



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

**Identificación de marcadores tipo microsatélites
en *Limulus polyphemus*, mediante técnicas de
secuenciación de nueva generación**

TESIS

Que presenta:

José Francisco Jiménez Sosa

Como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Producción Pecuaria Tropical

Director de tesis

Dr. Roberto Zamora Bustillos

Conkal, Yucatán, México
Noviembre, 2018



TecNM

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL, YUCATÁN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Conkal, Yucatán, México, Noviembre 2018

El comité de tesis del candidato a grado: **José Francisco Jiménez Sosa**, constituido por los CC. **Dr. Roberto Zamora Bustillos**, **Dr. Juan José Sandoval Gío**, **Dr. Rubén Humberto Andueza Noh** y **M.C. Jorge Ricardo Ortíz Ortíz**, habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: “**Identificación de marcadores tipo microsátélites en *Limulus polyphemus* mediante técnicas de secuenciación de nueva generación**”, que presenta como requisito parcial para obtener el grado de **Maestro en Ciencias el Producción Pecuaria Tropical**, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

ATENTAMENTE



Dr. Roberto Zamora Bustillos
Director de Tesis



Dr. Juan José Sandoval Gío
Co-director de Tesis



Dr. Rubén Humberto Andueza Noh
Asesor de Tesis



M.C. Jorge Ricardo Ortíz Ortíz
Asesor de Tesis

Conkal, Yucatán, México, Noviembre 2018

DECLARATORIA DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de materiales y métodos, resultados y discusión de este documento, es producto del trabajo de investigación realizado durante mi estudio de posgrado y con base en los términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Conkal. En virtud de lo manifestado reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de lo correspondiente a dicha información son propiedad de la citada institución educativa.

Conkal, Yucatán, México, Noviembre 2018



Ing. José Francisco Jiménez Sosa

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico de Conkal por la oportunidad y apoyo brindado en mi formación académica en el programa de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada y el por financiamiento a través del proyecto de CONACYT PDCPN 2015-1097.

A mi comité de tesis, Dr. Roberto Zamora Bustillos, Dr. Juan José Sandoval Gío, Dr. Rubén Humberto Andueza Noh y M.C. Jorge Ricardo Ortiz Ortiz por su valiosa asesoría en la realización de este trabajo.

A Dr. Mario Alberto Martínez Núñez y Dr. Daniel Cerqueda García por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A los profesores de la Maestría en Ciencias de Producción Pecuaria Tropical por sus enseñanzas, apoyo y amistad.

A todas las personas que durante el trabajo de investigación, me ayudaron en todos los aspectos de su elaboración y de quienes también recibí palabras de aliento y apoyo.

DEDICATORIA

A **Dios** por darme la vida, y la oportunidad de seguir realizando las metas y los sueños que me he propuesto y permitirme concluir mis estudios de posgrado.

A mis padres **José Jiménez De la Cruz** y **María Elena Sosa Pérez** por ser mi ejemplo a seguir, mi mayor admiración, por darme el apoyo, el cariño y la oportunidad de crecer y desarrollarme como persona, gracias por cada llamada de atención, cada consejo, cada palabra de ánimo y por enseñarme a valorar lo que tengo, son mi regalo de Dios.

A mi hermano **Juan Antonio Jiménez Sosa**, de quién siempre he tenido un gran apoyo incondicional, con quien siempre he compartido grandes momentos de mi vida, y en quien siempre he encontrado cariño y alegrías. Dios te bendiga siempre hermano.

A mi tía **Luz María Jiménez De la Cruz**, por ser parte muy importante en mi vida, a quien admiro y respeto profundamente, gracias por brindarme su cariño, su apoyo incondicional. Dios le bendiga siempre.

A mi novia **Mayra Cristina Keb Baas**, que con su valor y entrega ha sido una persona incondicional en mi vida, ha sido mi soporte, mi inspiración, mi apoyo, mi luz, mi todo para seguir adelante y no bajar los brazos en los momentos difíciles, sobre todo por amar a Dios, por ser la mujer que Dios me presentó en la vida para ser muy feliz y por su innegable dedicación, amor y paciencia.

A mis amigos de toda la vida, **José Rufino** y **Héctor** que siempre me han brindado esa gran amistad que ha perdurado por años. Dios les bendiga siempre amigos.

A los hermanos de la misión de **SIÓN** por brindarme su amistad, por ser personas de Dios.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 ANTECEDENTES.....	3
1.2.1 Marcadores Moleculares.....	3
1.2.2 Secuencias de ADN repetitivo.....	7
1.2.3 Microsatélites.....	7
1.2.4 Mutación, alelos nulos y homoplasia en los microsatelites.....	13
1.2.5 Descripción y biología de la especie del cangrejo herradura (<i>Limulus polyphemus</i>).....	16
1.2.6 Factores antropogénicos que influyen en la población de <i>Limulus polyphemus</i> ...	21
1.2.7 Dinámica poblacional en <i>L. polyphemus</i>	22
1.2.8 Desarrollo de marcadores de microsatélites en la familia Merostomata.....	22
1.3 Hipótesis.....	24
1.4 Objetivos.....	24
1.4.1 Objetivo general.....	24
1.4.2 Objetivos específicos.....	24
1.5 Procedimiento experimental.....	25
1.5.1 Diagrama experimental.....	25
1.6 Literatura citada.....	26
CAPITULO II. Aislamiento de marcadores microsatélites de <i>Limulus polyphemus</i>, mediante secuenciación de segunda generación.....	31
2.1 RESUMEN.....	31
2.2 ABSTRACT.....	32
2.3 Introducción.....	33
2.4 Materiales y Métodos.....	34
2.4.1 Trabajo de campo.....	34
2.4.2 Trabajo en laboratorio.....	34
2.4.3 Construcción de biblioteca de ADN.....	35
2.4.4 Secuenciación.....	35
2.4.5 Análisis bioinformático.....	35
2.5 Resultados y Discusión.....	39

2.6 Conclusión	42
2.6 Recomendaciones	43
2.7 Literatura citada	44
2.8 Anexos	49
2.8.1. Anexo 1. EXTRACCION DE ADN CON EL KITt Quick-gDNA	49

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Distribución de <i>Limulus polyphemus</i> en la península de Yucatán	17
Figura 2	Anatomía de <i>Limulus polyphemus</i>	18
Figura 3	Ciclo de vida de <i>Limulus polyphemus</i>	19
Figura 4	Muestra de ADN de <i>Limulus polyphemus</i> en gel de agarosa observada en el fotodocumentador	34
Figura 5	Comandos utilizados para la filtración de lecturas en el servidor Cinvestav-Mérida	36
Figura 6	Comparación de <i>Limulus polyphemus</i> moderno y pariente extinto de 148 millones años (<i>Limulus darwini</i>)	40
Figura 7	Amplificación de primers en gel de agarosa (resultado de PCR)	41

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Características de los diferentes tipos de marcadores moleculares	4
Tabla 2	Tipo de microsatélites	11
Tabla 3	Identificación de oligonucleótidos	37
Tabla 4	Las condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los microsatélites de <i>L. polyphemus</i>	38
Tabla 5	Identificación <i>in Sillico</i> de tri y tetranucleotidos	39

RESUMEN

En los últimos años, gracias al avance vertiginoso de las técnicas moleculares, se han desarrollado múltiples marcadores para evaluar la variación genética de las especies (Herrera-Paz, 2012). El estudio de las secuencias microsatelitales es de mucha utilidad, pues son una de las más variables dentro del genoma (González, 2003). Se caracterizan por una alta heterocigocidad y la presencia de múltiples alelos que han contribuido, junto con su codominancia, a convertirlo en el marcador molecular de preferencia en la actualidad (James-Pirri, 2010; Sunnucks, 2000). El objetivo del trabajo es Identificar marcadores tipo microsátélites de *novo* para *Limulus polyphemus* para su aplicación en genética de poblaciones mediante técnica de secuenciación masiva. Se realizó la recolección de hemolinfa, se extrajo el ADN de las mismas para secuenciar mediante técnicas de segunda generación y se hizo el análisis in silico, finalmente se seleccionaron tetranucleótidos de 4, 5 y 6 repeticiones. Una vez obtenidas las secuencias se diseñaron 15 pares de cebadores con el programa Primers3, posteriormente se validaron en 20 individuos de una población de Río Lagartos. De los 15 cebadores diseñados, solo 4 amplificaron en la talla correcta, el 3210, 9181, 4241 y 4981.

Palabras clave: Marcadores moleculares, microsátélites, *Limulus polyphemus*, secuenciación masiva.

ABSTRACT

In recent years, thanks to the vertiginous advance of molecular techniques, multiple markers have been developed to evaluate the genetic variation of the species (Herrera-Paz, 2012). The study of microsatellite sequences is very useful, since they are one of the most variable within the genome (González, 2003). They are characterized by high heterozygosity and the presence of multiple alleles that have contributed, together with their codominance, to make it the molecular marker of preference at present (James-Pirri, 2010, Sunnucks, 2000). The objective of the work is to identify de novo microsatellite markers for *Limulus polyphemus* for its application in population genetics by means of massive sequencing technique. The hemolymph was collected, the DNA was extracted from them to be sequenced by second generation techniques, and the analysis was made in a sillic, finally, tetranucleotides of 4, 5 and 6 repetitions were selected. Once the sequences were obtained, 15 pairs of primers were designed with the Primers3 program, later validated in 20 individuals from a population of Río Lagartos. Of the 15 designed primers, only 4 amplified in the correct size, 3210, 9181, 4241 and 4981.

Key words: Molecular markers, microsatellites, *Limulus polyphemus*, massive sequencing

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 INTRODUCCIÓN

Los microsatélites son la clase más pequeña de elementos repetitivos dentro de los genomas (Morgante y Olivieri, 1999; Chambers y MacAvoy, 2000) y son conocidos como Repeticiones Cortas en Tandem (Short Tandem Repeats, STR), Secuencias Simples Repetidas (Simple Sequence Repeats, SSR) o Polimorfismos de Longitud de Secuencias Simples (Simple Sequence Length Polymorphism, SSLP). Puede decirse que son repeticiones de motivo simple, con unidades de entre 1 y 6 pares de bases, de longitud no mayor a 1 Kb (Chambers y MacAvoy, 2000).

Las aplicaciones de los microsatélites son muy variadas. Permiten realizar estudios filogeográficos, estimar flujo génico o establecer los niveles de subdivisión genética de las poblaciones naturales (Sunnucks, 2000). También han tenido especial auge en la genética de la conservación debido a su facilidad para ser desarrollados en nuevas especies y por la poca cantidad de material genético que se requiere para el análisis (Cheng y Crittenden, 1994). Además, es posible analizarlos a partir de muestras colectadas por métodos no invasivos, como pelo y fecas (Mayr *et al*, 1997; Cheng y Crittenden, 2001). Son herramientas apropiadas en la estimación de relaciones genéticas (distancias genéticas) entre diferentes poblaciones (análisis poblacionales, estudios de diversidad e identificación varietal), en genética forense, pruebas de paternidad (la posibilidad de poder detectar ambos alelos los hace muy útiles para identificaciones individuales en humanos), construcción de mapas genéticos y estudios de asociación (Toth *et al*, 2000).

El estudio de las secuencias microsatelitales es de mucha utilidad, pues son una de las más variables dentro del genoma (González, 2003). Se caracterizan por una alta heterocigocidad y la presencia de múltiples alelos que han contribuido, junto con su

codominancia, a convertirlo en el marcador molecular de preferencia en la actualidad (Goldstein y Schlotterer, 1999; Sunnucks, 2000; González, 2003). El polimorfismo de los microsatélites se origina por cambios en el número de repeticiones, causadas por el deslizamiento de la ADN polimerasa durante la replicación, donde la mutación más común es el aumento o disminución en una sola unidad de iteración (Schlötterer, 1998; Zane *et al*, 2002). El estado alélico del microsatélite es evaluado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que usa partidores que flanquean la repetición. El tamaño de los productos se determina en geles de alta resolución, permitiendo identificar el número de repeticiones de los distintos alelos (Schlötterer, 1998; Zink, 2010). Con base en lo mencionado anteriormente, el objetivo del presente estudio Identificar marcadores tipo microsatélites de *novo* para *Limulus polyphemus* para su posterior aplicación en genética de poblaciones.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 Marcadores Moleculares

En los últimos años, debido al avance vertiginoso de las técnicas moleculares, se han desarrollado múltiples marcadores para evaluar la variación genética de las especies (Zink, 2010). Estas herramientas integran lo que hoy se conoce como marcadores moleculares y se definen como un conjunto de técnicas que permiten visualizar o indicar la presencia de variantes alélicas, producto de algún tipo de mutación establecida en las poblaciones a través del tiempo evolutivo (Zane *et al*, 2008).

Dentro de los marcadores moleculares se pueden distinguir dos tipos de variación, la neutral y la adaptativa (Godoy, 2009). Un marcador molecular neutral es un sitio en el que aparece algún tipo de variación neutral del ADN, en donde la variación, es aquella que no está asociada a ningún factor de selección medible (Yuasa y Umetsu, 2005), a esta variación neutral se le denomina polimorfismo (Mayr, 1997). Originalmente el polimorfismo se definió como “polifases genéticas” que dependen de dos o más alelos (Sunnucks, 2000). Actualmente, el termino se refiere primordialmente a dos o más clases genéticas diferentes en una misma población (Sunnucks, 2000).

En la actualidad los marcadores moleculares más utilizados son los derivados directamente del ADN, tales como los RFLP's (*Restriction fragment length polymorphic*), AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), SNP (*Single nucleotide polymorphism*), EST (*Expressed sequence tags*) y los Microsatélites SSR (*Simple sequence repeats*) (Schlotterer, 1998). Cada uno de estos marcadores presenta ventajas e inconvenientes, pero en los últimos años el uso de los microsatélites se ha hecho muy popular al demostrar su utilidad para resolver muchos aspectos de genética de poblaciones (González, 2003).

1.2.1.1 Características de Marcadores moleculares

Un buen marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad, entre ellas, debe tener una buena distribución a lo largo del genoma y un alto grado de polimorfismo (Cheng y Crittenden, 2001). Además de tener la capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples. Aunado a esto las técnicas para analizar los marcadores deberán ser rápidas, prácticas y reproducibles en otros laboratorios (Chambers y MacAvoy, 2000).

Tabla 1. Características de los diferentes tipos de marcadores moleculares (Godoy, 2009)

Tipo	Variabilidad	Herencia	Genoma	Reproducibilidad	Costo
RFLP	Media	Dominantes	Completo	Alta	Medio
PCR-RFLP	Media	Dominantes	Parcial	Alta	Medio
AFLP	Alta	Dominante	Completo	Media	Medio
Microsatélites	Alta	Codominante	Parcial	Alta	Medio
SNP	Muy alta	Codominante	Parcial	Alta	Alto
Citocromo Oxidasa I	Alta	Materna	Completo	Alta	Medio
EST	Media	Codominante/ Dominante	Parcial	Alta	Alto

1.2.1.2 Ventajas de los marcadores moleculares

Zink, (1998) mencionan que las principales ventajas de los marcadores moleculares son:

- El nivel de polimorfismo generalmente alto para cada *locus* estudiado facilitando la construcción de mapas genéticos. Esto, a diferencia del limitado polimorfismo que presentan los marcadores morfológicos.
- En general son neutrales con relación a los efectos fenotípicos, con efecto epistático o pleiotrópico mínimo o nulo.
- En su mayoría son codominantes y contienen mayor cantidad de información genética por *locus* que los marcadores morfológicos, los cuales en su mayoría son dominantes o recesivos.
- Pueden utilizarse en cualquier fase de desarrollo del organismo.

1.2.1.3 Métodos de detección y aplicación de los marcadores moleculares

Hoy en día existen diferentes técnicas disponibles para medir la variación en el ADN (Zane *et al*, 2002). La mayoría de los marcadores moleculares se incorporan en alguna de las siguientes tres categorías de técnicas, las cuales están basadas en la hibridación o en la reacción de PCR "Polymerase chain reaction" (Yuasa y Umetsu, 2005):

- Técnicas basadas en la hibridación: Incluye principalmente los RFLP's donde las sondas marcadas hibridan con ADN fragmentado e inmovilizado en una membrana mediante el uso de endonucleasas.
- Técnicas basadas en PCR que usan *primers* arbitrarios o amplifican multilocus .
- Tienen la característica de no necesitar mayor información de la secuencia del genoma que se está investigando. Se pueden mencionar los RAPD's

en el cual los *primers* son escogidos arbitrariamente. En los AFLP's, el ADN se digiere con dos enzimas de restricción, los adaptadores son ligados y los *primers* están formados por una parte común comprendida entre el adaptador y el sitio de restricción, y una parte única correspondiente a las bases selectivas.

- Técnicas basadas en PCR de secuencia específica: En las cuales un requisito necesario es el conocimiento de la secuencia de las zonas flanqueantes para la obtención de *primers*. Dentro de esta categoría cabe mencionar a los CAPS (*Cleaved amplified polymorphic sequence*), donde el polimorfismo se debe a los sitios de restricción en la región amplificada, a los microsatélites, si los *primers* han sido diseñados de las regiones flanqueantes y algunas secuencias específicas de genes mitocondriales.

Según Toth *et al.* (2000) actualmente las principales aplicaciones de los marcadores moleculares son:

1. Identificación de individuos y relaciones de parentesco.
2. Evaluación del polimorfismo genético y estudios poblacionales.
3. Mapas genéticos.
4. Estudios evolutivos.
5. Estudios filogeográficos.
6. Análisis de diversidad genética.
7. Reconstrucciones filogenéticas.

1.2.2 Secuencias de ADN repetitivo

Las secuencias de ADN repetido en *tandem* son un componente común de los genomas eucariontes, estas repeticiones son denominadas satélite debido a que los fragmentos de ADN que contienen repeticiones en *tandem* forman bandas satélite cuando el ADN genómico es fraccionado mediante centrifugación por gradiente de densidad (Sunnucks, 2000).

Este tipo de ADN se clasifica de acuerdo al número de nucleótidos que conforman las repeticiones en *tandem*, dividiéndose en minisatélites (secuencias de 6 a 25 nucleótidos y 20 kb) y en microsatélites (secuencias de 1 a 6 nucleótidos y de 20 a 30kb; Benson, 1999).

Un solo genoma puede contener varios tipos de ADN satelital, cada uno con diferente unidad de repetición, aunque algunas regiones satélites están dispersas por todo el genoma, la mayoría son componentes constitutivos de la heterocromatina, en las regiones centroméricas y teloméricas de los cromosomas (Allendorf *et al.*, 1997) y no de manera azarosa a lo largo de los genomas, presumiblemente por sus efectos sobre la organización de la cromatina, regulación de la actividad génica, recombinación, replicación y ciclo celular (Chambers y MacAvoy, 2000).

1.2.3 Microsatélites

Los microsatélites (SSR's) son regiones de secuencias cortas de ADN, de 1 a 6 nucleótidos, repetidos en *tandem* un cierto número de veces (Sunnucks, 2000) y se encuentran esparcidos por todo el genoma de los organismos eucariotas (Tautz, 1989) y procariotas (Zane *et al.*, 2002).

Cuando estas regiones se amplifican de forma individual por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando un par de oligonucleótidos flanqueantes

como *primers*, muestran casi invariablemente polimorfismos debido a las diferencias en su longitud (Morgante y Olivieri, 1999). Las unidades de repetición son las entidades más pequeñas de un microsatélite y se clasifican en mono, di, tri, tetra, penta y hexanucleotídicos según el número de bases que la componen (Goldstein y Schlötterer, 1999; Tóth et al., 2000). De acuerdo a la estructura de su repetición, un microsatélite es perfecto cuando consiste en un sólo motivo repetido y que no está interrumpido por bases que no pertenezcan al patrón de repetición, en cuanto a un microsatélite imperfecto es aquel en que una o más repeticiones poseen una base que no se ajusta a su estructura (Goldstein y Schlötterer, 1999), mientras que los microsatélites interrumpidos tienen un pequeño número de bases distintas insertas en la repetición. Finalmente, un microsatélite se denomina “compuesto” cuando hay dos o más microsatélites adyacentes (Goldstein y Schlötterer, 1999).

El origen de tal polimorfismo está aún en debate, aunque previsiblemente este se deba al evento de “resbalon” o “*slipagge*” durante la replicación del ADN (Toth et al., 2000), en el cual ya sea la cadena nueva o la cadena patrón se desliza sobre la otra en al menos un motivo, resultando en un mal apareamiento de las mismas, provocando varios tipos de mutaciones, como las deleciones e inserciones, ya sea en el microsatélite en sí o en las regiones que lo flanquean alterando el tamaño de la región microsatélite (Goldstein y Scholotterer, 1999).

Por otro lado, existe también una gran variabilidad en la cantidad de secuencias de microsatélites en los genomas de diferentes especies en términos de frecuencia, longitud y tipo de repetición (Tóth et al., 2000; Neff y Gross, 2001).

Las aplicaciones de los microsatélites son muy variadas. Permiten realizar estudios filogeográficos, estimar flujo génico o establecer los niveles de subdivisión genética de las poblaciones naturales (Sunnucks, 2000). También han tenido especial auge en la genética de la conservación debido a su facilidad para ser desarrollados en nuevas especies y por la poca cantidad de material genético que se requiere para el análisis (Beaumont y Bruford, 1999). Los mapas

genéticos son una importante herramienta, ya que facilitan tareas como la selección y el clonamiento de genes para realizar estudios más acabados (Zane *et al.*, 2002). Los microsatélites han sido los marcadores de preferencia para esta tarea por su alto polimorfismo, su gran abundancia y su distribución azarosa en los genomas eucariontes (Sunnucks).

1.2.3.1 Características y ventajas de los microsatélites sobre otros marcadores moleculares

Las principales características de un microsatélite sobre la mayoría de los marcadores genéticos son las siguientes (González, 2003).

1. Presentan herencia mendeliana simple.
2. Son codominantes (son alelos que ambos padres heredan, pudiéndose identificar individuos homocigotos y heterocigotos).
3. Presentan un número muy alto de alelos en un mismo *locus*.
4. Proveen la más alta incidencia de polimorfismo.
5. Muchos de sus alelos se encuentran en individuos estrechamente relacionados.
6. Se pueden utilizar en cualquier fase de desarrollo del organismo de estudio.
7. Su uso requiere solo de pequeñas cantidades de ADN.
8. Son muy abundantes: se encuentran uniformemente dispersos a través del genoma, aproximadamente cada 20 Kpb.
9. Son altamente reproducibles en otros laboratorios.

1.2.3.2 Limitaciones de los microsatélites

La única limitación relevante de los microsatélites puede ser la inversión inicial de recursos económicos y la experiencia técnica requerida para la clonación y secuenciación de los *loci* SSR (González, 2003).

Por otro lado, otras limitaciones con menor frecuencia o efecto, se generarían en el caso de que las mutaciones ocurran en el sitio de apareamiento de los *primers*, y tendrían como resultado alelos nulos (Zink, 2010), y la presencia de "bandas inespecíficas", las cuales son productos de la amplificación por PCR que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original, la ocurrencia de estos artefactos dificulta la lectura de los geles, e incluso son confundidos como alelos, complicando el análisis genotípico (Chambers y MacAvoy, 2000; Zink, 2010).

La mayor desventaja en la aplicación de microsatélites es la necesidad de aislarlos de *novo* para las especies en las cuales va a ser utilizados por primera vez. Al encontrarse usualmente en regiones no codificantes donde la tasa de mutación es más alta que las codificantes, el uso de *primers* universales de secuencias conservadas, empleados efectivamente para ADN genómico, resulta problemático en la identificación de microsatélites. Además, el alto polimorfismo observado en una especie no es garantía para hallar la misma variación en especies relacionadas especialmente cuando incrementa la distancia evolutiva (Zane *et al.*, 2002). Sin embargo, estas consideraciones no han desalentado a muchos investigadores quienes han convertido a los microsatélites en una herramienta muy popular (Zink, 2010).

1.2.3.3 Clasificación de los microsatélites

Los microsatélites se clasifican por el tipo particular de motivos de secuencia (*motif*) o unidades de repetición (UR), y por su longitud o número de repeticiones en una posición concreta en el cromosoma (Tabla 2). Bajo estos criterios se clasifican generalmente en tres familias (Chambers y MacAvoy, 2000; Zink, 2010):

1. Microsatélites perfectos: se definen como repeticiones en un número mínimo de 9 UR sin interrupción y sin repeticiones adyacentes
2. Microsatélites compuestos: se tratan de dos o más repeticiones de al menos 9 UR ininterrumpidas. Las UR pueden ser combinaciones de motivos de un número variable de pares de bases
3. Microsatélites interrumpidos. son repeticiones ininterrumpidas de al menos 9 UR separadas como máximo por 4 pares de bases

Aunado a esto los términos puro (o perfecto), compuesto y complejo se utilizan para especificar que uno, dos o más tipos de motivos, se encuentran presentes a lo largo de un *locus* microsatélite dado y el término interrumpido (o imperfecto) es usado cuando existe una o más unidades no repetitivas en un *locus* microsatélite (Chambers y MacAvoy, 2000).

Tabla 2: Clasificación de los microsatelites según el motivo de secuencia particular (*motif*) o unidades de repetición (UR) que lo componen (Zink, 2010).

Tipo de microsatélite	Ejemplos
SSR Puro	(ACC) ₉
SSR Interrumpido Puro	(ACC) ₆ TG (ACC) ₇
SSR Compuesto	(ACC) ₅ (TTG) ₉
SSR Interrumpido compuesto	(ACC) ₈ TG (ACC) ₅ GA (TTA) ₆
SSR Complejo	(ACC) ₈ TG (GA) ₁₂ (TTA) ₅ GC (TTA) ₄₊₃

2.3.4 Aplicación de Microsatélites

Actualmente las principales aplicaciones de un microsatélite son las siguientes (Zink, 2010):

1. Identificación individual y pruebas de paternidades: El principio de las pruebas de paternidad utilizando marcadores genéticos microsatélites consiste en la comparación del genotipo y/o fenotipo de la descendencia con el de sus progenitores. Como principio “mendeliano”, uno de los alelos que presenta un individuo proviene del padre y el otro de la madre. En dicho análisis, al igual que la identificación individual, la identificación del o de los testigos, tanto a nivel fenotípico como genotípico debe ser perfectamente conocida y concordante con la información obtenida en los análisis realizados al individuo. El elevado polimorfismo que presentan estos marcadores y la posibilidad de poder detectar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales, ya que resulta muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados para una serie de marcadores, compartan todos sus alelos.

2. Mapas genéticos: Otra aplicación de los microsatélites es la construcción de mapas de ligamiento más completos y detallados; así como la identificación de genes de interés. Todos los marcadores pueden ser utilizados para mapas de ligamiento; sin embargo, se requiere, que los alelos se segreguen independientemente y que además puedan ser monitoreados a través del pedigrí. La descendencia puede ser informativa si los progenitores son dobles heterocigotos en los *loci* analizados. Así, un mapa genético bien surtido de marcadores se convierte en una herramienta muy útil para identificar genes responsables de caracteres de interés.

3. Estudios de genética poblacional: Representa una de las áreas en donde los microsatélites han sido más ampliamente utilizados, ya que nos permiten la identificación de cada alelo por *locus*, la obtención de datos poblacionales, y el

cálculo de las frecuencias alélicas. De esta manera podemos estimar las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos así como también realizar análisis de estructura de la población.

4. Estudios de filogeografía: Actualmente la mayoría de los estudios sobre filogeografía están basados en el análisis de secuencias mitocondriales, ya que contienen información sobre el pasado de las poblaciones, como patrones de distribución, divergencia de especies y evolución de las poblaciones en un contexto geográfico. Por otro lado, el análisis de microsatélites en un contexto filogeográfico puede ayudar a determinar si existe una estructura genética reciente, y si dicha estructura puede deberse a la heterogeneidad del ambiente “*Landscape genetics*”

1.2.4 Mutación, alelos nulos y homoplasia en los microsatelites

Las mutaciones son alteraciones del material genético y en ellas se incluyen desde simples sustituciones de un solo nucleótido hasta las deleciones o inserciones de uno o más nucleótidos. La mayoría de las mutaciones en animales no conllevan a cambios en el fenotipo, ya que, ocurren en regiones no codificantes (mutaciones silentes). Las regiones o secuencias codificantes muestran una baja tasa de mutación que se ve reflejada en la escasa variabilidad existente dentro de especies y el alto grado de conservación que presentan estas regiones entre especies (González, 2003). El elevado grado de conservación de estas regiones se puede explicar muchas veces por el hecho de que las mutaciones dentro de esta región son deletéreas, ya que causan la pérdida de una función importante y por lo tanto son eliminadas por selección purificadora (Morgante y Olivieri, 1999).

Los microsatélites, a diferencia de otros marcadores, tales como proteínas o enzimas, presentan un patrón diferente de mutación, ya que en primer lugar, la mayoría de las mutaciones están involucradas por la ganancia o pérdida de una

simple unidad de repetición (Wenxing *et al.* 2015), además de la propia presencia de homoplasia, la cual a su vez causa una subestimación de la cantidad total de variación entre poblaciones y por ende de las distancias genéticas; por lo tanto, ocurre una sobreestimación de las similitudes entre las poblaciones. La tasa de mutación en los microsatélites ha sido estimada en un rango que oscila entre 10^{-3} y 10^{-5} mutaciones por gameto (Sunnucks, 2000); sin embargo, el mecanismo por el cual los microsatélites mutan es aún desconocido. Dos mecanismos son los que principalmente han sido propuestos: en primer lugar se cita un desigual cruce en la meiosis y en segundo lugar un desliz de la hebra del ADN durante la replicación, siendo al parecer esta última, la principal causa de mutación de los microsatélites (Goldstein y Schlotterer, 1999).

Los dos principales modelos que se han utilizado para modelar el proceso mutacional de los microsatélites son: el modelo de alelos infinitos (IAM) y el modelo mutacional por pasos (SMM). En el IAM se supone que la mayoría de nuevas mutaciones dan lugar a nuevos alelos distinguibles, es decir, los nuevos alelos mutantes son siempre diferentes a los que ya existían en la población original, por lo que en este caso la homoplasia no existe o es despreciable. En el SMM los alelos sólo pueden mutar por la ganancia o pérdida de una sola unidad de repetición; debido a esto, queda claro que puede existir una gran cantidad de homoplasia (Goldstein y Schlotterer, 1999).

Ambos modelos son por lo tanto extremos. Otro modelo intermedio que se cita en la literatura, aunque con menor frecuencia es el de dos fases (TPM) y es igual al SMM, pero permite que se puedan dar mutaciones de mayor magnitud (Teoría de la Coalescencia) y predice la varianza esperada en número de repeticiones de un microsatélite, bajo distintos procesos mutacionales e historias demográficas. En este modelo se pueden dar «mutaciones viejas» (alelos ya existentes en la población), pero también «mutaciones nuevas» (alelos nuevos en la población), con lo cual la cantidad de homoplasia existente siempre será menor que en el

modelo SMM. Por lo tanto, TPM en la práctica sería más parecido al IAM (Zane *et al.*, 2002; Zink, 2010).

Se habla de alelos nulos cuando estos no pueden ser amplificados por PCR, debido principalmente a una mutación en el punto de hibridación del iniciador. Uno de los alelos no amplifica y por lo tanto el individuo es catalogado como homocigoto para el otro alelo (Zane *et al.*, 2002). La existencia de alelos nulos es especialmente difícil de detectar cuando su frecuencia en la población es baja y cuando no se dispone de información genealógica fiable. Su determinación sería posible si se presentara en homocigosis, ya que no obtendríamos producto amplificado de un determinado individuo para ese *locus*.

La homoplasia hace referencia al hecho de que dos alelos tengan el mismo tamaño (pb) pero no es debida a que sean idénticos. Se toma como idénticos por tener el mismo tamaño pero intrínsecamente existen claras diferencias en cuanto a su estructura, presencia de inserciones, cambios de bases o variaciones en la región flanqueante (Zink, 2010). Éste es un tipo de polimorfismo que puede detectarse únicamente por secuenciación, y puede pasar inadvertido en caso de analizar individuos mediante amplificación por PCR y electroforesis para asignar tamaños. La homoplasia en las pruebas de paternidad y parentesco nos supone una relación cuando no la hay o viceversa. También puede ser fuente de error en estudios poblacionales o de evolución porque la tasa de mutación de los microsatélites está relacionada de forma compleja con el tamaño y composición del alelo. Por ejemplo, los alelos interrumpidos o compuestos conllevan con más frecuencia a casos de homoplasia (Zane *et al.*, 2002; Herrera-Paz, 2012).

En modelos mutacionales del tipo IAM se supone la no presencia de homoplasia, ya que una nueva mutación produce la creación de un nuevo alelo; en este caso totalmente distinto al que existía previamente en la población. Sin embargo, los otros modelos de mutación (SMM, TMP) pueden llegar a generar homoplasia y la cantidad dependerá de la tasa de mutación presente en la población. En los

marcadores del tipo microsatélite se espera en teoría una cierta cantidad de homoplasia, ya que existe evidencia de que directa o indirectamente los microsatélites presentan un tipo de mutación del tipo SMM o TPM; (Zane *et al*, 2002); por último, el rango limitado de tamaños de alelos presentes en los microsatélites reduce los posibles estados alélicos favoreciendo la cantidad de homoplasia (Yuasa y Umetsu, 2005; Zink, 2010).

1.2.5 Descripción y biología de la especie del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*)

La cacerolita de mar (*Limulus polyphemus*) es un artrópodo acuático (subclase: Xiphosura) cuya historia evolutiva ha permanecido esencialmente sin cambios por más de 200 millones de años. Por lo tanto, ha sido referido como un "fósil viviente". La cacerolita no es en realidad un verdadero cangrejo, sino un miembro de un antiguo grupo de los artrópodos, estrechamente relacionado con las arañas y los escorpiones. Son de color marrón oscuro y llegan a alcanzar una longitud de 60 cm, con un caparazón, en la forma de herradura, lisa y convexa. Su forma no solo favorece el desplazamiento por la arena y el fango, sino que brinda protección a los apéndices ventrales. Este artrópodo corresponde al phylum Artropoda, a la clase de los merostomados y de subclase u orden de los Xifosuros (*Ímulus*). El nombre científico de esta especie es *Limulus polyphemus*, y de manera común se le conoce como cangrejo de herradura, o cacerolita de mar "mex" (King *et al.*, 2005; CONABIO, 2010).

La distribución geográfica reportada para la cacerolita de mar, incluye la costa atlántica occidental de América del Norte desde Maine hasta el sur de la península de Yucatán, aproximadamente entre 19°N hasta 42°N. para el caso de las poblaciones mexicanas de *Limulus polyphemus* su distribución se limita a las costas de la Península de Yucatán (Figura 1), aproximadamente entre 18°N y 21°N, este artrópodo habita en bahías y lagunas costeras de la península de Yucatán, México (King *et al.*, 2005; CONABIO, 2010).

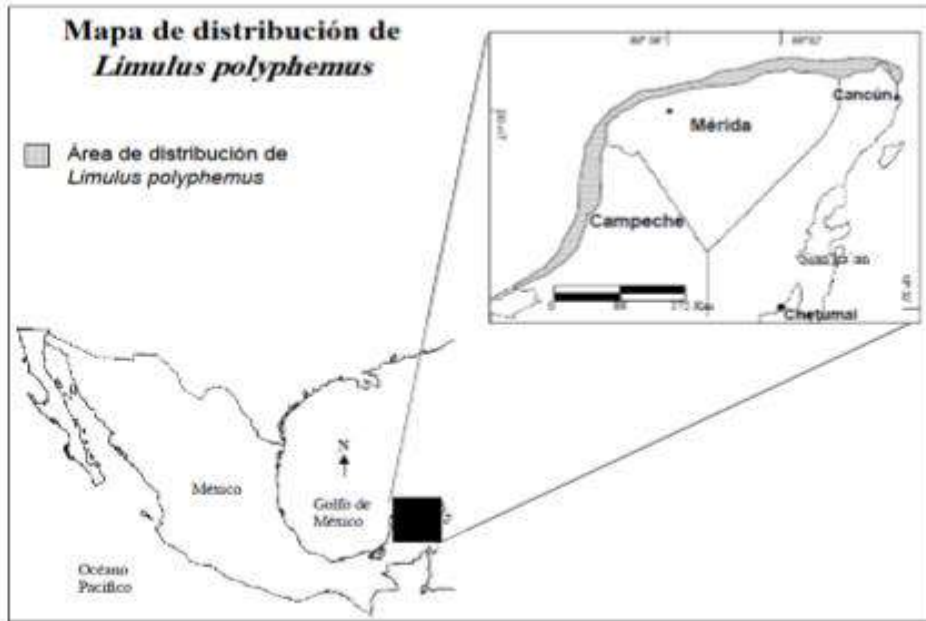


Figura 1 Distribución de *Limulus polyphemus* en la península de Yucatán (Gómez-Aguirre, 1995).

Las principales características de la cacerolita de mar son: un exoesqueleto o caparazón duro y segmentado, con apéndices especializados y articulados, y la muda periódica de su caparazón (exuvia) el cual está formado principalmente por quitina. El cuerpo de la cacerolita de mar está dividido por el prosoma (cefalotórax), opistosoma (abdomen) y los segmentos que contienen los 4 pares de patas o apéndices locomotores, así como el telson. El prosoma se encuentra recubierto por un caparazón con forma de herradura, liso y convexo, con sus bordes laterales sobresaliendo formando un doblez (Figura 2). En posición dorsal presenta un par de grandes ojos compuestos laterales y un par de ojos más pequeños en la parte media, mientras que en la parte ventral tiene seis pares de apéndices que emplea para la alimentación y la locomoción: un par de quelíceros, un par de pedipalpos y cuatro pares de patas. El opistosoma ofrece un contorno hexagonal. En su cara dorsal todos los segmentos se encuentran soldados, y lateralmente se aprecian unas profundas escotaduras. En la cara ventral se sitúan seis apéndices birráneos, que participan en la natación y en el intercambio

gaseoso. En la parte posterior tiene un telson que presenta forma de espina triangular (King y Eackles, 2004, CONABIO, 2010).

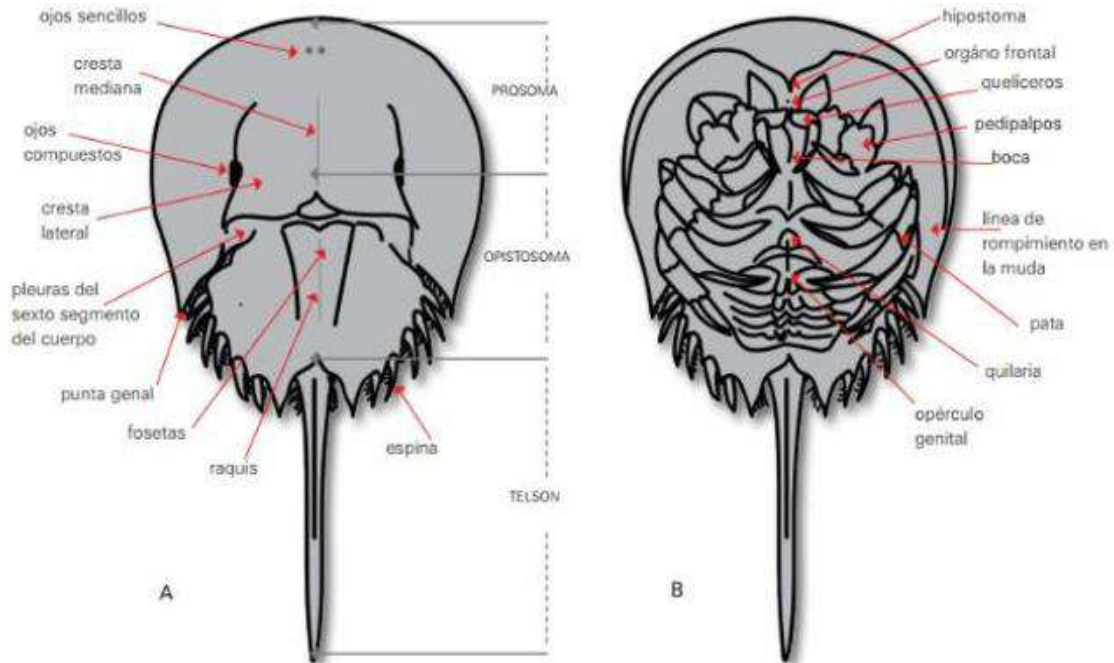


Figura 2. Anatomía de *Limulus polyphemus* (CONABIO, 2010).

Se alimenta de crustáceos, mejillones, almejas, y peces muertos; a su vez, en estado adulto son fuente de alimento de tortugas marinas, mientras que sus huevos y larvas son el alimento de aves, peces, así como de muchos invertebrados, como los cangrejos (CONABIO, 2010).

La cacerolita de mar alcanza la madurez sexual hacia los 10 o 12 años. Los órganos reproductores de ambos sexos consisten en grandes tubos que constan de una sección posterior triangular y varios lóbulos anteriores anastomosados, con dos gonóporos en la parte inferior de los opérculos, en el octavo segmento. En el apareamiento el macho toma a la hembra con sus gonóporos modificados (Silva *et al.*, 2009; James-Pirri, 2010).

miembros perdidos se regeneran después de algunas mudas (Button y Ropes, 1989; DeWooby y Avise, 2000; Silva *et al.*, 2009; Soren *et al.*, 2010).

1.2.5.1 Importancia de *Limulus polyphemus*

Es una especie de importancia evolutiva, ecológica, económica y biotecnológica. Ha habitado el planeta desde hace unos doscientos millones de años, es considerado un fósil viviente pero en la actualidad está en riesgo debido a diversas amenazas a su entorno (King y Eackles, 2004; Botton y Itow, 2009; Rosas y Ortiz, 2012).

En la península de Yucatán se ha intentado recuperar la calidad ambiental; durante la primavera y verano es un periodo en que predominan la influencia de las aguas de origen caribeño con formación de remolinos alejados de la península, condiciones que favorecen para los reclutamientos y el éxito reproductivo y durante el otoño y el invierno esta situación se reduce por el descenso de corrientes litorales del norte y los frentes de remolinos ciclónicos que se aproxima a la península de Yucatán (Figura 2), acumulando sobre los litorales del norte y suroeste del golfo que pueden incidir negativamente sobre las poblaciones y sus áreas de reproducción (Gómez- Aguirre, 1995; Silva *et al.*, 2009; Morgan *et al.*, 2011). Esto último indica la gran necesidad de establecer programas de estudio del comportamiento y hábitos migratorios de *Limulus*; además, para medir su potencial reproductor, periodos y duración y determinar sitios para su conservación en la península de Yucatán (Gómez-Aguirre, 1992). De igual forma la sangre del cangrejo herradura contiene células llamadas amebocitos que liberan una sustancia coagulante, al detectar endotoxinas bacterianas. Esto se utiliza en el lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus* (LAL), esta es una prueba para detectar la contaminación en los productos farmacéuticos con endotoxinas bacterianas y es una prueba para detectar varias enfermedades bacterianas (King y Eackles, 2004).

1.2.5.2 *Limulus polyphemus*, estatus ecológico y legal

Este artrópodo que habita únicamente en dos regiones costeras de América: en la Península de Yucatán y en la costa este de los Estados Unidos de América. Tiene una gran importancia ecológica ya que es parte esencial en la cadena trófica, se alimenta de nematodos, poliquetos, mejillones y peces muertos, a su vez, en estado adulto son fuente de alimento de tortugas marinas, mientras que sus huevos y larvas son alimento de aves y algunos peces, así como de invertebrados tales como el cangrejo. Como depredador y presa es indudable su papel en el equilibrio de las comunidades (Gómez-Aguirre, 1992). Diversos estudios sobre esta especie en localidades como la Bahía de Delaware y Cape Cod en Massachusetts.

Smith *et al.* (2016), señalan que sus poblaciones están decreciendo por una mezcla de factores, entre los que se encuentran la contaminación, la degradación de hábitats de desove en estuarios y actividades pesquero-comerciales. En México, la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales ha categorizado al cangrejo bayoneta, en peligro de extinción, según la NOM-059-SEMARNAT 2001.

1.2.6 Factores antropogénicos que influyen en la población de *Limulus polyphemus*

A pesar de considerar a dicha especie en la lista de especies amenazadas (NOM 059-SEMARNAT 2001), en muchos casos la mayoría de la población en la península de Yucatán no conoce la importancia que dicha especie tiene ecológicamente. Sandoval *et al.* (2016), realizó un monitoreo poblacional en la Laguna de Términos, en Campeche, encontrando una tendencia estable de organismos, pero con aspectos negativos que pudiesen amenazar dicha estabilidad, entre los cuales se encuentran los cambios en la línea de costa, contaminación del hábitat y la pesca accidental por el arrastre de redes.

Asimismo, se menciona que los pobladores de la isla del Carmen, Campeche, consideran a esta especie como problemática y de poco valor económico.

Soren et al. (2010), Realizó estudios en los cuales las poblaciones de *limulus* fueron afectadas antropogénicamente; esto debido a la que la rápida urbanización en la costa de Florida ha llevado a que las áreas costeras se vean muy afectadas por humanos (Chabota *et al.*, 2011; Simpson *et al.*, 2017) y probablemente haya llevado a la destrucción de hábitats para los cangrejos de herradura. También la disminución en la población del sur del Golfo de Maine podría potencialmente estar vinculada a la cosecha para usos medicinales, ya que una de las principales instalaciones de recolección de sangre está situada cerca de esta población.

1.2.7 Dinámica poblacional en *L. polyphemus*

Se han realizado estudios sobre la dinámica poblacional de la especie en seis localidades de la isla Holbox, Quintana Roo, en periodos de secas, lluvias y nortes en donde se registraron un total de 695 organismos, los cuales se distribuyeron proporcionalmente, como 30.5 % de organismos vivos, 34.5 % muertos y 34.9 % exuvias. Rosas y Ortiz, (2012), encontraron 331 ejemplares de *L. polyphemus*, en cinco localidades de Holbox, durante la temporada de nortes, de los cuales 20.5 % eran organismos vivos, 35.3 % muertos y 44.1 % exuvias. Estos resultados muestran que la población de la cacerolita de mar era escasa.

1.2.8 Desarrollo de marcadores de microsatélites en la familia Merostomata

En lo que respecta al desarrollo de microsatélites en Merostomatas (Puilling *et al.* 2011), se aislaron y caracterizaron 18 *loci* microsatélites en la especie *Tachypleus gigas*, emparentada con *L. polyphemus* que se distribuye en las costas de Malasia, de en donde el locus PLlr1-9-2 mostró 6 alelos seguido del locus PLbp2-

1-2 con 5 alelos, el resto de los locus presentó entre 2 y 4 alelos. Se emplearon 5 hexanucleótidos, 3 tetranucleótidos, 5 trinucleótidos, 3 dinucleótidos y 1 mononucleótido.

Para la especie *L. polyphemus* (King y Eackles, 2005), caracterizaron 22 loci micro satélites en 113 animales de tres sitios de muestreo, estos fueron en costas de Estados Unidos en Delaware, Maryland y Florida. En donde el locus con mayor número de alelos varió entre 8 a 45 alelos, de los cuales el locus LpoD6 mostró 45 alelos y el locus LpoA315 mostró 8 alelos para los cuales fueron empleados 3 tetranucleótidos y 19 dinucleótidos.

Cabe señalar que son pocos trabajos en cuanto a aislamiento y caracterización de marcadores moleculares tipo microsatélites por lo que estos marcadores serán la principal herramienta para evaluar aspectos genéticos de poblaciones en *L. polyphemus*.

1.3 Hipótesis

La aplicación de técnicas de secuenciación de nueva generación permitirá identificar un mayor número de marcadores microsatélites en el ADN genómico en *Limulus polyphemus* que los reportados previamente por otros autores.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

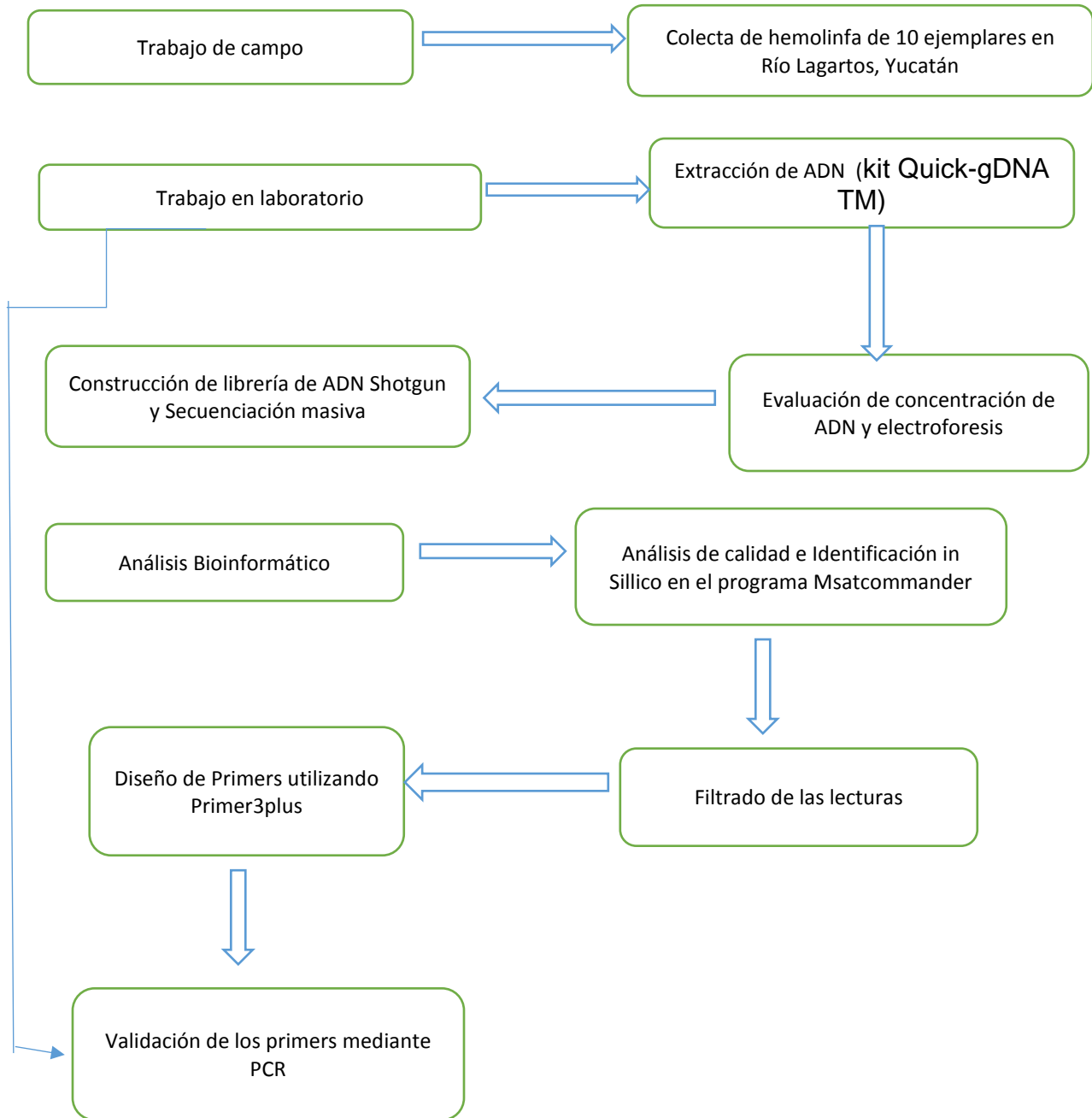
Identificar marcadores tipo microsatélites de *novo* para *Limulus polyphemus* para su posterior aplicación en genética de poblaciones.

1.4.2 Objetivos específicos

- Secuenciar ADN genómico de *L. polyphemus* mediante la técnica de secuenciación de nueva generación de una librería genómica shotgun.
- Diseñar 15 pares de cebadores microsatelites para su empleo en estudios poblacionales de *L. polyphemus*
- Validar los microsatélites generados en una población de 20 individuos de *L. polyphemus*.

1.5 Procedimiento experimental

1.5.1 Diagrama experimental



1.6 Literatura citada

- Allendorf, F. W., Luikart, P., Ritchie, A. y Ryman, N. 2008. Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology & Evolution* 23:327– 337.
- Button, M. L. y Ropes, J. 1989. Feeding ecology of horseshoe crabs on the continental shelf, New Jersey to North Carolina. *Bulletin of Marine Science* 45:637–647.
- Button, M. L. 1999. Toxicity of Cadmium and Mercury to Horseshoe Crab (*Limulus polyphemus*) Embryos and Larvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 64: 137-143.
- Botton, M, L. y Itow, T. 2009. The effects of water quality on horseshoe crab embryos and larvae. American Horseshoe Crabs, *Limulus polyphemus*, in Mexico: Open Possibilities. In: *Biology and Conservation of Horseshoe Crabs..* J.T. Tanacredi et al. (Eds). 439-454 pp.
- Botton, M., Richard, A., Tankersley, F. y Loveland, R. 2010. Developmental ecology of the American horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Current Zoology* 56 (5): 550–562, 2010.
- Chabota, C., Yellea, F., Conor, B., O'Donnella, W. y Winsor, H. 2011. The effects of water pressure, temperature, and current cycles on circatidal rhythms expressed by the American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 43–60.
- Chambers, G. K, y MacAvoy, E. S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 126: 455-476.
- Cheng, H. H. y Crittenden, B. 2001. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*, 73: 539-546.
- Ching, Y., Dan, J., Yang T., Jong, T. y We Y. 2001. Detection of DNA mutations associated with mitochondrial diseases by Agilent 2100 bioanalyzer.

Department of Biochemistry and Center for Cellular and Molecular Biology, School of Life Science, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan 112.

CONABIO, 2010. Ficha técnica de *Limulus polyphemus*, especie de crustáceos. SNIB-CONABIO. México, D.F.

DeWoody, J. A. y Avise, J. C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56: 461-473.

Getino-Mamet, N., Valdivia, L., Gómez, L. y García De León, F. 2017. Isolation and characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci for the cannonball jellyfish (*Stomolophus* sp.) by next generation sequencing. *Mol Biol Rep* DOI 10.1007/s11033-017-4

Godoy, J. A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas* 18 (1): 23-33.

Goldstein, D. y Schlotterer, C. 1999. *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press. United Kingdom.

Gómez-Aguirre, S. 1992. Diferenciación sexual y comportamiento de *Limulus polyphemus* en cautiverio. *Instituto de Biología*. (63): 161-164

Gómez-Aguirre, S. 1995. Cacerolita de mar (*Limulus polyphemus* L.) en el Norte de la península de Yucatán. *Biodiversidad Marina y Costera de México*. CONABIO Y CIQRO.

González, E. G. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59: 377-388.

Herrera-Paz, E. 2012. La genética de poblaciones y el origen de la diversidad humana. *Population Genetics and the Origin of Human Diversity*. 86: 45-56.

- James-Pirri, M. J. 2010. Seasonal movement of the American horseshoe crab *Limulus polyphemus* in a semi-enclosed bay on Cape Cod, Massachusetts (USA) as determined by acoustic telemetry. *Current Zoology* 56:575–586.
- Kin, A. y Błazejowski, B. 2014. The Horseshoe Crab of the Genus *Limulus*: Living Fossil or Stabilomorph? PLoS ONE 9(10): e108036. doi:10.1371/journal.pone.0108036
- King, T. L. y Eackles, M. S. 2004. Microsatellite DNA markers for the study of horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) population structure. *Molecular Ecology Notes* (2004) 4, 394–39.
- King, T. L., Eackles, M., Spidle, A. y Brockmann, H. J. 2005. Regional differentiation and sexbiased dispersal among populations of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Transactions of the American Fisheries Society* 134:441-465.
- Liewpuiling, A., Abubakaradibah, T., Soonguantan, L., Anniechristianus, O. and Qamaruzzaman, F. 2011. Isolationbythe5 anchored PCR technique and characterization of eighteen microsatellite loci in horseshoecrab (*Tachypleusgigas*).
- Mayr, E. 1998. *Especies animales y evolución*. Ariel. España. 26: 112-120 p.
- Morgan, P., Greene, J., Hamilton, M. y Botton, M. L. 2011. Physiological responses of horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) embryos to osmotic stress and a possible role for stress proteins (HSPs). 158:1691–1698.
- Morgante, M. y Olivieri, A. M. 1999. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*, 3: 175-182.
- Neff, B. D. y Gross, M. R. 2001. Dynamic adjustment of parental care in response to perceived paternity. *Proceedings of the Royal Society of London*, 268: 1559-1565.

- Rosas, C. y Ortiz, H. 2012. Cacerolita de mar *Limulus polyphemus* en Holbox, Quintana Roo, México. Editorial Académica Española. 52 pp.
- Sandoval, J. J., Ortiz, H., Rosas-Correa, C. y Correa-Valdez, T. 2016. Disminución De poblaciones de Cacerolita De Mar *Limulus polyphemus* en la Reserva Ría Lagartos, Yucatán: una perspectiva socioeconómica.
- Schlotterer, C. 1998. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5: 63-69.
- Simpson, S., Ramsdell, S., Watson, W. H. y Chabot, C. 2017. The Draft Genome and Transcriptome of the Atlantic Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*. *International Journal of Genomics*.
- SEMARNAT, 2010. Especies silvestres mexicanas. Listado de especies de fauna silvestre protegidas por la NOM-059-SEMARNAT 2010.
- Silva, M., Rosales-Raya, D. y Brockmann. H. J. 2009. American Horseshoe Crabs, *Limulus polyphemus*, in Mexico: Open Possibilities. In: *Biology and Conservation of Horseshoe Crabs..* J.T. Tanacredi et al. (eds.). 97-113 pp.
- Smith, D., Brockmann, H., Beekey, M. A., King, T., Millard, M. y Zaldívar-Rae, J. 2016. Conservation status of the American horseshoe crab, (*Limulus polyphemus*): a regional assessment. *Rev Fish Biol Fisheries* 27:135–175
- Søren, F., King, T., Obst, M., Hallerman, E., Pertoldi, C. y Funch, P. 2010. Population dynamics of American horseshoe crabs historic climatic events and recent anthropogenic pressures. *Molecular Ecology* (2010) 19, 3088– 3100.
- Sunnucks, P. (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 199-203.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of

- polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.
- Tello, J., Gómez, V., Zamora, R., Rivera, S., Solís, P. y Loria, H. 2013. Estructura genética del copépodo *Acartia lilljeborgii* en la costa del estado de Yucatán, México. 41(5): 925-932
- Tóth, G., Gaspari, Z. y Jurka, J. 2000. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*, 10: 967-981.
- Wenxing, L., Huiyang, H., Jingru, H. y Haihui, Y. 2015. Evidence for cyclin A and cyclin B genes in the ovary of the horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*: molecular cloning and expression profiles. Vol. 48, No. 3, 163–176,
- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Population; Variability Within and Among Natural Populations*. The University of Chicago Press. Chicago.
- Yuasa, I. y Umetsu, K. 2005. Molecular aspects of biochemical markers. *Leg Med*, 7: 251-254.
- Zaldívar-Rae, J. 2009. American Horseshoe Crabs, *Limulus polyphemus*, in Mexico: Open Possibilities. *Biology and Conservation of Horseshoe Crabs*. *Rev Fish Biol Fisheries* 28: 253-265.
- Zane, L., Bargelloni, L. y Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.
- Zink, R. M. 2010. Drawbacks with the use of microsatellites in phylogeography: the song sparrow *Melospiza melodia* as a case study. *Journal Avian Biology*, 41: 1-7.

CAPITULO II. Aislamiento de marcadores microsatélites de *Limulus polyphemus*, mediante secuenciación de segunda generación

José F. Jiménez-Sosa¹, Juan J. Sandoval-Gío², Mario A. Martínez-Núñez³, Roberto Zamora-Bustillos*¹

¹TecNM/Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, México.

²TecNM/Instituto Tecnológico de Tizimín, Yucatán, México

³ Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Sisal, Yucatán, México

*Correspondencia de autor: roberto.zamora@itconkal.edu.mx

2.1 RESUMEN

En los últimos años, gracias al avance vertiginoso de las técnicas moleculares, se han desarrollado múltiples marcadores para evaluar la variación genética de las especies (Herrera-Paz, 2012). El estudio de las secuencias microsatelitales es de mucha utilidad, pues son una de las más variables dentro del genoma (González, 2003). Se caracterizan por una alta heterocigocidad y la presencia de múltiples alelos que han contribuido, junto con su codominancia, a convertirlo en el marcador molecular de preferencia en la actualidad (James-Pirri, 2010; Sunnucks, 2000). El objetivo del trabajo es Identificar marcadores tipo microsatélites de *novo* en *Limulus polyphemus* para su aplicación en genética de poblaciones mediante técnica de secuenciación masiva. Se realizó la recolección de hemolinfa, se extrajo el ADN de las mismas para secuenciar mediante técnicas de segunda generación, posteriormente se hizo el análisis in silico y se seleccionaron tetranucleótidos de 4, 5 y 6 repeticiones. Una vez obtenidas las secuencias se diseñaron 15 pares de cebadores en el programa Primers3, posteriormente se validaron en 20 individuos de una población de *Limulus polyphemus* colectadas en Río Lagartos. Solo 4 microsatélites amplificaron en la talla correcta, el 3210, 9181, 4241 y 4981.

Palabras clave: Marcadores moleculares, microsatélites, *Limulus polyphemus*, secuenciación masiva

2.2 ABSTRACT

In recent years, thanks to the vertiginous advance of molecular techniques, multiple markers have been developed to evaluate the genetic variation of the species (Herrera-Paz, 2012). The study of microsatellite sequences is very useful, since they are one of the most variable within the genome (González, 2003). They are characterized by high heterozygosity and the presence of multiple alleles that have contributed, together with their codominance, to make it the molecular marker of preference at present (James-Pirri, 2010; Sunnucks, 2000). The objective of the work is to identify de novo microsatellite markers for *Limulus polyphemus* for its application in population genetics by means of massive sequencing technique. The hemolymph was collected, the DNA was extracted from them to be sequenced by second generation techniques, and the analysis was made in a sillic, finally, tetranucleotides of 4, 5 and 6 repetitions were selected. Once the sequences were obtained, 15 pairs of primers were designed with the Primers3 program, later validated in 20 individuals from a population of Río Lagartos. Of the 15 designed primers, only 4 amplified in the correct size, 3210, 9181, 4241 and 4981.

Key words: Molecular markers, microsatellites, *Limulus polyphemus*, massive sequencing.

2.3 Introducción

La cacerolita de mar (*Limulus polyphemus*) es un artrópodo que habita desde el Golfo de Maine en Estados Unidos hasta el Golfo de México específicamente la Península de Yucatán (Botton y Ropes, 1989; Sandoval *et al*, 2016). Es una de las cuatro especies de la familia Limulidae y la clase Merostomata y la única que habita en el continente americano. La cacerolita de mar es considerada un fósil viviente ya que ha habitado el planeta desde hace 200 millones de años (Zaldívar, 2009; Kin y Błazejowski, 2014). En México a la cacerolita de mar se le ha categorizado en peligro de extinción, NOM-059-SEMARNAT 2001 (SEMARNAT, 2001; CONABIO 2010). Tiene una gran importancia ecológica y biotecnológica (King y Eackles 2004). Es parte esencial en la cadena trófica, se alimenta de nematodos, poliquetos, mejillones y peces muertos, a su vez, en estado adulto son fuente de alimento de pulpo, mientras que sus huevos y larvas son alimento de aves y algunos peces, así como de invertebrados tales como el cangrejo. Como depredador y presa es importante su papel en el equilibrio de las comunidades (Smith *et al*, 2016). En cuanto a importancia biotecnológica la hemolinfa se utiliza en la industria farmacéutica para asegurarse de que los dispositivos médicos, vacunas y fármacos estén libres de bacterias y toxinas. El estudio de las secuencias microsatelitales es de mucha utilidad, pues son una de las más variables dentro del genoma (James-Pirri, 2010). Se caracterizan por una alta heterocigocidad y la presencia de múltiples alelos que han contribuido, junto con su codominancia, a convertirlo en el marcador molecular de preferencia en la actualidad (James Pirri, 2010; Sunnucks, 2000;). El estado alélico del microsatélite es evaluado mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) que usa cebadores que flanquean la repetición. El tamaño de los productos se determina en geles de alta resolución de acrilamida, permitiendo identificar el número de repeticiones de los distintos alelos. La importancia de este trabajo consiste en aportar nuevas secuencias tipo microsatélites para abordar estudios de genética de poblaciones en la especie de *Limulus polyphemus* en México.

2.4 Materiales y Métodos

2.4.1 Trabajo de campo

Se colectaron 20 animales en la localidad de Rio Lagartos, Yucatán 21° 36' N, 88°09' – 88°10' W). A cada animal se le extrajo 1 ml de hemolinfa con ayuda de una jeringa en la parte ventral del telson. Las muestras de cada animal se conservaron en un tubo de 2 ml con la solución DNA shield de la marca Zymo Research.

2.4.2 Trabajo en laboratorio

La extracción de DNA se realizó siguiendo las instrucciones del kit Quick-gDNATM (Ver anexo. 1).

La concentración y calidad del ADN genómico fue evaluada con el equipo nanodrop lite (Thermo Scientific), posteriormente se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2% (90 volts durante 30 min), teñidos con bromuro de etidio para verificar la integridad del ADN, los resultados fueron visualizados en un fotodocumentador Gel Doc (BIO-RAD).

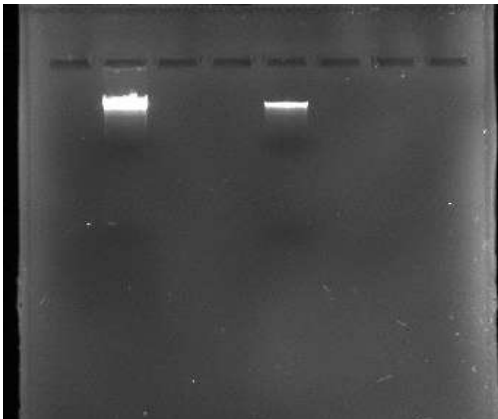


Figura 4. Muestra de ADN genómico de *Limulus polyphemus* en gel de agarosa observada en el fotodocumentador.

2.4.3 Construcción de biblioteca de ADN

Para el diseño de la librería genómica se utilizó el ADN de un individuo, siguiendo el protocolo del kit DNA Shotgun Library Preparation la marca Illumina que consiste en dividir aleatoriamente secuencias de ADN en lotes de piezas pequeñas y luego ensamblar la secuencia buscando regiones de superposición.

2.4.4 Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo en un equipo Illumina HiSeq Lane, con 70 Millones de lecturas. La secuenciación se realizó de forma pareada de 125 pb x 2. con la empresa RTL Genomics de Texas de Estados Unidos. Esta metodología se caracteriza por el uso de nucleótidos marcados con fluoróforos que bloquean de forma reversible la elongación de la cadena. De este modo, tras la detección de la incorporación del fluoróforo, y la eliminación del mismo, es posible continuar con un nuevo ciclo de adición de un nuevo nucleótido. Es lo que se conoce como secuenciación por síntesis.

2.4.5 Análisis bioinformático

Todos los análisis bioinformáticos se realizaron con el sistema operativo Unix, primeramente, con el programa NGS Toolkit (Ravi y Mukesh, 2012) se realizó el análisis de calidad de las lecturas almacenadas en los archivos FastQC. En el cual se analizó la calidad de las lecturas de ambas direcciones (directa y reversa), eliminando secuencias incompletas y adaptadores, generando dos archivos en formato FASTA, uno que contiene las lecturas directas y otra las lecturas reversas. Los parámetros utilizados fueron para secuencias pareadas, con el cual el programa NGS Toolkit que buscó de manera automática los valores de Phred de los cuales los menores a 20 fueron eliminados, la salida de los datos se dio en un formato de tabulador en un documento html. Finalmente, con el programa Qiime2 (2010), se realizó el empalme de las lecturas usando los archivos FASTA previamente

obtenidos en el paso anterior, se generó un FASTA con aproximadamente 57 millones de secuencias pareadas con 7 GB de información.

Posteriormente con en el sistema operativo Linux, usando el programa Msatcommander, se realizó la identificación de los microsatélites, según el tipo de repetición, que en nuestro caso se seleccionaron trinucleótidos y tetranucleótidos de 4, 5, 6 y 7 repeticiones.

El programa Msatcommander, nos arrojó solo los identificadores de las lecturas que contienen las secuencias microsatélites; y para extraer las secuencias microsatélite que corresponde a estos identificadores. El archivo FASTA de 57 millones de secuencias pareadas con 7 GB de información fue albergada en un servidor del Cinvestav-Mérida, donde de manera remota se realizó la búsqueda desde el Laboratorio de Genética Molecular, usando la siguiente secuencia de comandos que se indica en la Figura 5.

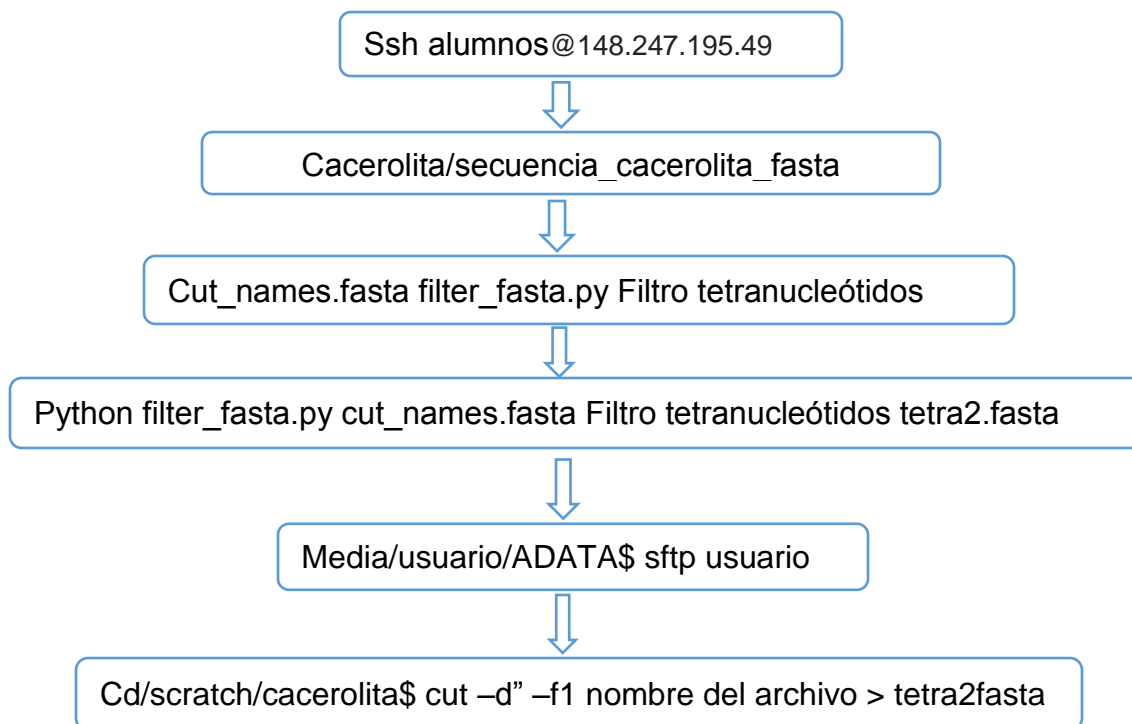


Figura 5. Estructura de los comandos utilizados para la filtración de lecturas en el servidor Cinvestav-Mérida

Una vez extraídas las lecturas se seleccionaron 15 secuencias que contienen microsatélite tipo tetranucleótidos y se diseñaron cebadores utilizando el programa Primers3 con los parámetros que tiene por default el programa (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación de oligonucleótidos

Nombre (Cebador)	Secuencia de cebadores (5' -3')	Repetición
3616	F: GGGGCATGTCTGTGGACTTA R: TGTTGGGATTTAATGATGGAAA	(AAAC) ⁴
6147	F: GGTGGGCAGAGCACAGATAG R: TGACAACCAATAAAAACGCACT	(AAAC) ⁴
4874	F: CAGCTGCCTTCCCTCTAGTC R: CTCCTTACACCATGCATCA	(AAAC) ⁴
4981	F: GCGGTGGGTGGTGATTATTA R: GGAGTGGTTCGACAGGAGAAA	(AAAC) ⁴
9181	F: GGCTTTCGAAACTCGTGGT R: TCCTAACCACCTGGCCATAC	(AAAC) ⁴
9777	F: TGCAGGTAACCCTACCTCTAGC R: CGAAAAACGCCTTAAATTTTG	(AAAC) ⁵
5041	F: AATGTACACTTCAGCTATTTTTCTTTT R: CATGAAAAAGACATTTTAAAGTATTGA	(AAAC) ⁵
1550	F: CAGTAGTCCATGCTTTCTTCTGG R: TAAAATTTGTTTGTGAGTAAACTAAAG	(AGAT) ⁵
4241	F: GGTTCTCCCCAGGAGACTGT R: CTCCAGGCCTCAAATGAAA	(AAAC) ⁵
9041	F: GCAGATAGCCCTCGTGTAGC R: TCAATAAGAAGACACAAGATTTAACGA	(AACC) ⁵
3366	F: TTGTGCACCATTTTTGCTGT R: AATCGGGCAACAGGTTACTG	(AGAT) ⁵
3221	F: CGTATTTTGACACAAAAGCAGA R: TTAAGAATAATGAGCACCACAA	(AGAT) ⁶
3210	F: AGCTGCCTTCCCTCTAGTCTT R: TGCTTCAACGACGTGCAATA	(AAAT) ⁶
6824	F: TGCGGACTTACAACGCTAGA R: GGTGAATACACGTGGTCTTTATGA	(GTTT) ⁶
5790	F: GCAGATAGCCCTCGTGTAGC R: TCACAAAATTAGTCATGTGAACG	(GTTT) ⁶

Posteriormente, se procedió a la validación de los cebadores generados.

Para la validación de los cebadores, se utilizaron 5 individuos de *L. polyphemus*. Mediante la técnica de PCR para lo cual, se utilizó 40 ng de ADN usando las concentraciones reportadas en el Tabla 6. La reacción se llevó a cabo en termociclador (Peqlap), con el programa de 94 °C por 5 min, y 35 ciclo que incluye 94 °C x 30 seg, 62 °C x 30 seg, y finalmente 72 °C x 5 min.

Tabla 4: Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los microsatélites de *L. polyphemus*.

Reactivos (Concentraciones)	Concentración final
Additive 1	
Additive 3	
PCR Buffer	1,0 X
Mg conc. de buffer separate Mg solution	2,0 nM Mg total
dNTP´s	0,3 mM
Forward Primer (0.5 µM)	0,3 µM
Reverse Primer (0.5 µM)	0,3 µM
Polimerasa (1U)	1,0 U
ADN	40 ng
PCR grade water	

El producto se verifico en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y el resultado se visualizó en un fotodocumentador de la marca (Biorrad).

2.5 Resultados y Discusión

Del análisis de 57 millones de lecturas, se generaron 71 microsatélites de tipo trinucleótido, 43 de cinco repeticiones, 21 de seis repeticiones, cinco de siete repeticiones, mientras que, para los tetranucleótidos, se identificaron 84 de cuatro repeticiones, 11 de cinco repeticiones y cinco de seis repeticiones (Tabla 5). Se observa que la mayor proporción de secuencias se encuentran en los microsatélites que tienen un menor número de repeticiones.

Tabla 5 Identificación *in Sillico* de tri y tetranucleótidos

Tipo de microsatélite	Numero de Secuencias
(Tri) ⁴	78
(Tri) ⁵	43
(Tri) ⁶	21
(Tri) ⁷	5
(Tri) ⁸	2
(Tetra) ⁴	84
(Tetra) ⁵	11
(Tetra) ⁶	5

En la Tabla 5, se puede apreciar, que mientras aumenta el número de repeticiones, disminuye el número de lecturas y viceversa, esto posiblemente se deba a la misma naturaleza del genoma de esta especie, donde no ha evolucionado durante millones de años, lo cual no ha permitido que existan cambios morfológicos en millones de años, como se evidencia con su ancestro *Limulus darwini* de 148 millones de años, encontrado en una formación rocosa en Kcynia Polonia (Kin y Błazejowski, 2014) (Figura 6).

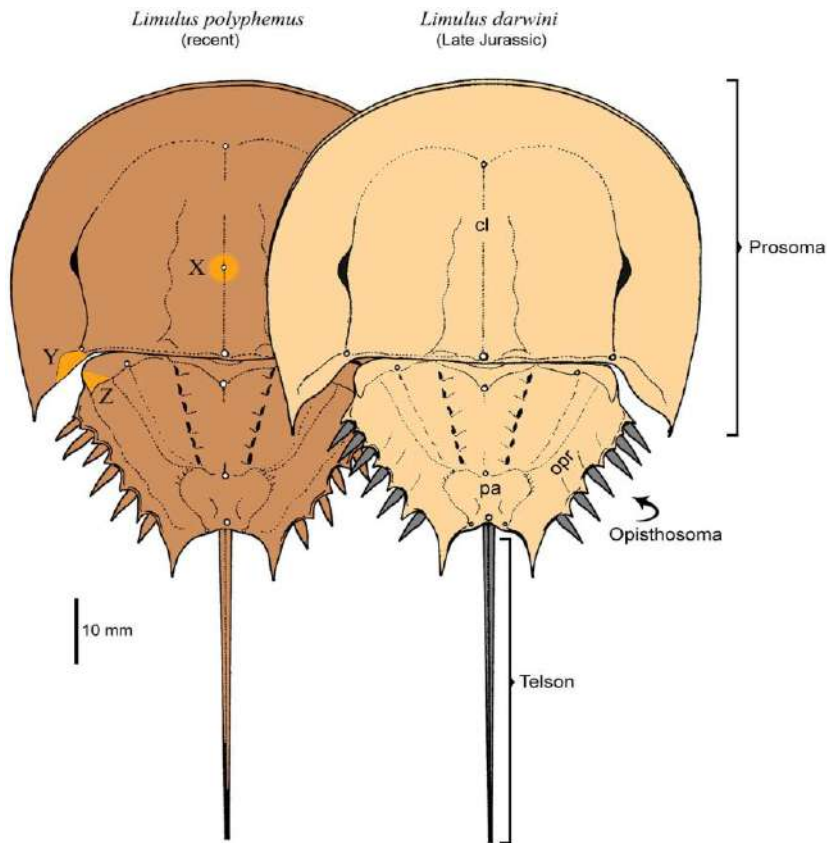


Figura 6. Comparación de *Limulus polyphemus* moderno y su pariente extinto de 148 millones años (*Limulus darwini*) (Kin y Błazejowski, 2014).

Otra posible explicación al bajo número de lecturas con microsatélites identificadas se deba al método de análisis bioinformático que se aplicó, lo cual nos da la pauta para re-analizar los datos utilizando otras técnicas computacionales que permitan obtener un mayor número de microsatélites como las empleadas por Xing-Duan, *et al.* (2014), quienes generaron 6303 pares de cebadores utilizando el programa bioinformático Bruijn graph y SOAP denovo para la obtención de microsatélites en la especie *Callosobruchus chinensis* de los cuales se seleccionaron 196 pares de cebadores.

En un trabajo similar con una especie de medusa, Getino-Mamet, *et al.* (2017), utilizaron el mismo método (el programa Msatcommander) y obtuvieron 506,771,269 lecturas en la medusa bala de cañón (*Stomolophus sp*) y se generaron 1546 microsatélites con las siguientes proporciones: dinucleótidos 69% (1072),

trinucleótidos 20% (320), tetranucleótidos 6% (103), pentanucleótidos 3% (35) y hexanucleótidos 2% (16), lo cual nos permite apreciar un resultado similar ya que el mayor número de microsatélites se encuentra en los microsatélites de menor repetición.

Se seleccionaron 15 cebadores y se validaron mediante PCR (Reacción en cadena polimerasa) de los cuales 9 cebadores no amplificaron en la talla correcta y solo 4 amplificaron en la talla correcta esto quiere decir que amplificaron el 25% de los 15 seleccionados anteriormente. Como se observa en el gel de agarosa únicamente amplificaron 4, el 3210, 9181, 4241 y 4981 respectivamente (Figura 7) los cuales fueron validados en muestras de ADN en una población de 20 individuos colectadas de Río Lagartos, Yucatán.

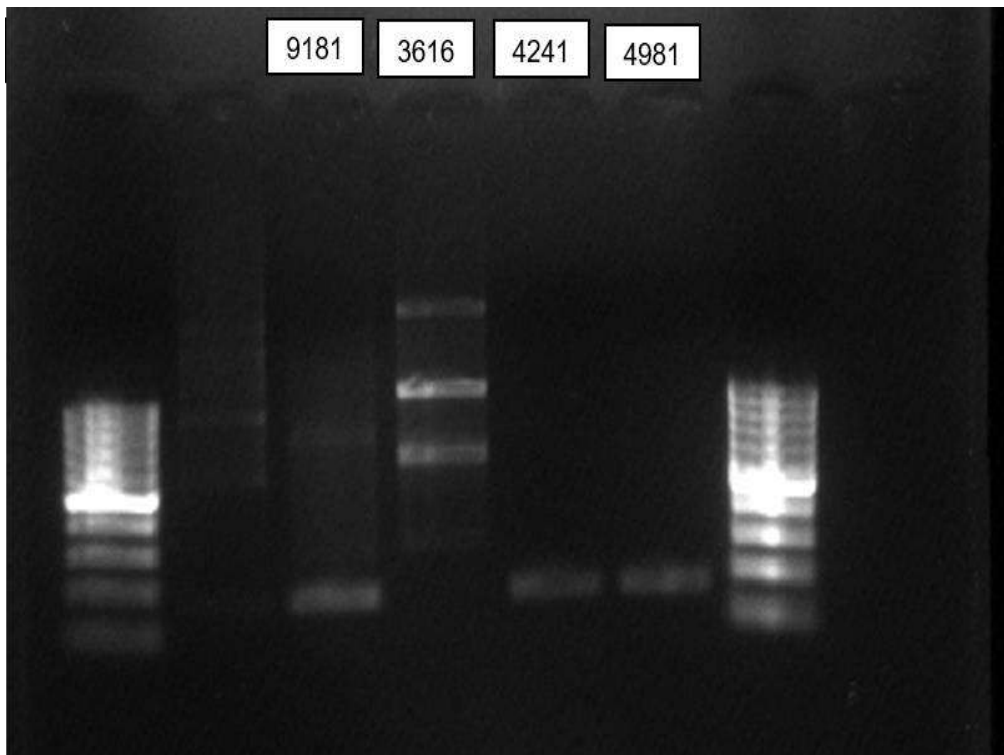


Figura 7. Imagen del gel de agarosa resultado de la validación de las tallas de microsatélites en gel de agarosa.

King y Eackles 2004, reportaron microsatélites en *Limulus* en la cual se emplearon 3 tetranucleótidos y 19 dinucleótidos con muestras obtenidas y obtuvieron 22 microsatélites de los 30, que habían seleccionado utilizando la técnica de Magnetic bead Technology en el cual obtuvieron una mayor cantidad de microsatélites lo que indica que fue un método adecuado para de identificación de los mismos. Aunado a esto (Pulling et al. 2011), aislaron 18 marcadores tipo microsatélites de *Tachypleus gigas* en las costas de Malasia de los 60 seleccionados en tres poblaciones en el cual se emplearon cinco hexanucleótidos, tres tetranucleótidos, cinco trinucleótidos, tres dinucleótidos y un mononucleótido empleando la técnica PCR anclada para aislamiento de loci microsatélite, estos resultados tienen que ver de manera directa con el genoma de la especie ya que es una especie considerada fósil viviente por lo cual no ha sufrido muchos cambios en su evolución en millones de años.

2.6 Conclusión

La técnica de secuenciación masiva del ADN de nueva generación es una técnica avanzada, la cual nos permitió generar un número adecuado de marcadores moleculares tipo microsatélites para la aplicación de estudios genéticos poblacionales. La siguiente etapa del trabajo consistiría en validar estos microsatélites en geles de poliacríamida para evaluar el nivel de polimorfismo que presentan, y su posterior aplicación en la genética de la conservación de poblaciones de esta especie.

2.6 Recomendaciones

Los resultados arrojaron un menor número de microsatélites, en relación con el número de lecturas obtenidas, por lo tanto, el método de búsqueda puede optimizarse, recomendándose hacer un nuevo análisis empleando otro programa. Sin embargo, para los estudios de genética de poblaciones basta con caracterizar al menos 10 microsatélites con herencia mendeliana para ser utilizado como un marcador genético. Es necesario seguir realizando más estudios para generar nuevos marcadores tipo microsatélites para la especie *Limulus polyphemus* ya que existen pocos trabajos relacionados a esta especie que servirán de base para el estudio de genética de poblaciones.

2.7 Literatura citada

- Allendorf, F. W., Luikart, P., Ritchie, A. y Ryman, N. 2008. Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology & Evolution* 23:327– 337.
- Button, M. L. y Ropes, J. 1989. Feeding ecology of horseshoe crabs on the continental shelf, New Jersey to North Carolina. *Bulletin of Marine Science* 45:637–647.
- Button, M. L. 1999. Toxicity of Cadmium and Mercury to Horseshoe Crab (*Limulus polyphemus*) Embryos and Larvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 64: 137-143.
- Botton, M, L. y Itow, T. 2009. The effects of water quality on horseshoe crab ambryos and larvae. American Horseshoe Crabs, *Limulus polyphemus*, in Mexico: Open Possibilities. In: *Biology and Conservation of Horseshoe Crabs..* J.T. Tanacredi et al. (Eds). 439-454 pp.
- Botton, M., Richard, A., Tankersley, F. y Loveland, R. 2010. Developmental ecology of the American horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Current Zoology* 56 (5): 550–562, 2010.
- Chabota, C., Yellea, F., Conor, B., O'Donnella, W. y Winsor, H. 2011. The effects of water pressure, temperature, and current cycles on circatidal rhythms expressed by the American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 43–60.
- Chambers, G. K, y MacAvoy, E. S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 126: 455-476.
- Cheng, H. H. y Crittenden, B. 2001. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*, 73: 539-546.

Ching, Y., Dan, J., Yang T., Jong, T. y We Y. 2001. Detection of DNA mutations associated with mitochondrial diseases by Agilent 2100 bioanalyzer.

Department of Biochemistry and Center for Cellular and Molecular Biology, School of Life Science, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan 112.

CONABIO, 2010. Ficha técnica de *Limulus polyphemus*, especie de crustáceos. SNIB-CONABIO. México, D.F.

DeWoody, J. A. y Avise, J. C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56: 461-473.

Getino-Mamet, N., Valdivia, L., Gómez, L. y García De León, F. 2017. Isolation and characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci for the cannonball jellyfish (*Stomolophus* sp.) by next generation sequencing. *Mol Biol Rep* DOI 10.1007/s11033-017-4

Godoy, J. A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas* 18 (1): 23-33.

Goldstein, D. y Schlotterer, C. 1999. *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press. United Kingdom.

Gómez-Aguirre, S. 1992. Diferenciación sexual y comportamiento de *Limulus polyphemus* en cautiverio. *Instituto de Biología*. (63): 161-164

Gómez-Aguirre, S. 1995. Cacerolita de mar (*Limulus polyphemus* L.) en el Norte de la península de Yucatán. *Biodiversidad Marina y Costera de México*. CONABIO Y CIQRO.

González, E. G. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59: 377-388.

- Herrera-Paz, E. 2012. La genética de poblaciones y el origen de la diversidad humana. *Population Genetics and the Origin of Human Diversity*. 86: 45-56.
- James-Pirri, M. J. 2010. Seasonal movement of the American horseshoe crab *Limulus polyphemus* in a semi-enclosed bay on Cape Cod, Massachusetts (USA) as determined by acoustic telemetry. *Current Zoology* 56:575–586.
- Kin, A. y Błazejowski, B. 2014. The Horseshoe Crab of the Genus *Limulus*: Living Fossil or Stabilomorph? *PLoS ONE* 9(10): e108036. doi:10.1371/journal.pone.0108036
- King, T. L. y Eackles, M. S. 2004. Microsatellite DNA markers for the study of horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) population structure. *Molecular Ecology Notes* (2004) 4, 394–39.
- King, T. L., Eackles, M., Spidle, A. y Brockmann, H. J. 2005. Regional differentiation and sexbiased dispersal among populations of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Transactions of the American Fisheries Society* 134:441-465.
- Puiling, A., Abubakaradibah, T., Soonguantan, L., Anniechristianus, O. and Qamaruzzaman, F. 2011. Isolationbythe5 anchored PCR technique and characterization of eighteen microsatellite loci in horseshoecrab (*Tachypleusgigas*).
- Mayr, E. 1998. *Especies animales y evolución*. Ariel. España. 26: 112-120 p.
- Morgan, P., Greene, J., Hamilton, M. y Botton, M. L. 2011. Physiological responses of horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) embryos to osmotic stress and a possible role for stress proteins (HSPs). 158:1691–1698.
- Morgante, M. y Olivieri, A. M. 1999. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*, 3: 175-182.

- Neff, B. D. y Gross, M. R. 2001. Dynamic adjustment of parental care in response to perceived paternity. *Proceedings of the Royal Society of London*, 268: 1559-1565.
- Rosas, C. y Ortiz, H. 2012. Cacerolita de mar *Limulus polyphemus* en Holbox, Quintana Roo, México. Editorial Académica Española. 52 pp.
- Sandoval, J. J., Ortiz, H., Rosas-Correa, C. y Correa-Valdez, T. 2016. Disminución De poblaciones de Cacerolita De Mar *Limulus polyphemus* en la Reserva Ría Lagartos, Yucatán: una perspectiva socioeconómica.
- Schlotterer, C. 1998. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5: 63-69.
- Simpson, S., Ramsdell, S., Watson, W. H. y Chabot, C. 2017. The Draft Genome and Transcriptome of the Atlantic Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*. *International Journal of Genomics*.
- SEMARNAT, 2010. Especies silvestres mexicanas. Listado de especies de fauna silvestre protegidas por la NOM-059-SEMARNAT 2010.
- Silva, M., Rosales-Raya, D. y Brockmann. H. J. 2009. American Horseshoe Crabs, *Limulus polyphemus*, in Mexico: Open Possibilities. In: *Biology and Conservation of Horseshoe Crabs..* J.T. Tanacredi et al. (eds.). 97-113 pp.
- Smith, D., Brockmann, H., Beekey, M. A., King, T., Millard, M. y Zaldívar-Rae, J. 2016. Conservation status of the American horseshoe crab, (*Limulus polyphemus*): a regional assessment. *Rev Fish Biol Fisheries* 27:135–175
- Søren, F., King, T., Obst, M., Hallerman, E., Pertoldi, C. y Funch, P. 2010. Population dynamics of American horseshoe crabs historic climatic events and recent anthropogenic pressures. *Molecular Ecology* (2010) 19, 3088– 3100.

- Sunnucks, P. (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 199-203.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.
- Tello, J., Gómez, V., Zamora, R., Rivera, S., Solís, P. y Loria, H. 2013. Estructura genética del copépodo *Acartia lilljeborgii* en la costa del estado de Yucatán, México. 41(5): 925-932
- Tóth, G., Gaspari, Z. y Jurka, J. 2000. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*, 10: 967-981.
- Wenxing, L., Huiyang, H., Jingru, H. y Haihui, Y. 2015. Evidence for cyclin A and cyclin B genes in the ovary of the horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*: molecular cloning and expression profiles. Vol. 48, No. 3, 163–176,
- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Population; Variability Within and Among Natural Populations*. The University of Chicago Press. Chicago.
- Yuasa, I. y Umetsu, K. 2005. Molecular aspects of biochemical markers. *Leg Med*, 7: 251-254.
- Zaldívar-Rae, J. 2009. American Horseshoe Crabs, *Limulus polyphemus*, in Mexico: Open Possibilities. *Biology and Conservation of Horseshoe Crabs*. *Rev Fish Biol Fisheries* 28: 253-265.
- Zane, L., Bargelloni, L. y Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.
- Zink, R. M. 2010. Drawbacks with the use of microsatellites in phylogeography: the song sparrow *Melospiza melodia* as a case study. *Journal Avian Biology*, 41: 1-7.

2.8 Anexos

2.8.1. Anexo 1. EXTRACCION DE ADN CON EL KITt Quick-gDNA

1. En un tubo de microcentrífuga, agregue una solución de:
 - 95 µL de agua
 - 95 µL de buffer de tejido sólido 95 (Azul)
 - 10 µL de proteinasa K
2. Mezcle bien y luego incube el tubo a 55 ° C durante 2 horas o hasta que el tejido se solubilice.
3. Agregue 2 volúmenes de Buffer de unión genómica al sobrenadante. Mezque bien.
4. Transfiera la mezcla a una columna zymo-spin IIC-XL en un tubo de recolección. centrifuga (12000 x durante 1 minuto) Deseche el tubo de recolección con el flujo.
5. Agregar 400 µL de DNA Pre-Wash Buffer a un nuevo tube de recolección y centrifugar por 1 minuto. Vaciar el tubo de recolección.
6. Agregue 700 µL de g-DNA Wash Buffer y centrifugar durante 1 minuto. Vaciar al tubo de recolección.
7. Para eluir el ADN, transfíralo a un tubo de microcentrífuga limpio. Añadir 50 µL DNA Elution Buffer, incubar durante 5 minutos y luego centrifugar 1 minuto

