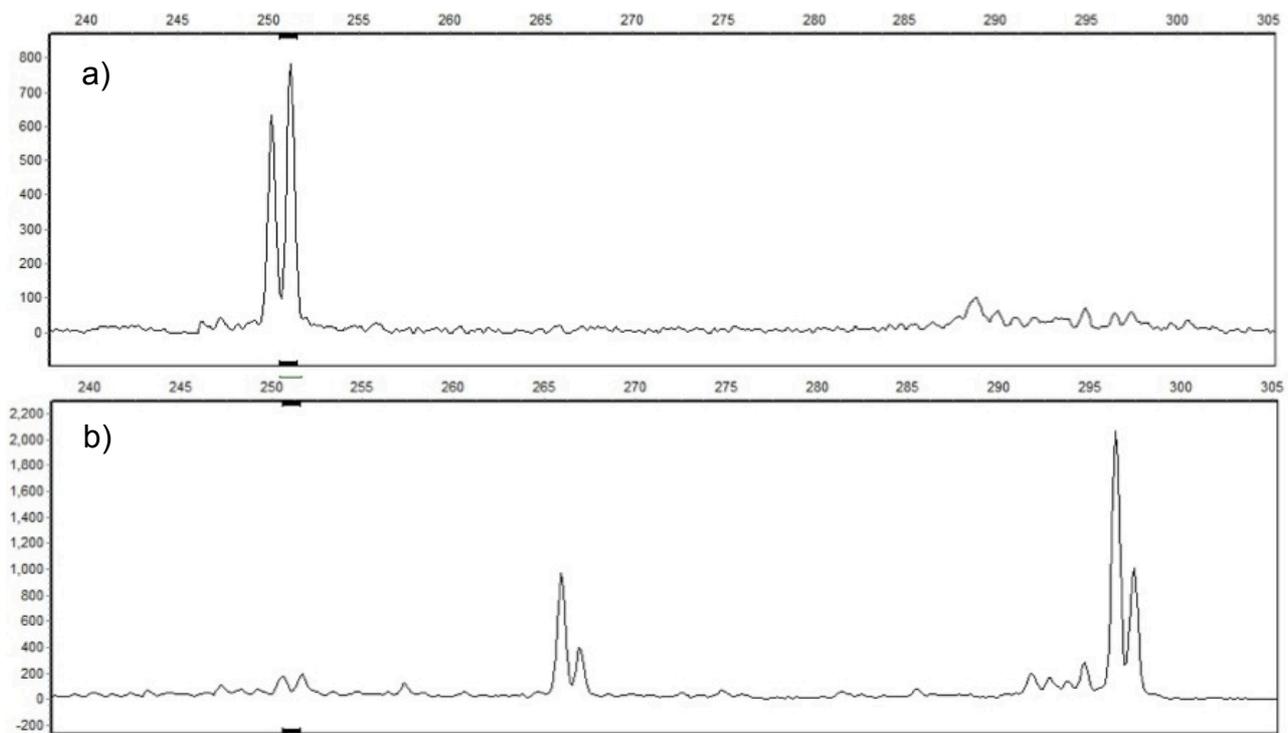


Figura 5. Electroferogramas de dos muestras del locus Mang31 en el genotipado A038\_P1. a) La mayoría de las muestras presentaron el tamaño que se observó en gel, b) Las muestras A07 0005, A07 0008, A07 0542, A07 0549, A07 0559, A07 0574, A07 0575 y A07 0590 presentaron un tamaño y patrón de picos diferente a lo esperado.

Debido a estas inconsistencias, se genotiparon nuevamente todas las muestras (A053\_P1). Las condiciones de amplificación en el envío A053\_P1 se cambiaron ligeramente con una  $T_m$  de  $52^{\circ}\text{C}$  y concentración de  $\text{MgCl}_2$  de 2.25 mM, con el fin de obtener productos mas específicos, mientras que en A038\_P1 se utilizó una  $T_m$  de  $50^{\circ}\text{C}$  y concentración de  $\text{MgCl}_2$  de 2.0 mM. Con estas nuevas condiciones solo se presentó el pico de 250 pb en las muestras que lo presentaron en el anterior genotipado; sin embargo, las muestras que presentaron los picos en 266 y 296 pb en el primer genotipado, no mostraron señal en el segundo. La muestra A07\_0008 fue el único caso en el que se pueden observar los otros dos picos (266 y 296 pb), pero muy bajos de intensidad.

Lo anterior puede explicarse de dos formas distintas. La primera es que los picos 266-296 que aparecen en A038\_P1 son efectivamente alelos, pero con problema de *large allele drop-out*, el cual se presenta cuando hay una amplificación menos eficiente en alelos de mayor tamaño (Wattier *et al.*, 1998). Sin embargo, es raro que la mayoría de las veces el pico 296 se vea más intenso que el 266 (Figura 5), ya que debería ser al contrario en caso de *large allele drop-out* (Wattier *et al.*, 1998). La segunda explicación es que las condiciones de amplificación usadas en A038\_P1 producen picos espurios, que no son alelos, y al cambiar las condiciones de amplificación en el genotipado A053\_P1 estos desaparecen. Lo anterior se podría interpretar como alelos nulos, que en caso de ser homocigotos dan como resultados una no amplificación (Dakin y Avise 2004). Debido a estos problemas de *large allele drop-out* o alelos nulos no es recomendable utilizar este locus para futuros estudios poblacionales o de comportamiento.

El número promedio de alelos por locus para los 22 loci que se genotiparon exitosamente es de 1.7 (máximo 6 alelos). Este valor es mayor al reportado por Garza (1998) en *M. angustirostris*, en donde se obtuvieron 1.46 alelos por locus (máximo 4 alelos), a partir de 24 pares de cebadores diseñados para distintas especies de pinnípedos. Sin embargo, el valor obtenido en el presente trabajo es menor en comparación con Sanvito y Galimberti (com. pers<sup>3</sup>.), en el cual obtuvieron un promedio de 2 alelos por locus (máximo 6 alelos) en *M. angustirostris*, en un total de 64 marcadores tomados de la literatura.

Los niveles de variación de microsatélites reportados en el presente trabajo se encuentran entre los más bajos encontrados en pinnípedos, al igual que la foca monje del Mediterráneo (*Monachus monachus*) y la foca monje de Hawaii (*Monachus*

---

<sup>3</sup> Drs. Simona Sanvito y Filippo Galimberti, Elephant Seal Research Group.

*schauinslandi*). La foca monje del Mediterráneo presenta un promedio de 1.92 alelos por locus (máximo 3 alelos) (Pastor *et al.*, 2004) y la foca monje de Hawaii tiene un promedio de 1.29 (máximo 4 alelos) (Gemmell *et al.*, 1997). Al igual que *M. angustirostris*, *M. monachus* y *M. schauinslandi* han presentado un cuello de botella genético y una caza intensiva (Kenyon y Rice, 1959; Marchessaux, 1989; Aguilar, 1999; Johnson y Lavigne, 1999; Pastor *et al.*, 2004; Schultz *et al.*, 2009); sin embargo el tamaño actual de la población de *M. angustirostris* es de 127 000 individuos (Stewart *et al.*, 1994), el cual es mayor que estas dos especies: 300-400 individuos en *M. monachus* (Forcada *et al.*, 1999) y 1300 individuos en *M. schauinslandi* (Ragen, 1993).

El promedio de número de alelos por locus en los loci polimórficos de *M. angustirostris* es de 2.7, estos valores son similares a los encontrados por Sanvito y Galimberti (com. Pers<sup>3</sup>.) los cuales también fueron de 2.7 alelos por locus. Sin embargo, estos valores son bajos comparados con los obtenidos en el desarrollo de marcadores de microsatélite específicos en otras especies de pinnípedos. Davis *et al.* (2002) reportaron un promedio de 9.7 alelos por locus en la foca de Weddell (*Leptonychotes weddellii*), 6.8 alelos por locus en la foca leopardo (*Hydrurga leptonyx*) y 11.3 alelos por locus en la foca cangrejera (*Lobodon carcinophagus*). En el lobo marino de California, *Zalophus Californianus*, se encontró un promedio de 6 alelos por locus (Hernández-Velázquez *et al.*, 2005), en el lobo marino de Galápagos *Z. wollebaeki*, un promedio de 6.6 alelos por locus (Wolf *et al.*, 2005; Hoffman *et al.*, 2007), en el lobo marino de Steller, *Eumetopias jubatus*, 3.4 alelos por locus (Huebinger *et al.*, 2007) y en el lobo fino de la Antártica, *Arctocephalus gazella*, 6.5 alelos por locus (Hoffman *et al.*, 2008; Hoffman, 2009).

Los niveles bajos de variación de microsatélites a nivel global (1.7 alelos por locus) y a nivel de marcadores polimórficos (2.7 alelos por locus) en *M. angustirostris*, se pueden

atribuir al cuello de botella que sufrió la especie durante el siglo XIX (Bartholomew y Hubbs, 1960; Hoelzel *et al.*, 1993). Análisis con diferentes marcadores moleculares como son las alozimas (Bonnell y Selander, 1974), secuenciación del mtDNA (Hoelzel *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 2000; Abadía, 2005), minisatélites (Hoelzel *et al.*, 1999a) y MHC (Major Histocompatibility Complex) (Hoelzel *et al.*, 1999b; Weber *et al.*, 2004), también han revelado un bajo nivel de variación genética debido a esta reducción de la población.

### **Análisis de variación genética**

El análisis de Hardy Weinberg muestra que los 9 loci polimórficos se encuentran en equilibrio con valores de  $P$  superiores a 0.05; los loci Mang01, Mang09, Mang34 y Mang44 presentaron los valores de heterocigosis más altos. El promedio de heterocigosidad observada y esperada es 0.434 y 0.403 respectivamente, estos valores son similares a los de otra especie con baja diversidad genética, la foca monje del Mediterráneo, la cual presenta promedios de  $H_o=0.422$  y  $H_e=0.4$ . Sin embargo, los promedios de  $H_o$  y  $H_e$  de *M. angustirostris* son inferiores a los de otras especies de pinnípedos,  $H_o=0.453-0.813$ ,  $H_e=0.465-0.814$  (Davis *et al.* 2002; Hoffman *et al.*, 2008; Hoffman 2009; Wolf *et al.*, 2005; Hoffman *et al.* 2007; Huebinger *et al.*, 2007; Hernández-Velázquez *et al.*, 2005).

Cuando no se tiene la suficiente resolución para realizar estudios poblacionales o de comportamiento reproductivo, es necesario incrementar el número de loci utilizados (Parker *et al.*, 1998; Jones y Ardren, 2003). Es por eso, que aunque con niveles de polimorfismo bajos (2.7 alelos por locus, máximo 6) y niveles de heterocigosidad por debajo del promedio de otras especies de pinnípedos, los cebadores microsatelitales diseñados para el *M. angustirostris* contribuirán a incrementar los niveles de resolución

que se requieren para realizar estudios poblacionales en *M. angustirostris* y otras especies de pinnípedos.

## CONCLUSIONES

- El porcentaje de éxito obtenido (55%) es superior a lo reportado en otros pinnípedos cuando se usaron genotecas tradicionales, y similar o superior cuando se comparan con resultados de genotecas enriquecidas.
- La alta proporción de microsatélites fueron del tipo puro (90%), dinucleótidos (56%) y tetranucleótidos (30%). En estos tipos de microsatélite es donde se ha observado más polimorfismo.
- Se diseñaron 48 pares de cebadores en los cuales la mayoría cumple con los valores mínimos de referencia. Estos resultados ubican al presente trabajo en el de mayor éxito en cuanto a la cantidad de cebadores de microsatélites diseñados (48 cebadores) en pinnípedos, y el segundo en cuanto a la proporción de cebadores por clonas positivas (55%).
- Se lograron optimizar las condiciones de amplificación por PCR en 24 pares de cebadores.
- Se genotiparon exitosamente 22 loci de *M. angustirostris* por lo que se recomienda ensayar estos marcadores en otras especies de pinnípedos.
- Se obtuvo un promedio global de 1.7 alelos por locus  $\pm$  1.2 (máximo 6), el cual se encuentra entre los más bajos encontrados en pinnípedos; y un promedio de 2.7

alelos por locus  $\pm 1.3$  en los loci polimórficos; aunque sigue siendo bajo comparado con lo reportado con otras especies de pinnípedos.

- Se obtuvieron 9 loci polimórficos, los cuales se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg con un promedio de  $H_o=0.434$  y  $H_e=0.403$ , aunque son inferiores a los de la mayoría de especies de pinnípedos. Estos marcadores serán útiles en futuros análisis genéticos con *M. angustirostris*.
- Los bajos niveles de polimorfismo y variación genética en *M. angustirostris* con loci específicos de microsatélite, reafirman los resultados obtenidos con alozimas, secuenciación del mtDNA, minisatélites y MHC.
- Los 9 loci polimórficos detectados en *M. angustirostris* por medio de protocolos enriquecidos de aislamiento de microsatélites, contribuirán a incrementar los niveles de resolución que se requieren para realizar estudios poblacionales y de comportamiento.

## PERSPECTIVAS

- Optimizar condiciones de PCR y evaluar polimorfismo en *M. leonina*, *P. vitulina richardsi*, *Z. californianus* y *A. townsendii*.
- Utilizar los loci polimórficos detectados en el presente trabajo, junto con los loci polimórficos de marcadores diseñados en otras especies de pinnípedos que el ESRG ha evaluado, para realizar estudios poblacionales, de comportamiento reproductivo y estructura social en *M. angustirostris*.

## LITERATURA CITADA

- Abadía A. 2006. Variabilidad genética del elefante marino del norte, *Mirounga angustirostris*, en Isla Guadalupe, Islas San Benito e Islas Cedros, México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. 60pp.
- Aguilar A. 1999. Status of Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) populations. En: *RAC-SPA, United Nations Environment Program (UNEP)*. Tunis: Aloe's Editions: 1-60.
- Allen P.J., Amos W., Pomeroy P. P. y Twiss S. D. 1994. Microsatellite variation in grey seals (*Halichoerus grypus*) shows evidence of genetic differentiation between two British breeding colonies. *Molecular Ecology* 4(6): 653-662.
- Allen P. J. 1995. Molecular analysis of grey seal (*Halichoerus grypus*) breeding systems. Tesis de Doctorado. Cambridge University.
- Armour J. A. L., Neumann, R., Gobert, S. y Jefferys, A. J. 1994. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics* 3: 599-606.
- Bartolomew G. A. y Hubbs C. L. 1960. Population growth and seasonal movements of the northern elephant seal, *Mirounga angustirostris*. *J. Mammal* 41: 366-375.
- Bonnell M. L. y Selander R. K. 1974. Elephant Seals: Genetic Variation and Near Extinction. *Science* 184: 908-909.
- Boutin.Ganache I., Raposo M., Raymond M. y Deschepper C. F. 2001. M13-Tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *BioTechniques*: 31(1): 24-28.
- Buchanan F. C., Maiers, L.D., Thue, T.D., De March B.G.E. y Stewart R. E. A. 1998. Microsatellites from the Atlantic walrus *Odobenus rosmarus rosmarus*. *Molecular Ecology* 7: 1083-1084.
- Coltman D. W., Bowen W. D. y Wright J. M. 1996. PCR primers for harbour seal (*Phoca vitulina concolour*) microsatellites amplify polymorphic loci in other pinniped species. *Molecular Ecology* 5: 161-163.
- Dakin E. E. y Avise J. C. 2004. Microsatellite nulle alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504-509.
- Davis C. S., Gelatt T. S., Siniff, D. y Strobeck, A. 2002. Dinucleotide microsatellite markers from the Antarctic seals and their use in other pinnipeds. *Molecular Ecology Notes* 2: 203-208.
- Dieffenbach C. W., Lowe T. M. y Dveksler G. S. 1993. General concepts of PCR primer design. *Genome Research* 3: S30-S37.

- Don R. H., Cox P. T., Wainbright B. J., Baker K. y Mattick J. S. 1991. Toehold PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acid Research*: 19(14): 4008.
- Esquer-Garrigos. Y. S. 2008. Variación y estructura genética en la lagartija de cola rayada *Aspidoscelis hyperythra* (Sauria: Teiidae) mediante en el uso de marcadores microsatélites. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. 117pp.
- Excoffier L. G. Laval, y Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*: 1: 47-50.
- Forcada J., Hammond P. S., y Aguilar A. 1999. Status of the Mediterranean monk seal *Monachus monachus* in the western Sahara and the implications of a mass mortality event. *Marine Ecology Progress Series* 188: 249–261.
- Garza J. C. 1998. Population Genetics of North Elephant Seal. Tesis de Doctorado. University of California. 188pp.
- Gelatt T. S., Davis C. S., Stirling I., Siniff D. B., Strobeck C. y Delisle I. 2009. History and fate of a small isolated population of Weddell seals at White Island, Antarctica. *Conservation Genetics* 11(3): 721-735.
- Gemmell N. J, Allen. P., Goodman S. J. y Reed J. Z. 1997. Interspecific microsatellite markers for the study of pinniped populations. *Molecular Ecology* 6: 661-666.
- Glenn T. C. y Schable N.A. 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology* 395: 202-222.
- Goodman S. J. 1997. Dinucleotide repeat polymorphisms at seven anonymous microsatellite loci cloned from the European Harbour Seal (*Phoca vitulina vitulina*). *Anim. Genet.* 28: 310-311.
- Hernández-Velázquez F. D., Galindo-Sánchez, C. E., Taylor, M. I., J. De La Rosa-Vélez, Cote, I. M., Schramm, Y., Auriolles-Gamboa D. y Rico, C. 2005. New polymorphic microsatellite markers for California sea lions (*Zalophus californianus*). *Molecular Ecology Notes* 5: 140-142.
- Hoelzel A. R., Le Bouef B. J., Reiter J. y Campagna C. 1999a. Alpha-male paternity in elephant seals. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 46: 298-306.
- Hoelzel A. R., Stephens J. C. y O'Brien S. J. 1999b. Molecular Genetic Diversity and Evolution at the MHC DQB Locus in Four Species of Pinnipeds. *Mol. Biol. Evol.* 16(5): 611-618.
- Hoelzel A. R. 1999. Impact of population bottlenecks on genetic variation and the importance of life-history; a case study of the northern elephant seal.
- Hoelzel A. R., Halley J., O'Brien S. J., Campagna C., Ambom T., Le Boeuf B., Rails K. y Dover G. A. 1993. Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks. *Journal of Heredity* 84(6): 443-449.

- Hoelzel A. R., Campagna C. y Arnborn T. 2001. Genetic and morphometric differentiation between island and mainland southern elephant seal populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268(1464): 325-332.
- Hoffman J. I. 2009. A panel of new microsatellite loci for genetic studies of antarctic fur seals and other otariids. *Conservation genetics* 10: 989-992.
- Hoffman J. I., Dasmahapatra K. K. y Nichols H. J. 2008. Permanent Genetic Resources: Ten novel polymorphic dinucleotide microsatellite loci cloned from the Antarctic fur seal *Arctocephalus gazella*. *Molecular Ecology Resources* 8(2): 459-461.
- Hoffman J. I., Steinfartz S. y Wolf J. B. W. 2007. Ten novel dinucleotide microsatellite loci cloned from the Galápagos sea lion (*Zalophus californianus wollebaeki*) are polymorphic in other pinniped species. *Molecular Ecology Notes* 7(1): 103-105.
- Huebinger R. M., Louis E. E., Gelatt T., Rea L. D. y Bickham J. W. 2007. Characterization of eight microsatellite loci in Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). *Molecular Ecology Notes* 7(6): 1097-1099.
- Johnson W. y Lavigne D. M. 1999. The Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) in ancient history and literature. Netherlands Commission for International Nature Protection. 101 pp.
- Jones A. G. y Ardren W. R. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12: 2511-2523.
- Kandpal R. P., Kandpal, G. y Weissman, S. M. 1994. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. *Proc Nat Acad Sci* 91: 88-92.
- Kenyon K. W. y Rice D. W. 1959. Life history of the Hawaiian monk seal. *Pacific Science* 13: 215-252.
- Kijas J. M. H., Fowler, J. C. S., Garbett, C. A. y Thomas, M. R. 1994. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *BioTechniques* 16: 656-662.
- Le Boeuf B. J. y Bonnell M. 1980. Pinnipeds on the California islands: abundance and distribution. En: *Proceedings of multidisciplinary symposium*. (ed). Power D., Santa Barbara, CA: Santa Barbara Museum of Natural History: 475-493.
- Marchessaux D. 1989. Distribution and status of the monk seal population *Monachus monachus* (Hermann, 1779). *Mammalia* 53: 621-642.
- Morin P. A., Mahboubi, P., Wedel, S. y Rogers, J. 1998. Rapid screening and comparison of human microsatellite markers in baboons: allele size is conserved, but allele number is not. *Genomics* 53(12-20).
- O'Brien S. J., M. H. Gail y D. L. Levin. 1980. Correlative genetic variation in natural populations of cats, mice and man. *Nature* 288: 580-583.

- Ostrander E. A., Jong, P. M., Rine, J. y Duyk, G. 1992. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proc Nat Acad Sci* 89: 3419-3423.
- Paetkau D. 1999. Microsatellites obtained using strand extension: An enrichment protocol. *Biotechniques* 26: 690-697.
- Parker P. G., Snow A. A., Schug M. D., Booton G. C. y Fuerst P. A. 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: (2) 361- 382.
- Pastor T., Garza, J. C., Allen P., Amos W. y Aguilar A. 2004. Low genetic variability in the highly endangered Mediterranean monk seal. *Journal of Heredity* 95: (4) 291-300.
- Ragen T. J. 1993. Status of the Hawaiian monk seal in 1992. NOAA-NMFS report H-93-05. Southwest Fisheries Science Center Honolulu Laboratory, Honolulu.
- Rozen S. y Skaletsky H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. (ed. S. Krawetz, y S. Misener) . Humana Press, Totowa, NJ: 365-386.
- Rubinsztein D. C., Amos W., Leggo J., Goodburn, S., Jain, S., Ross C.A., Li S.H., Margolis R.M. y Ferguson-Smith M.A. 1995. Microsatellites are generally longer in humans compared to their homologues in non-human primates: evidence for directional evolution at microsatellite loci. *Nature Genetics* 10: 337-343.
- Sambrook J. Y Russell D. W. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. (ed). Cold Spring Laboratory Press. Cold Spring Harbor (New York): 999.
- Sharrocks A. D. 1994. The design of primers for PCR. En: *PCR Technology, Currents Innovations*. (ed. H. G. Griffin y A. M. Griffin). CRC Press, Inc. U. S. A.: 5-6.
- Schlötterer C. y P. J. 1994. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. *Molecular Ecology and Evolution* 69: 203-214.
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Schultz J. K., Baker J. D., Toonen R. J. Y Bowen B. W. 2009. Extremely Low Genetic Diversity in the Endangered Hawaiian Monk Seal (*Monachus schauinslandi*). *Journal of Heredity* 100(1): 25-33.
- Smith L. M., Sanders J. Z., Kaiser R. J., Hughes P., Dodd C., Connell C. R., Heiner C. Kent S. B. H. y Hood L. E. 1986. Fluorescence detection in automated DNA analysis. *Nature* 321:674-679.
- Stewart B. S., Yochem P. K., Huber H. R., De Long R. L., Jameson R. J., Sydeman W. J., Allen S. G. y Le Boeuf B. J. 1994. History and present status of the northern elephant seal. En: *Elephant seals: Population Ecology, behavior and physiology*. (ed. B. J. Le Boeuf y R. M. Laws). University of CA Press, Berkeley: 29-48.

- Townsend C. H. 1885. An account of recent captures of the California sea elephant, and statistics relating to the present abundance of the species. *Proceedings US Nat. Mus.* 8: 90-93.
- Wattier R., Engel C. R., Saumitou-Laprade P. y Valero M. 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* 7, 1569 –157.
- Weber D. S., Stewart B., Garza J. C. y Lehman N. 2000. An empirical genetic assessment of the severity of the northern elephant seal population bottleneck. *Current Biology* 10: 1287-1290.
- Weber J. L. 1990. Informatives of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics* 7: 524-530.
- Wolf J. B. W., Tautz D., Caccone A. y Steinfartz S. 2005. Development of new microsatellite loci and evaluation of loci from other pinniped species for the Galápagos sea lion (*Zalophus californianus wollebaeki*). *Conservation Genetics* 7(3): 461-465.
- Zane L., Bargelloni L. y Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.

## ANEXOS

### Anexo 1. Muestras de DNA de *M. angustirostris* genotipadas.

<u>Año</u>	<u>Muestra</u>
A07	0005
A07	0007
A07	0008
A07	0542
A07	0543
A07	0546
A07	0549
A07	0559
A07	0560
A07	0561
A07	0562
A07	0565
A07	0566
A07	0571
A07	0573
A07	0574
A07	0575
A07	0580
A07	0590
A07	0592
A07	0593
A07	0594

**Anexo 2.** Paneles de los loci de microsatélite diseñados para su genotipificación. Tamaño en pares de bases (pb).

**Panel 1:**

<b>Loci</b>	<b>pb esperado</b>	<b>Marcador fluorescente</b>	<b>Volumen uL</b>
Mang16	245	HEX	1.1
Mang05	130	HEX	0.8
Mang21	150	NED	0.5
Mang48	288	NED	0.7
Mang36	357-361	FAM	1.5
Mang35	263-266	FAM	2
H <sub>2</sub> O			3.4
Total			10

**Panel 2:**

<b>Loci</b>	<b>pb esperado</b>	<b>Marcador fluorescente</b>	<b>Volumen uL</b>
Mang04	123	HEX	1.1
Mang34	214-218	HEX	3
Mang06	179	NED	1
Mang31	250	NED	1.1
Mang03	165	FAM	1.2
Mang01	230-234	FAM	2.2
H <sub>2</sub> O			0.4
Total			10

**Panel 3:**

<b>Loci</b>	<b>pb esperado</b>	<b>Marcador fluorescente</b>	<b>Volumen uL</b>
Mang14	147-150	HEX	1.8
Mang09	253-257	HEX	2.2
Mang17	171	NED	0.7
Mang41	290	NED	1.1
Mang27	127-129	FAM	1.3
Mang44	187	FAM	1.2
H <sub>2</sub> O			1.7
Total			10

**Panel 4:**

<b>Loci</b>	<b>pb esperado</b>	<b>Marcador fluorescente</b>	<b>Volumen uL</b>
Mang23	154	HEX	1.2
Mang38	235	HEX	1.4
Mang26	162	NED	0.7
Mang33	290	NED	1
Mang37	122	FAM	2.3
Mang43	256-260	FAM	0.9
H <sub>2</sub> O			2.5
Total			10

**Anexo 3.** Características de los 48 cebadores diseñados que cumplen con los valores de referencia, obtenidos a partir del programa de cómputo Primer3 v0.4.0. Máxima complementariedad (MC), Máxima complementariedad en 3' (MC-3'). Al cebador reverse se le agregó la secuencia universal M13(-21) (5' TGTAACGACGGCCAGT 3').

Cebador	Secuencia	MC	MC-3'	Tamaño (pb)	Tm (°C)	GC (%)
<b>Mang01</b>	F: GCCTTTGGTTAGGTATCCAG	6	4	20	56	50
	R: CACTCTTGAATACTGTAGCCTTG	5	1	23	56	43
<b>Mang02</b>	F: CCATATTATGTGTCGTTTCAGG	7	0	21	56	43
	R: CTCCTCATACTCTCACAGCAC	3	1	21	55	52
<b>Mang03</b>	F: GTGGAAAGAGCCAAGATG	3	1	18	54	50
	R: CTCAGCATAGTATCCTCTAGTTCC	7	0	24	56	46
<b>Mang04</b>	F: GAGCTCTAGGTTATGATTTG	6	0	20	49	40
	R: CTGCTGCTCTACCAGC	6	6	16	51	63
<b>Mang05</b>	F: GTTGTGCTGAGGACTGATG	5	2	19	55	53
	R: GAGATGAGCCTTAAAGAATGG	5	0	21	56	43
<b>Mang06</b>	F: CTATCACGGAGATGGGTG	5	2	18	56	56
	R: CTCAGGAAACCTTCATTGC	3	2	19	56	47
<b>Mang07</b>	F: GCCATCAGAAAAGCAGAC	3	1	18	54	50
	R: CGTCCTCATCTTCCCTTC	2	0	18	56	56
<b>Mang08</b>	F: CTTAACCAACTGAGCCACTC	4	3	20	55	50
	R: CCTGCTTCTCCCTCTGC	2	2	17	57	65
<b>Mang09</b>	F: GGAAGGAGGTGCTATTACTCTC	4	4	22	56	50
	R: CTCATCTCTTGAGGCATCC	4	2	19	56	53
<b>Mang10</b>	F: CTAACCTATTTCTAGGACTTCCCTTC	5	0	26	57	38
	R: CAACACTTCAGTTGCTGATATG	5	5	22	56	41
<b>Mang11</b>	F: GCTCATAAGTGTGTAAGGG	5	4	21	55	48
	R: GTTATTCTTGTGTAAGGTCTCC	3	1	23	54	39
<b>Mang12</b>	F: CACTTTACCTGCTCTGTAGC	3	3	20	53	50
	R: CATGAAAGTAACCTAAGTATCCATTG	4	3	26	58	35
<b>Mang13</b>	F: GAAGGGAAAGAAGCATGTTC	6	6	20	56	45
	R: GACCCAGAGTAGTCACATCAC	4	2	21	54	52
<b>Mang14</b>	F: GAGCCTCCTCTGTAATGG	5	0	18	53	56
	R: GATTCGTGACCAGAAAATC	4	2	19	53	42
<b>Mang15</b>	F: GAATTAGATGCTTCACATCATG	5	5	22	55	36
	R: GTATTAACCTTCCACCTTAGGG	5	4	22	56	45
<b>Mang16</b>	F: CAGAACATCAAACCAAGTGAG	3	0	21	56	43
	R: GGTTTCAGTGTCTGCCTTC	3	0	18	54	56
<b>Mang17</b>	F: GAGTGTACCCTTCCTCG	5	2	18	57	61
	R: GCAAAATGCTGTGTATGAGC	4	2	20	57	43
<b>Mang18</b>	F: GCCAGGATCTACCAAGC	4	2	17	54	59
	R: CTCATCACTACTAGCCCTGC	5	2	20	55	55

<b>Mang19</b>	F: GGAGACCCATAGTAGTAGGCAC	4	2	22	57	55
	R: CATGTGAATTACATCTCAATAAAGC	8	2	25	57	32
<b>Mang20</b>	F: CTATGGTGTGCTGATTCTTGG	3	0	21	58	48
	R: CAACATTCGATGCTGACG	6	2	18	57	50
<b>Mang21</b>	F: GATAACTTCTGGGGTGGG	3	0	18	55	56
	R: GCTGAGAAAAATACTGTAAGATTC	5	3	25	55	32
<b>Mang22</b>	F: GGTTCTCCATGTCTCCTACC	4	0	20	56	55
	R: CTCAAGGCTCCTGTTTCAC	4	1	19	56	53
<b>Mang23</b>	F: CAGTGACTTCCCCCTCC	5	0	17	55	65
	R: GATCACAGGACAGCCTTCAG	4	2	20	58	55
<b>Mang24</b>	F: CATTGGGCACTTGGTCTTC	3	0	20	58	45
	R: CTGGAGGATAGATATTGCC	4	2	20	56	50
<b>Mang25</b>	F: CATCCGTGCCGTCC	2	0	14	55	71
	R: GTGACCATCACAAATCAAG	5	0	19	52	42
<b>Mang26</b>	F: GACTTCCATCCCTCCCC	2	0	17	58	65
	R: GCATACAGGGCACCGC	2	2	16	60	69
<b>Mang27</b>	F: GGAAATGGTATTGTAGTTATGTAGG	3	0	25	55	36
	R: CTCCCCCTTCTGCATC	4	0	16	55	63
<b>Mang28</b>	F: CGTCTTTCAACGAACA ACTTC	5	2	21	58	43
	R: GTA ACTCCTTCTCAACTCCCTC	3	0	22	56	50
<b>Mang29</b>	F: CAGGGCACTTTCTTATTC	4	0	19	55	47
	R: GCATCATAACCATTCCCC	3	0	18	56	50
<b>Mang30</b>	F: AAAGTATTAGCATTCTCCAAAA	4	1	23	54	26
	R: CTCCCTGCTTCCTTTCTCC	2	0	19	59	57
<b>Mang31</b>	F: CTGAAGGGAAAGAAGCAT	2	2	18	56	44
	R: GAAATAAATACACAGGAGACA	2	0	21	49	33
<b>Mang32</b>	F: GATTCCTCATT TTTTATGGC	3	2	20	54	35
	R: CCCAGCACCCAGAGAT	2	2	16	55	63
<b>Mang33</b>	F: CCTGGGTGGCTCTTGATT	3	1	18	59	56
	R: TGACACATTACAAAATACTCCA	3	0	22	53	32
<b>Mang34</b>	F: GCTGATGGACTGGCATT TTA	3	2	20	59	45
	R: GTGCTCGCCTCCTCTCCT	2	0	18	61	67
<b>Mang35</b>	F: ATTGGTTTCTTGATTATGC	3	2	19	50	32
	R: ATGCCCGTATCTATTCT	2	0	18	52	44
<b>Mang36</b>	F: GGGGACACAAGCACAAC	2	0	17	56	59
	R: CTCAAAGGATGGATAGATAAGC	2	2	22	55	41
<b>Mang37</b>	F: GAGCCCCGCATCAGG	2	2	15	60	73
	R: TTTATTTATTTAGAGAGTGTTCGTG	2	0	25	54	28
<b>Mang38</b>	F: GGGGACAGCACAAGGAAG	2	0	18	59	61
	R: GAAGGAATGGGGAAGCCTA	3	2	19	59	53
<b>Mang39</b>	F: TATGGTGTCCGGTGTGTATG	2	0	19	53	47
	R: CTGTGCTTGTGAGAGGAAGAA	3	0	21	58	47
<b>Mang40</b>	F: GCACCCCTATGTTCA	2	2	15	48	53
	R: ATTCGCCCTTGTTTA	2	2	15	47	40
<b>Mang41</b>	F: GCCTTTCTTTCTTTCC	2	0	17	52	47
	R: GTCTCCATAACTGCCTGA	2	1	18	52	50
<b>Mang42</b>	F: GACTTCCCTTCTGTA ACTAA	3	1	20	49	40
	R: CCTCCCCAACACTT	2	1	15	52	60

<b>Mang43</b>	F: ACAGGATAGGGAATGGTGA	2	1	19	55	47
	R: GGGGAAAGAGGATTGTTC	3	1	18	54	50
<b>Mang44</b>	F: CATCTTACCCAGGAGACAG	3	1	19	53	53
	R: GAGACAAGGGATAGGTCA	3	1	18	50	50
<b>Mang45</b>	F: GTGTGCCTGCTTGGGA	2	0	16	58	62
	R: GATAAATGGATGGATGGATG	2	0	20	55	40
<b>Mang46</b>	F: TTTCTAGGACTTCCCTTCTGT	4	0	21	55	43
	R: ATCCCTCCCCAACAACACT	2	1	17	58	59
<b>Mang47</b>	F: CTTGGTTTCCGTGCTT	2	0	16	53	50
	R: ATTCGCCCTTGTTTA	2	2	15	47	40
<b>Mang48</b>	F: AGCCTGTAGCCCTTGT	3	0	16	51	57
	R: GCACCCTTCTGTGTGAG	3	0	17	53	59

---