

Caracterización de cuatro *loci* microsatélites  
polimórficos en *Palaemon serratus*  
Caracterización de catro *loci* microsatélites  
polimórficos en *Palaemon serratus*  
Characterization of four polymorphic  
microsatellite *loci* in *Palaemon serratus*



Directoras:

- Ana María González Tizón
- Alejandra Perina Cedrón

Eva García Álvarez

Trabajo de Fin de Grado

Fecha de defensa: 29/06/2015

## TRABALLO FIN DE GRAO

Ana María González Tizón e Alejandra Perina Cedrón autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao “Caracterización de catro *loci* microsatélites polimórficos en *Palaemon serratus*” presentado por Eva García Álvarez para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña, a 18 Xuño de 2015



Asdo.: Ana M. González Tizón



Alejandra Perina Cedrón

Directoras do traballo

## Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>2</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Material y métodos</b> .....	<b>6</b>
3.1. Ejemplares.....	6
3.2. Extracción de ADN .....	6
3.3. Cuantificación y evaluación de la calidad del ADN obtenido .....	7
3.4. Amplificación mediante PCR.....	7
3.5. Secuenciación y análisis de los datos obtenidos .....	10
<b>4. Resultados</b> .....	<b>11</b>
4.1. Amplificación mediante PCR.....	11
4.2. Análisis de los fragmentos obtenidos.....	12
<b>5. Discusión</b> .....	<b>14</b>
<b>6.a. Conclusiones</b> .....	<b>20</b>
<b>6.b. Conclusions</b> .....	<b>20</b>
<b>7. Referencias</b> .....	<b>21</b>

## Resumen

En este trabajo se estudia la diversidad genética de varias poblaciones europeas de *Palaemon serratus*, una especie de camarón explotada comercialmente. Para ello, se han caracterizado cuatro *loci* microsatélites mediante un método rápido y económico. En las seis poblaciones estudiadas, el número de alelos por *locus* varía de 3 a 9, y las heterocigosidades observadas y esperadas varían en un rango de 0 a 0,476 y de 0,092 a 0,731, respectivamente. Además, los cuatro *loci* muestran una desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg. Se trata de un estudio inicial que aporta datos novedosos los cuales necesitan ser ampliados con el fin de diseñar las estrategias adecuadas para la conservación de este recurso, así como para su cultivo.

## Abstract

This project studies the genetic diversity of various European populations of *Palaemon serratus*, a commercially fished shrimp species. For that purpose, four microsatellite *loci* were characterized by a fast and inexpensive method. In the six studied populations, the number of alleles per *locus* ranged from 3 to 9, and the observed and expected heterozygosity ranged from 0 to 0.476 and from 0.092 to 0.731, respectively. Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was detected in all *loci*. This is an initial study that provides new data which need to be extended in order to devise appropriate conservation strategies of this resource as well as for developing its aquaculture.

## 1. Introducción

El camarón *Palaemon serratus* (Pennant, 1777), es un crustáceo decápodo bentónico que se distribuye por la zona intermareal inferior e infralitoral, habitando fondos arenosos y rocosos cubiertos de fanerógamas marinas y algas (Figueras, 1984; Hayward et al., 1995). Su distribución abarca desde las costas danesas y las islas Británicas hasta las costas de Mauritania, así como desde el mar Mediterráneo hasta el mar Negro (González-Ortegón & Cuesta, 2006).

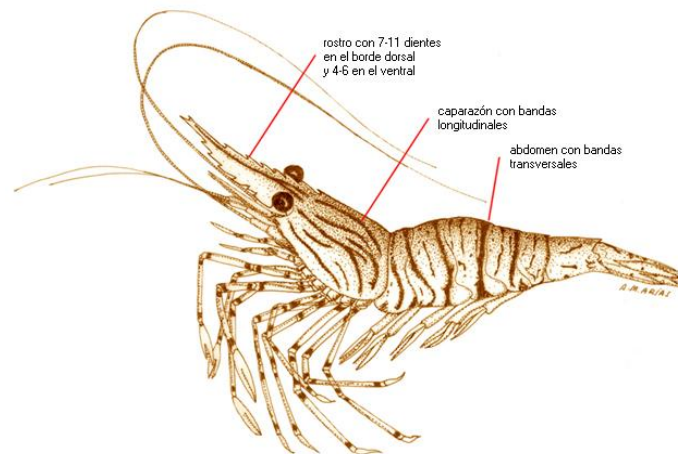


Figura 1. Tomada de <http://www.ictieterm.es>. Morfología del camarón *P. serratus*.

La diferenciación de *P. serratus* con respecto a otras especies congénéricas es compleja en base a diferentes características morfológicas (Figura 1) (González-Ortegón & Cuesta, 2006). Su ciclo vital (Figura 2) presenta varios estadios planctónicos de zoea, sufriendo el estadio final una metamorfosis que dará lugar a una post-larva (Reeve, 1969; Kelly et al., 2012) que se instala fuera de la columna de agua, sedimentando en la zona litoral (Forster, 1951; BIM, 2008) o en el bajo intermareal de costas rocosas (Forster, 1951; Guerao & Ribera, 1996). Estos jóvenes camarones crecen rápidamente durante su primer verano, para desplazarse después a aguas más profundas (Kelly et al., 2012).

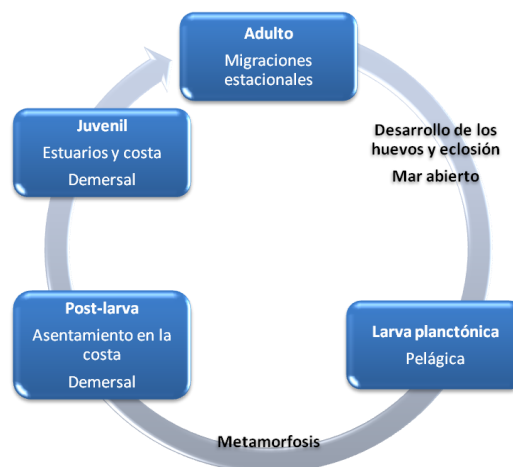


Figura 2. Tomada y modificada de Haig et al. (2014). Ciclo de vida de *P. serratus*, mostrando los diferentes estadios vitales y donde tienen lugar cada uno de ellos.

*P. serratus* es una especie omnívora ([Forster, 1951](#)) que constituye una considerable fuente de alimento para los peces, jugando un papel importante en los ecosistemas, ya que vincula los niveles micro y macro-tróficos ([Henderson et al., 1992](#); [Kelly et al., 2012](#)).

La captura de camarón es una actividad tradicional muy importante en algunas comunidades pesqueras debido a su alto valor en el mercado. La pesca comercial se lleva a cabo en el Mediterráneo, sobre todo alrededor de la península Ibérica ([BIM, 2008](#)) y Francia; y en el Atlántico noreste, con mayor frecuencia en el sur y la costa oeste de Irlanda, el sur de Inglaterra y en la costa de Gales ([Fahy et al., 2006](#); [Guerao & Ribera, 2000](#); [BIM, 2008](#)). *P. serratus* es posiblemente, en lo referente a la economía, la especie más valiosa de todo el género y las hembras con huevos tienen los precios más altos ([Fahy et al., 2006](#)). En Galicia, desde el año 2001 hasta el 2014, las capturas de este crustáceo se mantienen en niveles relativamente constantes oscilando entre 62.185,90-90.710,73 kg/año, lo que representa valores en lonja de más de 2.500.000 €/año (<http://www.pescadegalicia.com/estadisticas.html>). Sin embargo, existen grandes oscilaciones temporales dependiendo de la demanda en el mercado y del estado del mar. Así, en el año 2014, el precio alcanzado en el mercado varió entre 1,00 y 170,76 €/kg.



**Figura 3.** Tomada de <http://www.ictieterm.es>. Ejemplo de captura del camarón *P. serratus*.

La sobreexplotación de las poblaciones naturales lleva a un empobrecimiento de los ecosistemas que puede llegar a provocar situaciones trágicas como la extinción de especies o el declive de los recursos naturales, con las consecuentes pérdidas económicas en las pesquerías. Es por tanto que se hace preciso preservar la riqueza actual de organismos y mantener la diversidad existente para poder afrontar el cambio global desde un conocimiento científico riguroso y amplio. De este modo, podremos encontrar medidas para conservar la biodiversidad y explotar racionalmente los recursos naturales.

La necesidad de conservar la variabilidad genética poblacional y de explotar de manera rentable y sostenible los recursos naturales es un aspecto básico a nivel

científico, social y económico. De aquí que en los últimos años se hayan realizado muchos estudios orientados a la caracterización genética de las poblaciones, mediante el empleo de las herramientas más útiles disponibles, como son los marcadores moleculares de ADN. Sin embargo, en lo que se refiere al camarón *P. serratus* no existen trabajos previos que traten sobre tal fin.

Los microsatélites son los marcadores moleculares más populares y versátiles en los estudios ecológicos, de evolución y genética de poblaciones debido a su herencia co-dominante, su supuesta neutralidad, su alta variabilidad, su elevada frecuencia en los genomas nucleares de la mayoría de los taxones y la relativa facilidad de genotipado en una variedad de plataformas ([Plough & Marko, 2014](#); [Schoebel et al., 2013](#)). Se trata de marcadores genéticos que consisten en repeticiones en tándem de 1-6 pb de longitud, también conocidos como SSR (*simple sequence repeats*), VNTR (*variable number tandem repeats*) y STR (*short tandem repeats*) ([Selkoe & Toonen, 2006](#); [Plough & Marko, 2014](#)).

Estos marcadores tienen el potencial de proporcionar estimaciones contemporáneas de migración, tienen poder de resolución suficiente para permitir distinguir entre tasas relativamente altas de migración y panmixia, y con ellos se pueden estimar relaciones entre individuos ([Selkoe & Toonen, 2006](#)). Por ello, se pueden aplicar en estudios de paternidad, linajes, estructura genética de la población de especies poco estudiadas, estudios de asociación y reconstrucciones de hermanos ([Ohashi & Tokunaga, 2003](#); [Rosenberg et al., 2003](#); [Wang & Santure, 2009](#)). Actualmente, están siendo ampliamente utilizados en una variedad de taxones y experimentos ([Plough & Marko, 2014](#)).

Por último, cabe destacar que las altas tasas de mutación que presentan generalmente los marcadores microsatélites resultan en una elevada diversidad alélica. Esto es importante debido a que, en estudios de poblaciones pequeñas o que han sufrido recientemente un cuello de botella, marcadores con bajas tasas de mutación pueden ser en gran medida invariables y solo los *loci* con las tasas de mutación más altas tienden a ser de carácter informativo ([Hedrick, 1999](#)).

## 2. Objetivos

En este trabajo se plantea:

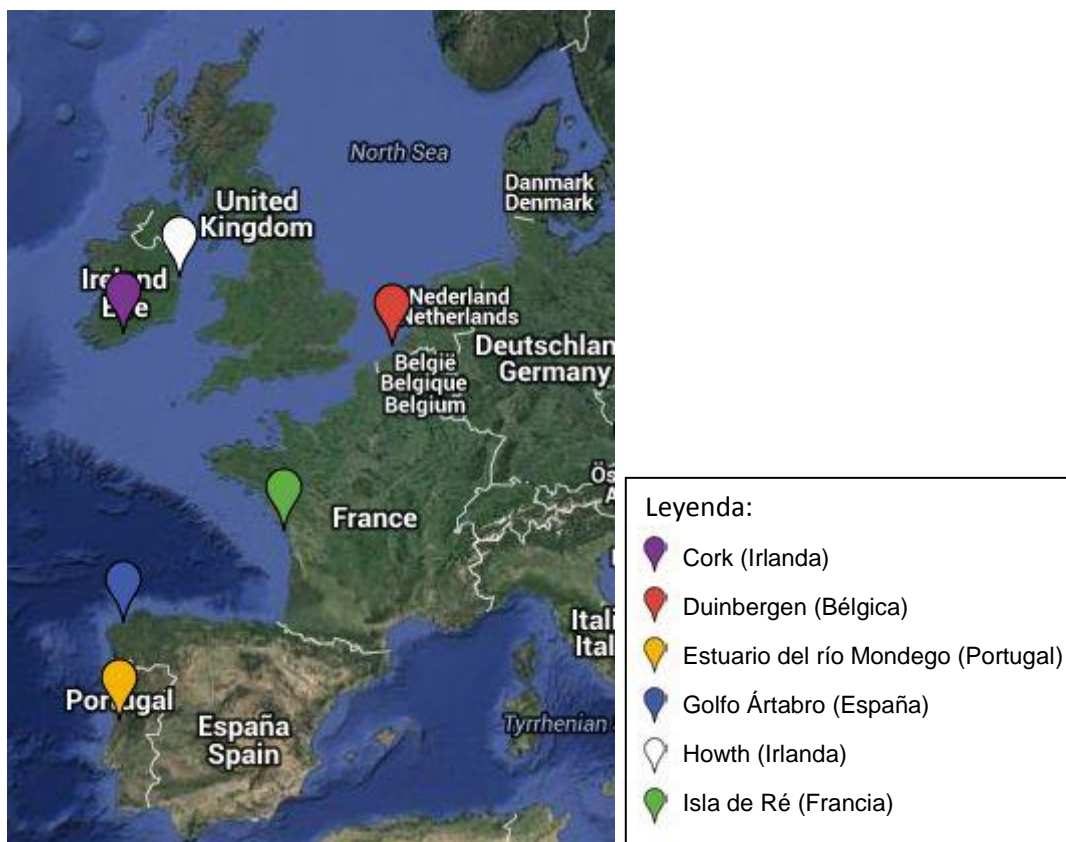
1. La caracterización de cuatro *loci* microsatélites en la especie de camarón *P. serratus* mediante técnicas novedosas que permiten acortar y abaratar este proceso.
2. La utilización de dichos *loci* polimórficos para analizar la diversidad genética en diferentes poblaciones europeas de esta especie.



## 3. Material y métodos

### 3.1. Ejemplares

Se analizaron 79 individuos de *P. serratus*, pertenecientes a seis poblaciones localizadas en un amplio rango a lo largo de su región de distribución (*Figura 4*): Cork (Irlanda, 51° 54' N, 8° 29' W), Duinbergen (Bélgica, 51° 59' N, 1° 57' E), Estuario del río Mondego (Portugal, 41° 25' N, 10° 02' W), Golfo Ártabro (España, 44° 33' N, 9° 29' W), Howth (Irlanda, 53° 23' N, 6° 04' W) e Isla de Ré (Francia, 46° 20' N, 1° 34' W). En todas ellas se analizaron 15 individuos, excepto en Duinbergen (Bélgica), donde solo fueron analizados cuatro. Estos ejemplares se conservaron en etanol absoluto a temperatura ambiente hasta ser procesados.



**Figura 4.** Localidades a las que pertenecen las seis poblaciones estudiadas.

### 3.2. Extracción de ADN

A cada individuo se le extrajo una muestra de tejido muscular con el fin de llevar a cabo la extracción de ADN genómico utilizando *Realpure Spin Kit* (REAL). Se diseccionaron aproximadamente 25 mg de tejido muscular a cada ejemplar y se colocaron, por separado, en distintos tubos de 1,5 mL. A cada muestra de tejido se le añadieron 180  $\mu$ L de tampón de lisis de tejidos y, antes de la adición de 20  $\mu$ L de proteinasa K, se homogeneizaron mecánicamente para aumentar la superficie expuesta a la actividad enzimática. Después de mezclar por inversión, las muestras fueron incubadas durante toda la noche a 55°C en agitación mecánica, con el fin de que la lisis fuera completa.

Una vez que los lisados celulares alcanzaron la temperatura ambiente, se les añadieron 200  $\mu$ L de tampón de lisis/unión, se agitaron vigorosamente mediante vórtex y se incubaron a 70°C durante 10 minutos (min). Posteriormente, las muestras en las que se encontraron partículas insolubles se centrifugaron 5 min a velocidad máxima y se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo.

A continuación, se añadieron a las muestras 100  $\mu$ L de isopropanol, mezclándolas bien por inversión. Seguidamente, se pipeteó el lisado en el reservorio de la microcolumna spin con su tubo de recogida, se centrifugó a 8000 rpm durante 60 segundos (s) y se eliminó dicho tubo.

Después, se colocó la microcolumna spin en un nuevo tubo de recogida y se añadieron al reservorio 500  $\mu$ L de tampón de desinhibición. Las muestras se centrifugaron a 10.000-12.000 rpm durante 60 s. Una vez eliminado el líquido sobrante, se añadieron 500  $\mu$ L de tampón de lavado en el reservorio de la microcolumna spin, se centrifugó a 12.000 rpm durante 60 s y se eliminó el líquido eluido de la columna. Para llevar a cabo un segundo lavado, se volvieron a añadir 500  $\mu$ L de tampón de lavado en el reservorio de la microcolumna spin, se centrifugó a 14.000 rpm durante 60 s y, posteriormente, se eliminó el líquido eluido.

Una vez lavadas las muestras, se centrifugaron de nuevo a máxima velocidad durante 90 s para eliminar el etanol residual. A continuación, se eliminó el tubo de recogida y se insertó la microcolumna spin en un tubo de 1,5 mL.

Por último, se añadieron 100-200  $\mu$ L de tampón de elución (precalentado a 70°C) en el reservorio de la microcolumna spin, se incubaron las muestras durante 1 min y se centrifugaron a máxima velocidad durante 60 s, quedando el ADN genómico en el tubo de 1,5 mL.

### 3.3. Cuantificación y evaluación de la calidad del ADN obtenido

La concentración del ADN obtenido en cada muestra, así como su calidad, se determinaron utilizando el Nanodrop 1000 (Thermo scientific). Seguidamente, en los casos en los que fue necesario, se prepararon diluciones con una concentración final de 10 ng/ $\mu$ L en agua ultrapura y se guardaron a 4°C hasta que se utilizaron en los análisis moleculares descritos a continuación. Las extracciones originales de ADN fueron preservadas como *stock* para futuros análisis a -80°C. También se preservaron en etanol absoluto y a temperatura ambiente los ejemplares de los que fueron extraídas las muestras de tejido.

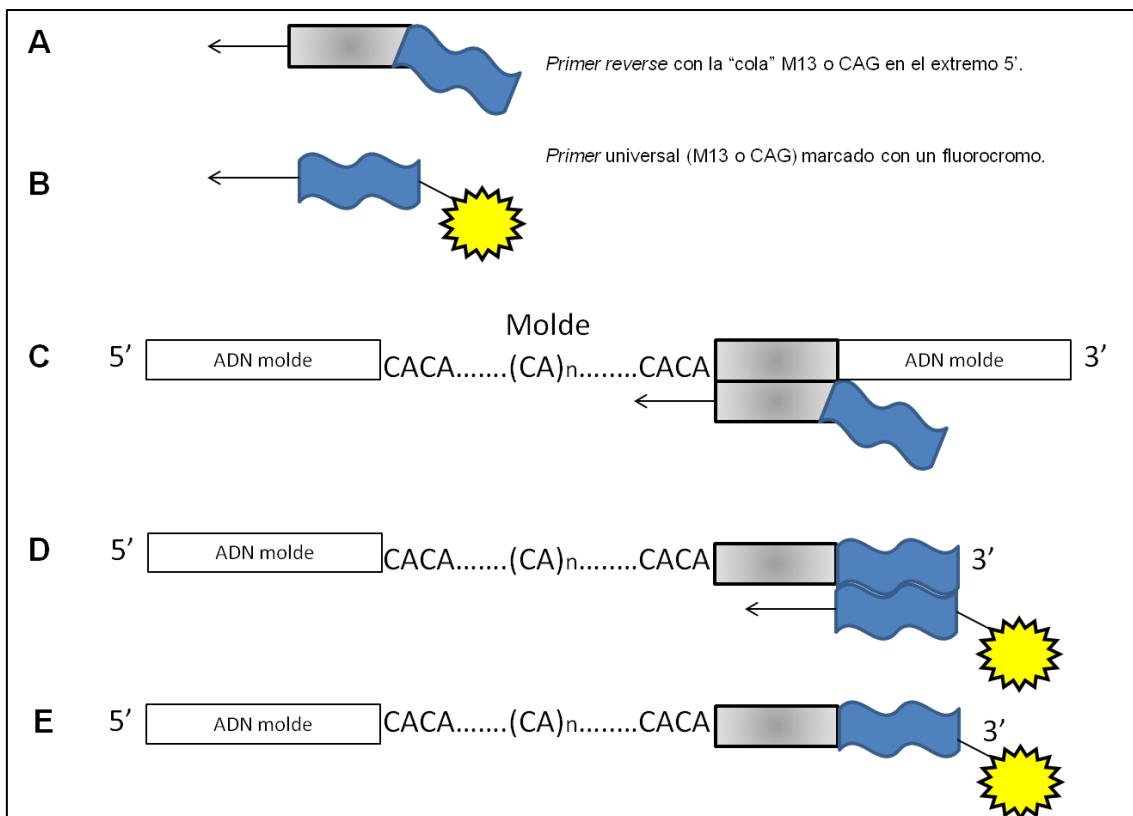
### 3.4. Amplificación mediante PCR

A continuación, se utilizó el ADN genómico extraído para la amplificación de cuatro *loci* microsatélites, los cuales fueron testados en dos PCRs *multiplex*. Las PCRs (*Polymerase Chain Reaction*) fueron realizadas con los *primers* diseñados por [Perina et al. \(2015, enviado\)](#) y su diseño garantiza que: el microsatélite objetivo tiene al menos cuatro repeticiones, el producto de PCR resultante tiene una longitud entre 80 y 500 pb, la temperatura de *annealing* de los *primers* está entre 50°C y 64°C y la

diferencia de la temperatura de *annealing* entre los *primers forward* y *reverse* es menor de 4°C.

Además, para analizar la longitud de los productos de PCR mediante electroforesis y sistemas de detección láser, estos deben estar marcados con un colorante fluorescente. Con dicho fin, se ha optado por un método basado en una *nested* PCR (PCR anidada) que se lleva a cabo en un único tubo ([Schuelke, 2000](#)).

La *Figura 5* muestra el esquema general del procedimiento realizado con el fin de marcar con fluorocromos los productos de PCR en una única reacción, la cual se lleva a cabo con tres *primers*: un *primer forward* específico de secuencia, un *primer reverse* específico de secuencia con una “cola” de la secuencia universal M13 (5'GGA AAC AGC TAT GAC CAT) o CAG (5'CAG TCG GGC GTC ATC) en su extremo 5' y un *primer* universal idéntico a la “cola” del *primer reverse* y marcado con fluorescencia (Modificado de [Schuelke, 2000](#); [Perina et al., 2015 enviado](#)).



**Figura 5.** Tomada y modificada de [Schuelke \(2000\)](#).

Esquema de la amplificación basada en el método de una sola reacción mediante *nested* PCR. **A)** Representa los *primers reverse* específicos para un determinado microsatélite con la “cola” universal. **B)** La figura ondulada de color azul representa el *primer* universal con un marcaje fluorescente (representado por la estrella amarilla). **C)** En los primeros ciclos de PCR, el *primer reverse* con la “cola” se incorpora en los productos de PCR. **D)** A continuación, estos productos hibridan con el *primer* universal marcado, el cual se incorpora al producto durante los subsiguientes ciclos a una temperatura de *annealing* más baja (53°C). **E)** El producto final marcado puede ser analizado en un sistema de detección láser.

Las condiciones del termociclador se eligen de manera que durante los primeros ciclos, el *primer reverse* con su secuencia universal, se incorpora en los productos de PCR que se van acumulando (*Figura 5D*). Después, cuando el *primer reverse* se agota, la temperatura de *annealing* se reduce para facilitar la hibridación del *primer*

universal (*Figura 5E*). Por lo tanto, el *primer* universal marcado con fluorescencia continúa la reacción como si se tratara del *primer reverse* e incorpora el colorante fluorescente en el producto de PCR (*Figura 5F*) ([Schuelke, 2000](#)).

En el presente trabajo, este método de marcaje de los productos de PCR se llevó a cabo en dos PCRs *multiplex* optimizadas por [Perina et al. \(2015, enviado\)](#), combinando en cada una de ellas dos fluorocromos diferentes; concretamente, se utilizaron los *primers* M13 marcados con HEX (hexaclaro-6-carboxi-fluoresceína, de color verde) y los *primers* CAG con 6-FAM (6-carboxi-fluoresceína, de color azul). Con el fin de obtener una fuerza de señal máxima, se debe optimizar el protocolo teniendo en cuenta que: los *primers* universales marcados con fluorescencia y los *primers forward* se deben utilizar en cantidades equimolares; los *primers reverse* se deben utilizar en un cuarto de la cantidad de los *primers forward*, de modo que los *primers* universales puedan continuar la reacción cuando los *primers reverse* se hayan agotado; dado que la temperatura de *annealing* de los *primers* universales marcados con un colorante fluorescente es solamente 53°C, los últimos ocho ciclos de PCR deben procesarse con una temperatura de *annealing* de 53°C aproximadamente y, por último, la etapa de elongación final no debe ser más corta de 10 min ([Schuelke, 2000](#)).

Teniendo en cuenta lo anterior, el protocolo óptimo de PCR *multiplex* (*Tabla 1*) llevado a cabo en un termociclador (MyCycler Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories), consiste en un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguido por 30 ciclos a 95°C durante 30 s, 56°C durante 90 s y 72°C durante 30 s; 8 ciclos a 95°C durante 30 s, 52°C durante 90 s y 72°C durante 30 s; un paso final de extensión a 68°C durante 30 min y una última etapa a 4°C infinito con el fin de que las muestras se conserven hasta que son retiradas del termociclador. Ambas PCRs *multiplex* fueron realizadas en un volumen final de 12,5 µL conteniendo 1 µL de ADN (10 ng/µL), 6,25 µL de *Type-it Microsatellite PCR kit* (Qiagen), 4 µL de agua (*PCR-grade water*) y 1,25 µL de la mezcla de *primers* con una concentración final de 2 µM (en el caso de los *primers* con la “cola” universal, la concentración es de 0,2 µM) ([Perina et al., 2015 enviado](#)).

**Tabla 1.** Protocolo de PCR *multiplex* para la amplificación de los microsatélites con los *primers* específicos (*forward* y *reverse*, este último con la “cola”) y el *primer* universal marcado con fluorescencia.

95 °C	5 min
30 ciclos:	95°C 30 s
	56°C 90 s
	72°C 30 s
8 ciclos:	95°C 30 s
	52°C 90 s
	72°C 30 s
68 °C	30 min
4°C	∞

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel al 2% de agarosa y 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA; pH ≈ 8,3). Estos geles fueron teñidos con RedSafe (Chembio) y revelados en un fotodocumentador (Alpha Innotech).

### 3.5. Secuenciación y análisis de los datos obtenidos

Una vez comprobados, los productos de PCR fueron enviados a la Unidad de Biología Molecular de los Servicios de Apoyo á Investigación da Universidade da Coruña, para el análisis del tamaño de fragmentos de ADN generados por PCR con el sistema de análisis genético 3130xl (Applied Biosystems), utilizando GeneScan 500 (-250) ROX *internal size standard* (Applied Biosystems).

El servicio de Análisis de Fragmentos se realiza por grupos de 16 muestras, que corresponden a 1 carrera del analizador ABI 3130xl de 16 capilares de 36 cm de longitud y con polímero POP7.

En cuanto al protocolo de preparación de muestras, inicialmente se realiza una mezcla de formamida y estándar de tamaño (ROX (6-carboxi-X-rodamina), de color rojo) y se cargan 10  $\mu$ L de la misma en cada pocillo. Seguidamente, se añade la cantidad necesaria de muestra, que dependerá de la eficiencia de la reacción de PCR.

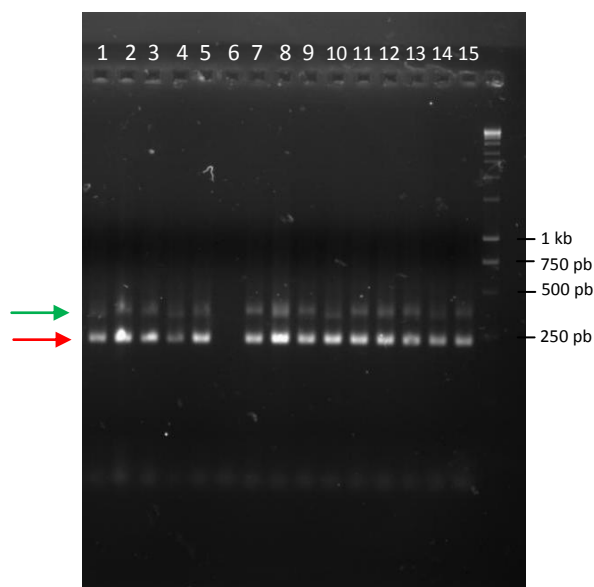
A continuación, los cuatro *loci* se utilizaron para hacer un análisis genético de la diversidad de 79 individuos en las seis poblaciones mencionadas anteriormente. Los perfiles de fluorescencia fueron analizados usando Geneious Pro 5.4.6 ([Drummond et al., 2011](#)) y se utilizó GenAIEx 6.41 ([Peakall & Smouse, 2012](#)) para estimar el número de alelos por *locus*, las heterocigosidades observadas y esperadas y la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg. La presencia de alelos nulos fue testada usando FreeNA ([Chapuis et al., 2007](#)).

## 4. Resultados

### 4.1. Amplificación mediante PCR

Los cuatro marcadores microsatélites amplificaron en los individuos de las seis poblaciones con diferente éxito. En la mayoría de los casos los *primers* utilizados generaron los productos de amplificación esperados, los cuales fueron visualizados en una electroforesis en gel de agarosa y sus tamaños varían entre 82-133 pb en Pser-15 y 489-507 pb en Pser-17 (*Tabla 2*).

En la electroforesis en gel de agarosa se observan, con frecuencia, bandas de pequeño tamaño que no se corresponden con ninguno de los tamaños esperados (*Figura 6*). Se trata de amplificaciones inespecíficas producidas bien por la hibridación de los *primers* en lugares diferentes a las secuencias flanqueantes de los microsatélites, o bien por la hibridación de los *primers* consigo mismos. A pesar de ello, estas amplificaciones inespecíficas no afectan al análisis de los microsatélites, por lo que el método de PCR *multiplex* utilizado es válido para este tipo de estudios.



**Figura 6.** Ejemplo de un gel de agarosa 2% utilizando como estándar de tamaño *Kb DNA Ladder* (Stratagene).

Se trata de la PCR *multiplex* que contiene los *primers* correspondientes a los microsatélites Pser-17 y Pser-18, cuyos tamaños oscilan entre 489-507 pb y 351-379 pb, respectivamente (*Tabla 2*). En este caso, las muestras analizadas pertenecen a los 15 individuos (1-15) de la población de Isla de Ré (Francia). La flecha verde señala las bandas que se corresponden con los tamaños de los microsatélites amplificados; mientras que la flecha roja señala las bandas de pequeño tamaño que no se corresponden con los tamaños esperados.

Sin embargo, la PCR *multiplex* en la que se analizan los microsatélites Pser-17 y Pser-18 no produjo amplificación en las poblaciones de Cork (Irlanda) y Howth (Irlanda). Tampoco se obtuvieron resultados al realizar las PCRs *singleplex* de ambos *loci* por separado. Esto puede ser debido, entre otros motivos, a que el ADN esté demasiado degradado como para que se pueda llevar a cabo la amplificación o a que, en estas poblaciones, se hayan producido mutaciones en la región en la que hibridan los *primers*.

## 4.2. Análisis de los fragmentos obtenidos

En los cuatro microsatélites estudiados, el número de alelos por *locus* varía de 3 a 9, con una media de 5. Como se puede ver en la *Tabla 3*, para el conjunto de las poblaciones analizadas, las heterocigosidades observadas ( $H_o$ ) y esperadas ( $H_e$ ) varían en un rango de 0 a 0,476 y de 0,092 a 0,731, respectivamente, y la media de dichas heterocigosidades es de 0,233 ( $H_o$ ) y 0,489 ( $H_e$ ). Los cuatro *loci* muestran una desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg tras la corrección de Bonferroni. Esta desviación puede ser explicada por la inestabilidad de las secuencias flanqueantes de los microsatélites, que da lugar a alelos nulos. La frecuencia de dichos alelos se muestra en la *Tabla 2*, variando entre 0,05935 en Pser-17 y 0,29966 en Pser-15.

El *locus* más polimórfico, Pser-15, presenta repeticiones trinucleotídicas, al igual que los *loci* Pser-16 y Pser-17, mientras que Pser-18 consta de repeticiones de dinucleótidos. Los tamaños de los diferentes marcadores microsatélites se muestran en la *Tabla 2*.

Por último, cabe destacar que todos los individuos de las poblaciones analizadas son homocigotos para el *locus* Pser-18 y lo mismo ocurre con Pser-15 en la población de Cork (Irlanda) y Pser-16 en Duinbergen (Bélgica).

**Tabla 2.** Características de los cuatro *loci* analizados y secuencias de los *primers forward* (F) y *reverse* (R). Las bases nucleotídicas marcadas de color azul en los *primers reverse* pertenecen a las "colas" añadidas para realizar el método de *nested PCR* explicado en el apartado de [Material y Métodos](#).

<i>Locus</i>	Motivos repetidos	Secuencia de los <i>primers</i> (5'-3')	Nº de alelos <sup>+</sup>	Rango de tamaño (pb)
<b>Pser-15</b>	(AAT) <sub>7</sub>	F: TCGTTGTTTCGTTGAAATAGGAA R: CAGTCGGGGCGTCATCAACCGCTCAACTTTCCGGTTA	9 (0.29966)	82-133
<b>Pser-16</b>	(ACG) <sub>5</sub>	F: GGGAAGATTTGGGATAAGGG R: GGAAACAGCTATGACCATGTGTCTGCCACCACGTAGC	5 (0.24690)	100-115
<b>Pser-17</b>	(AAC) <sub>5</sub>	F: CAAGAACAACAACAACATTGACG R: CAGTCGGGGCGTCATCAACCGCTCAACTTTCCGGTTA	3 (0.05935)	489-507
<b>Pser-18</b>	(AG) <sub>5</sub>	F: ATTTCCCTGACATGGCCC R: GGAAACAGCTATGACCATCTTCCATCATTACCTGGCG	3 (0.14932)	351-379

<sup>+</sup>, estimación de la frecuencia de alelos nulos entre paréntesis.

**Tabla 3.** Heterocigosidades observadas (Ho) y esperadas (He) en las seis poblaciones analizadas.

<i>Locus</i>	Todas las poblaciones		Cork		Duinbergen		Estuario río Mondego		Golfo Ártabro		Howth		Isla de Ré	
	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He
<b>Pser-15</b>	0,215*	0,731	0,000	0,000	0,250	0,656	0,400	0,531	0,267	0,244	0,200	0,651	0,200	0,278
<b>Pser-16</b>	0,241*	0,633	0,067	0,184	0,000	0,500	0,467	0,542	0,400	0,320	0,200	0,558	0,133	0,238
<b>Pser-17</b>	0,476*	0,500			0,500	0,625	0,333	0,491	0,733	0,464			0,300	0,455
<b>Pser-18</b>	0*	0,092			0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			0,000	0,340

<sup>\*</sup>, desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg tras aplicar la corrección de Bonferroni ( $P < 0,0125$ ).



## 5. Discusión

En este trabajo se han utilizado marcadores microsatélites para proporcionar estimaciones de la diferenciación genética y de la diversidad en varias poblaciones del camarón *P. serratus*, situadas en la costa atlántica europea.

Una de las razones por la cual se han utilizado marcadores microsatélites es que son *loci* únicos, se trata de marcadores codominantes para los que se pueden combinar eficientemente muchos *loci* en el proceso de genotipado, proporcionando muestras replicadas del genoma de una manera rápida y poco costosa. Tomar múltiples muestras del genoma proporciona una manera precisa y estadísticamente poderosa de comparar poblaciones e individuos. Además, los enfoques estadísticos a las cuestiones de mayor interés en el ámbito de la ecología y la genética de poblaciones a menudo requieren múltiples *loci* comparables.

Existen dos factores principales que contribuyen a los últimos avances técnicos de la ecología y genética molecular. En primer lugar, las técnicas de laboratorio se han simplificado y han bajado sus costes, lo que permite el uso de grandes cantidades de muestras y muchos *loci* ([Selkoe & Toonen, 2006](#)).

Tradicionalmente, un obstáculo importante para la utilización de microsatélites en los estudios evolutivos, ecológicos y de conservación de las especies no modelo era la necesidad de aislar un número razonable de marcadores microsatélites mediante técnicas costosas, intensivas y relativamente largas ([Hamilton et al., 1999](#); [Zane et al., 2002](#)).

En la actualidad, los métodos de *Next Generation Sequencing* (NGS) proporcionan una identificación y caracterización rápida y rentable de microsatélites de alta calidad para cualquier especie no modelo sin ningún conocimiento previo de su genoma ([Schoebel et al., 2013](#)).

Además, gracias a los programas que detectan los microsatélites *in silico*, se pueden encontrar las secuencias repetidas y diseñar *primers* adecuados para su amplificación mediante PCR ([Abdelkrim et al., 2009](#); [Gardner et al., 2011](#)). El gran número de lecturas producido en plataformas NGS también proporciona una instantánea del genoma que permite estudiar la frecuencia genómica y distribución de los tipos de repetición, proporcionando importantes conocimientos sobre el origen y evolución de los microsatélites, así como de la estructura y organización del genoma ([Tóth et al., 2000](#); [Ellergren, 2004](#); [Meqlecz et al., 2012](#)).

Entre las diferentes plataformas de NGS, la tecnología de pirosecuenciación 454 de Roche es actualmente la más utilizada para el desarrollo de microsatélites ([Gardner et al., 2011](#); [Zalapa et al., 2012](#)), ya que produce lecturas relativamente largas, más propensas a contener microsatélites incluyendo sus regiones flanqueantes, requeridas para el desarrollo exitoso de *primers*.

En segundo lugar, las mejoras en la tecnología de la computación han inspirado el uso de métodos estadísticos intensivos, los cuales tienen un mayor poder para describir la historia evolutiva de las poblaciones, así como las relaciones entre los individuos. Estos avances permiten que muchas preguntas ecológicas básicas sean abordadas

con herramientas genéticas bien por primera vez o con nuevos enfoques ([Selkoe & Toonen, 2006](#)).

Además, con el fin de abaratar todavía más los costes del análisis de microsatélites, así como de acelerar dicho proceso, en este trabajo se ha utilizado un método económico para el marcaje fluorescente de fragmentos de PCR. Normalmente, para conseguir dicho marcaje tanto el *primer forward* como el *reverse*, ambos específicos para la secuencia que queremos amplificar, deben estar marcados con algún fluorocromo. Estos colorantes fluorescentes son muy caros ([Schuelke, 2000](#)), de manera que marcar *primers* específicos para una única secuencia da lugar a un elevado coste económico, ya que serían necesarias tantas parejas de *primers* marcadas como *loci* diferentes que queremos amplificar. Por ello, se ha llevado a cabo el procedimiento explicado en el apartado de [Material y Métodos](#), gracias al cual solo es necesario utilizar un *primer* universal marcado con un colorante fluorescente y *primers reverse* específicos de las secuencias que queremos amplificar y con una secuencia universal anexa en su extremo 5'. Así, el protocolo de genotipado con el *primer* universal ofrece una alternativa económica a la utilización de *primers* marcados con colorantes fluorescentes disponibles comercialmente ([Schuelke, 2000](#)).

Para conseguir un ahorro aún mayor, se ha utilizado este método en dos PCRs *multiplex*, de manera que se analizan dos *loci* microsatélites en un único tubo de PCR y en un único gel de electroforesis, ahorrando los materiales y el tiempo necesarios en ambas técnicas. Asimismo, ambas PCR *multiplex* tienen tamaños diferentes entre sí, por lo que el análisis de fragmentos se puede realizar simultáneamente, reduciendo todavía más los costes y el tiempo necesario para el análisis.

Por otro lado, como resultado de la utilización generalizada de los microsatélites, la comprensión de su comportamiento mutacional, función, evolución y distribución en el genoma y a través de taxones está aumentando rápidamente ([Li et al., 2002](#); [Ellegren, 2004](#)). Un *locus* microsatélite normalmente varía en longitud entre 5 y 40 repeticiones, pero son posibles cadenas de repeticiones más largas. Las regiones flanqueantes generalmente se conservan en todos los individuos de la misma especie y, a veces de diferentes especies, por lo que un *locus* microsatélite particular se puede identificar a menudo por sus secuencias flanqueantes y, en ocasiones, pueden utilizarse los mismos marcadores microsatélites para distintas especies congénicas ([Selkoe & Toonen, 2006](#)).

Asimismo, como se puede observar en el apartado de [Material y Métodos](#), las técnicas basadas en el análisis de microsatélites mediante PCR permiten amplificar el marcador de interés a partir de una pequeña muestra de tejido que se conserva fácilmente para uso futuro. La estabilidad del ADN permite el uso de conservantes de tejidos simples (tales como etanol) para el almacenamiento. Por otro lado, a medida que se degrada el ADN, se fragmenta en trozos más pequeños y la posibilidad de amplificar con éxito un segmento largo es proporcional a su longitud ([Frantzen et al., 1998](#)). Debido a que los microsatélites son generalmente más cortos en longitud que los *loci* secuenciados (100-300 vs. 500-1500 pb) se pueden amplificar a pesar de que se produzca cierta degradación del ADN ([Taberlet et al., 1999](#)). Esta característica permite utilizar los microsatélites con métodos rápidos y baratos de extracción de ADN.

A pesar de sus muchas ventajas, los marcadores microsatélites presentan varios retos y dificultades que, en el mejor de los casos, complican el análisis de los datos y, en el peor, limitan en gran medida su utilidad y distorsionan su análisis. Sin embargo, la versatilidad de estos marcadores para tratar una amplia variedad de tipos de cuestiones ecológicas supera sus inconvenientes en muchas de sus aplicaciones. Afortunadamente, muchas de las dificultades comunes a los marcadores microsatélites pueden evitarse mediante una cuidadosa selección de los *loci* durante el proceso de aislamiento ([Selkoe & Toonen, 2006](#)).

Comparando los resultados obtenidos en este trabajo (*Tablas 2 y 3*) con el análisis de los microsatélites desarrollados para el camarón de agua dulce *Palaemon paucidens* por [Song et al. \(2009\)](#), observamos que en su estudio los *loci* más polimórficos son repeticiones de dinucleótidos, mientras que en el presente trabajo el *locus* con mayor número de alelos presenta repeticiones trinucleotídicas. Cabe destacar que, actualmente, los trabajos que tratan sobre el desarrollo de microsatélites en el género *Palaemon* son muy escasos, por lo que las posibilidades de comparar los resultados de este trabajo con otros estudios sobre este género son limitadas.

En cuanto al análisis de microsatélites en otras especies de decápodos, en [Teixeira et al. \(2011\)](#), donde se caracterizan *loci* microsatélites en *Rimicaris exoculata*, el *locus* con mayor número de alelos presenta repeticiones de trinucleótidos, igual que en este trabajo. Sin embargo, en [de Francisco et al. \(2009\)](#) donde se estudian las especies *Penaeus (Farfantepenaeus) brasiliensis*, *Rimapenaeus constrictus* y *Xiphopenaeus kroyeri*; en [Pereyra et al. \(2012\)](#) donde se encargan del estudio de microsatélites en *Pandalus borealis* y en [Marques et al. \(2013\)](#) donde se aportan datos sobre *Penaeus (Litopenaeus) schmitti*, *Penaeus (Farfantepenaeus) paulensis*, *Penaeus (Farfantepenaeus) brasiliensis* y *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, los *loci* más polimórficos son repeticiones de dinucleótidos, trinucleótidos o tetranucleótidos. Estos tres tipos de repeticiones son las opciones más comunes para los estudios de genética molecular y, en este trabajo en particular, se han utilizado las dos primeras. Las repeticiones de dinucleótidos representan la mayoría de los microsatélites para muchas especies ([Li et al., 2002](#)), mientras que las repeticiones de trinucleótidos y hexanucleótidos son las que aparecen con más probabilidad en las regiones codificantes, ya que no causan un desplazamiento del marco de lectura ([Tóth et al., 2000](#)). Las repeticiones de mononucleótidos son menos fiables debido a problemas con la amplificación y los tipos de repetición más largos son menos comunes, existiendo menos datos para examinar su evolución ([Li et al., 2002](#)).

En los resultados aportados por [Song et al. \(2009\)](#), [Teixeira et al. \(2011\)](#), [de Francisco et al. \(2009\)](#), [Pereyra et al. \(2012\)](#) y [Marques et al. \(2013\)](#) el rango del número de alelos por *locus* es mayor que en el presente trabajo, probablemente debido a que se testaron un mayor número de *loci*.

Por otro lado, el rango de las heterocigosidades observadas y esperadas es más amplio en estos estudios que en el presente trabajo. Además, tanto los valores mínimos como los máximos de dichas heterocigosidades son mayores que los resultados aportados por este trabajo.

En todos los estudios consultados, al menos un *locus* ([Teixeira et al., 2011](#); [Marques et al., 2013](#)) o más de uno ([Pereyra et al., 2012](#); [de Francisco et al., 2009](#); [Song et al., 2009](#)), presentan desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg. Además, del mismo modo que en el presente trabajo, estas desviaciones son causadas por el déficit de heterocigotos. Por lo tanto, parece tratarse de una tendencia común en la caracterización de marcadores microsatélites en el orden *Decapoda*.

Actualmente, los test utilizados para determinar la desviación estadísticamente significativa del equilibrio Hardy-Weinberg tienen poco poder resolutivo cuando la diversidad alélica es alta y los tamaños de muestra son moderados ([Guo & Thompson, 1992](#)). Sin embargo, el incumplimiento de dicho equilibrio no suele ser motivo para descartar un *locus* ([Selkoe & Toonen, 2006](#)).

Como se ha señalado anteriormente, en el presente trabajo la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg se debe a la considerable deficiencia de heterocigotos. Esta es la desviación más común del equilibrio Hardy-Weinberg y puede ser debida a las realidades biológicas que incumplen los criterios de una población ideal, como una fuerte endogamia o la selección a favor o en contra de un alelo determinado. Alternativamente, cuando dos grupos genéticamente distintos están inadvertidamente reunidos en una sola unidad de muestreo, ya sea porque coexisten pero rara vez se cruzan o porque la escala espacial elegida para el muestreo de un lugar es más grande que la verdadera escala de una población, habrá más homocigotos de lo esperado bajo el equilibrio Hardy-Weinberg. Este fenómeno se conoce como efecto Wahlund y puede ser una causa frecuente de déficit de heterocigotos en los estudios genéticos de poblaciones ([Johnson & Black, 1984](#); [Nielsen et al., 2003](#)). Teniendo esto en cuenta, es probable que en el caso de las poblaciones de *P. serratus* estudiadas en este trabajo se produzca el efecto Wahlund, ya que las muestras utilizadas son de lugares geográficamente separados ([Song et al., 2009](#)). Ambas causas del déficit de heterocigotos en los resultados de análisis genéticos suelen afectar a todos los *loci*, en lugar de sólo a uno o unos pocos ([Selkoe & Toonen, 2006](#)).

Otra causa común del déficit de heterocigotos en los datos obtenidos al caracterizar marcadores microsatélites, es el fracaso de la amplificación de ciertos alelos en un solo *locus*. Los alelos nulos son aquellos que fallan en la amplificación mediante PCR, ya sea porque las condiciones de PCR no son las ideales o porque la región de hibridación de los *primers* contiene mutaciones que inhiben su unión. Como resultado, algunos heterocigotos son genotipados como homocigotos y ciertos individuos pueden fallar a la hora de amplificar cualquier alelo. A menudo, las mutaciones que causan alelos nulos sólo se producen en una o unas pocas poblaciones, por lo que el déficit de heterocigotos puede no ser aparente en todas ellas.

Una forma sencilla de identificar la presencia de alelos nulos es determinar si alguno de los individuos falla repetidamente en la amplificación de cualquier alelo en un solo *locus*, mientras que todos los otros *loci* amplifican normalmente. Esto sugiere que el problema no se debe simplemente a que el ADN es de mala calidad. Si después de llevar a cabo una re-extracción de ADN y de realizar una nueva PCR todavía no amplifica ningún alelo en ese *locus*, es probable que el individuo sea homocigoto para un alelo nulo. Además, un enfoque estadístico para la identificación de alelos nulos puede hacer coincidir el patrón del exceso de homocigotos con las posibles causas

que lo producen y estimar la frecuencia de alelos nulos para cada *locus* ([Selkoe & Toonen, 2006](#)).

Rediseñar los *primers* para que se unan a una región diferente de la secuencia flanqueante o ajustar las condiciones de PCR a menudo puede mejorar los problemas de los alelos nulos ([Callen et al., 1993](#); [Pemberton et al., 1995](#)). Además, se debe tener en cuenta que las condiciones de PCR muy rigurosas, aumentan las posibilidades de alelos nulos.

Una baja incidencia de alelos nulos es, por lo general, una fuente menor de error para la mayoría de los tipos de análisis. Sin embargo, el efecto de los alelos nulos en las estimaciones de diferenciación genética permanece sin evaluar hasta la fecha. Además, para algunos análisis que requieren una gran precisión en la determinación del genotipo, tales como análisis de parentesco, los alelos nulos pueden distorsionar los resultados y aquellos *loci* con una fuerte evidencia de presentar alelos nulos deben ser excluidos ([Selkoe & Toonen, 2006](#)).

Por último, otra manera por la que los alelos se pueden perder es mediante el proceso conocido como *allelic drop-out*. Esta pérdida se produce debido a que el alelo más largo en un heterocigoto amplifica peor que el más corto y aparece demasiado débil para ser detectado en el proceso de análisis del genotipo ([Wattier et al., 1998](#)). Así, este fenómeno será más pronunciado cuando los alelos de un heterocigoto son muy diferentes en tamaño. La re-amplificación de los individuos homocigotos para alelos pequeños y aumentar la concentración de la muestra en el secuenciador de ADN es una forma de combatir esta fuente de error de genotipado ([Selkoe & Toonen, 2006](#)).

Tras confirmar la utilidad de los microsatélites analizados en este trabajo, se estima conveniente examinar la variabilidad genética de otras poblaciones. Además, también es necesario ampliar el número de *loci* estudiados, con el fin de diseñar una importante batería de microsatélites. Esto permitiría obtener datos suficientes para realizar estudios precisos de la variabilidad genética de las poblaciones, entre los que se podrían incluir, por ejemplo, la comparación de poblaciones explotadas con poblaciones en las que no se lleva a cabo la captura del camarón o análisis de parentesco.

Estos estudios contribuirían al mantenimiento y explotación sostenible de *P. serratus* con el fin de conservar la biodiversidad marina y, al mismo tiempo, los resultados obtenidos del desarrollo de estos marcadores se podrían aplicar a la determinación del mapa de ligamiento y cría del camarón. Conocer la variabilidad genética del camarón es necesario para poder mantener de una manera eficaz su tasa de capturas, así como para llevar a cabo su cultivo completo. Cabe destacar que el cultivo del camarón puede permitir el incremento de las producciones, lo que redundará en la generación de ingresos económicos, puestos de trabajo, y la optimización y buen uso de los recursos naturales.

Además, la realización de un diagnóstico previo de la variabilidad genética existente permitiría conocer el estatus genético de este recurso, aportando datos útiles para mantener dicha variabilidad y, si fuera el caso, establecer programas de control con el fin de conservar los recursos naturales y mantener el medio ambiente sano.

Así, los estudios de microsatélites en *P. serratus* y, de manera más amplia, en el género *Palaemon*, aportan datos importantes para la investigación y el conocimiento de las especies de camarón, que ayudarán al establecimiento de estrategias apropiadas para la conservación y cultivo de este género.

## 6.a. Conclusiones

Las conclusiones extraídas del presente trabajo son las siguientes:

1. El método de amplificación en una sola reacción mediante *nested* PCR utilizado para la caracterización de los *loci* microsatélites en *P. serratus* es eficaz, práctico y rentable.
2. Las PCRs *multiplex* optimizadas para los cuatro microsatélites han permitido un análisis fiable, rápido, sencillo y económico.
3. Los cuatro *loci* polimórficos estudiados son útiles para analizar la variabilidad genética de las poblaciones de *P. serratus*. Sin embargo, es necesario analizar un mayor número de marcadores microsatélites para conocer en profundidad el estatus de la variabilidad genética de este recurso marino.

## 6.b. Conclusions

The conclusions of this study are summarized here:

1. The amplification with the single-reaction nested PCR method, which was used for the characterization of microsatellite *loci* in *P. serratus*, is effective, practical and inexpensive.
2. The multiplex PCRs optimized for the four microsatellites have enabled a reliable, fast, simple and economic analysis.
3. The four studied polymorphic *loci* are useful to analyze the genetic variability of populations of *P. serratus*. However, it is necessary to analyze a greater number of microsatellite markers in order to know in depth the status of the genetic variability of this marine resource.

## 7. Referencias

- Abdelkrim, J., Robertson, B. C., Stanton, J. A. L. & Gemmell, N. J. (2009). Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques*, 46(3), 185-191.
- Bord Iascaigh Mhara (BIM), Kelly, E., Tully, O., Lehane, B. & Breathnach, S. (2008). The shrimp (*Palaemon serratus* P.) fishery: Analysis of the resource in 2003-2007. *BIM Fisheries Resource Series*, 8.
- Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Phillips, H. A., Richards, R. I., Mulley, J. C. & Sutherland, G. R. (1993). Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, 52(5), 922-927.
- Chapuis, M. P. & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), 621-631.
- de Francisco, A. K., Pinheiro, A. P., Silva, T. B. & Galetti Jr, P. M. (2009). Isolation and characterization of microsatellites in three overexploited penaeid shrimp species along the Brazilian coastline. *Conservation Genetics*, 10(3), 563-566.
- Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T. & Wilson, A. (2011). Geneious (v5.6.3), Creado por Biomatters. Disponible en <<http://www.geneious.com/>>.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5(6), 435-445.
- Fahy, E., Forrest, N., O'Toole, M., Mortimer, R. & Carroll, J. (2006). Indicators of performance in the fishery for shrimp *Palaemon serratus* (Pennant) in Irish coastal waters. *Journal of Shellfish Research*, 25(3), 1021-1026.
- Figueras, A. (1984). Biología y pesca del camarón (*Palaemon adspersus* y *P. serratus*) en la ría de Vigo. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, 177 pp.
- Forster, G. R. (1951). The biology of the common prawn, *Leander serratus* Pennant. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 30(2), 333-360.
- Frantzen, M. A. J., Silk, J. B., Ferguson, J. W. H., Wayne, R. K. & Kohn, M. H. (1998). Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology*, 7(10), 1423-1428.
- Gardner, M. G., Fitch, A. J., Bertozzi, T. & Lowe, A. J. (2011). Rise of the machines- recommendations for ecologists when using next generation sequencing for microsatellite development. *Molecular Ecology Resources*, 11(6), 1093-1101.
- González-Ortegón, E. & Cuesta, J. A. (2006). An illustrated key to species of *Palaemon* and *Palaemonetes* (Crustacea: Decapoda: Caridea) from European waters, including the alien species *Palaemon macrodactylus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 86(1), 93-102.



- Guerao, G. & Ribera, C. (1996). Locomotor activity patterns and feeding habits in the prawn *Palaemon serratus* (Pennant, 1777) (Decapoda, Palaemonidae) in the Alfacs bay, Ebro delta, Spain. *Crustaceana*, 69(1), 101-112.
- Guerao, G. & Ribera, C. (2000). Population characteristics of the prawn *Palaemon serratus* (Decapoda, Palaemonidae) in a shallow Mediterranean Bay. *Crustaceana*, 73(4), 459-468.
- Guo, S. W. & Thompson, E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48(2), 361-372.
- Haig, J., Ryan, N.M., Williams, K.F. & M.J. Kaiser (2014) A review of the *Palaemon serratus* fishery: biology, ecology & management. Bangor University, Fisheries and Conservation Report No. 38.
- Hamilton, M. B., Pincus, E. L., Di Fiore, A. & Fleischer, R. C. (1999). Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*, 27(3), 500-2, 504-7.
- Hayward, P. J. & Ryland, J. S. (Eds.). (1995, 2002 reimp.). *Handbook of the marine fauna of North-West Europe*. Oxford: Oxford University Press. Pp: 289-461
- Hedrick, P. W. (1999). Perspective: highly variable *loci* and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, 53(2), 313-318.
- Henderson, P. A., James, D. & Holmes, R. H. A. (1992). Trophic structure within the Bristol Channel: seasonality and stability in Bridgwater Bay. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 72(3), 675-690.
- Johnson, M. S. & Black, R. (1984). The Wahlund effect and the geographical scale of variation in the intertidal limpet *Siphonaria* sp. *Marine Biology*, 79(3), 295-302.
- Kelly, E., Tully, O. & Browne, R. (2012). Effects of temperature and salinity on the survival and development of larval and juvenile *Palaemon serratus* (Decapoda: Palaemonidae) from Irish waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(1), 151-161.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A. & Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11(12), 2453-2465.
- Marques, C. G., Santos, C. A., Galetti Jr, P. M. & de Freitas, P. D. (2013). Informative microsatellites for freshwater and marine shrimp species. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 5(9), 611-615.
- Megléczy, E., Nève, G., Biffin, E. & Gardner, M. G. (2012). Breakdown of phylogenetic signal: a survey of microsatellite densities in 454 shotgun sequences from 154 non model eukaryote species. *PLoS One*, 7(7), e40861.
- Nielsen, E. E., Hansen, M. M., Ruzzante, D. E., Meldrup, D. & Grønkjær, P. (2003). Evidence of a hybrid-zone in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Baltic and the

- Danish Belt Sea revealed by individual admixture analysis. *Molecular Ecology*, 12(6), 1497-1508.
- Ohashi, J. & Tokunaga, K. (2003). Power of genome-wide linkage disequilibrium testing by using microsatellite markers. *Journal of Human Genetics*, 48(9), 487-491.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537-2539.
- Pemberton, J. M., Slate, J., Bancroft, D. R. & Barrett, J. A. (1995). Nonamplifying alleles at microsatellite *loci*: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, 4(2), 249-252.
- Pereyra, R. T., Westgaard, J. I., Dahl, M., Johansen, T., Knutsen, H., Ring, A. K., Søvik G. & André, C. (2011). Isolation and characterization of nuclear microsatellite *loci* in the northern shrimp, *Pandalus borealis*. *Conservation Genetics Resources*, 4(1), 109-112.
- Perina, A., González-Tizón, A.M., Vizcaíno, A., González-Ortegón, E. & Martínez-Lage, A. (2015). Isolation and characterization of 20 polymorphic microsatellite *loci* in *Palaemon serratus* and cross-amplification in *Palaemon elegans*, *Palaemon adpersus* and *Palaemon longirostris* by 454 pyrosequencing. *Current Zoology*: enviado, pendiente de revisión.
- Plough, L. V. & Marko, P. B. (2014). Characterization of microsatellite *loci* and repeat density in the gooseneck barnacle, *Pollicipes elegans*, using Next Generation Sequencing. *Journal of Heredity*, 105(1), 136-142.
- Reeve, M. R. (1969). Growth, metamorphosis and energy conversion in the larvae of the prawn, *Palaemon serratus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 49(1), 77-96.
- Rosenberg, N. A., Li, L. M., Ward, R. & Pritchard, J. K. (2003). Informativeness of genetic markers for inference of ancestry. *The American Journal of Human Genetics*, 73(6), 1402-1422.
- Schoebel, C. N., Brodbeck, S., Buehler, D., Cornejo, C., Gajurel, J., Hartikainen, H., Keller, D., Leys, M., Říčanová, Š., Segelbacher, G., Werth S. & Csencsics, D. (2013). Lessons learned from microsatellite development for nonmodel organisms using 454 pyrosequencing. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(3), 600-611.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18(2), 233-234.
- Selkoe, K. A. & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615-629.
- Song, K. H., Jung, J. & Kim, W. (2009). Polymorphic microsatellite markers of freshwater prawn *Palaemon paucidens* (De Haan, 1844) (Crustacea: Palaemonidae). *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 418-420.

- Taberlet, P., Waits, L. P. & Luikart, G. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(8), 323-327.
- Teixeira, S., Serrão, E. A. & Arnaud-Haond, S. (2011). Characterization of 15 polymorphic microsatellite *loci* in *Rimicaris exoculata*, and cross-amplification in other hydrothermal-vent shrimp. *Conservation Genetics Resources*, 4(1), 81-84.
- Tóth, G., Gáspári, Z. & Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10(7), 967-981.
- Wang, J. & Santure, A. W. (2009). Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. *Genetics*, 181(4), 1579-1594.
- Wattier, R., Engel, C. R., Saumitou-Laprade, P. & 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(11), 1569-1573.
- Zalapa, J. E., Cuevas, H., Zhu, H., Steffan, S., Senalik, D., Zeldin, E., McCown B., Harbut R. & Simon P. (2012). Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) *loci* in the plant sciences. *American Journal of Botany*, 99(2), 193-208.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11(1), 1-16.

## Recursos web

- Arias A. M., de la Torre M. & Fijo M. I. (2013). Base de datos terminológicos y de identificación de especies pesqueras de las costas de Andalucía. Disponible en: <<http://www.ictieterm.es>>. Consulta: 12/06/15.
- Xunta de Galicia (2003). Plataforma Tecnológica da Pesca. Disponible en <<http://www.pescadegalicia.com/estadisticas.html>>. Consulta: 10/06/15.