

## AMPLIFICACIÓN CRUZADA DE MICROSATÉLITES PARA ESTUDIOS POBLACIONALES DE DOS ESPECIES DE CAMARÓN DEL GÉNERO *LITOPENAEUS* EN COLOMBIA\*

Adriana Fresneda-Rodríguez, Luis Chasqui-Velasco y David Alonso-Carvajal

Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (Invemar), Playa Salguero, El Rodadero, Santa Marta, Colombia. [adriana.fresneda@invemar.org.co](mailto:adriana.fresneda@invemar.org.co), [luis.chasqui@invemar.org.co](mailto:luis.chasqui@invemar.org.co), [david.alonso@invemar.org.co](mailto:david.alonso@invemar.org.co)

### RESUMEN

Los microsátélites son marcadores moleculares usados con frecuencia en estudios de genética de poblaciones, aunque su desarrollo es un proceso costoso y prolongado dada su elevada especificidad. Un método que permite ahorrar tiempo y dinero es la amplificación cruzada, que consiste en amplificar el ADN de una especie determinada (especie objetivo) utilizando cebadores que han sido diseñados para una especie diferente (especie fuente). Usando este método se evaluó la idoneidad de 15 loci microsátélites, desarrollados para las especies *Litopenaeus setiferus* y *L. vannamei*, para estudiar regiones microsátélites de *L. schmitti* y *L. occidentalis*. Cinco cebadores son adecuados para amplificar consistentemente microsátélites polimórficos en *L. schmitti* y cuatro en *L. occidentalis*. Los resultados muestran la utilidad de la amplificación cruzada con estos cebadores para estudios de genética poblacional de ambas especies.

**PALABRAS CLAVES:** Amplificación cruzada, marcadores moleculares, *Litopenaeus schmitti*, *Litopenaeus occidentalis*, microsátélites.

### ABSTRACT

**Microsatellite cross-amplification for population genetic studies in shrimp species of the genus *Litopenaeus* in Colombia.** Microsatellites are molecular markers frequently used in population genetic studies despite of the high cost, and long time involved in developing them, mainly due to their high specificity. One method to save money and time is cross-amplification, which is the DNA amplification of the target species using primers developed for a different species. By using cross-amplification, the suitability of 15 developed microsatellite loci from *Litopenaeus setiferus* and *L. vannamei* to amplify microsatellite regions of *L. schmitti* and *L. occidentalis* was evaluated. Five primers showed consistent amplification and were polymorphic in *L. schmitti* and four in *L. occidentalis*. These results point out the usefulness of cross-amplification with these primers for population genetics studies of both species.

**KEYWORDS:** Cross-amplification, molecular markers, *Litopenaeus schmitti*, *Litopenaeus occidentalis*, microsatellites.

\* Contribución No. 1120 del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (Invemar).

## INTRODUCCIÓN

Las especies de camarón blanco, *Litopenaeus schmitti* y *L. occidentalis*, han sido históricamente importantes pilares de la industria pesquera nacional, así como las principales fuentes de ingreso económico para miles de familias de pescadores en las costas caribe y pacífica colombianas (Espinal *et al.*, 2005). En la actualidad, como consecuencia de la sobreexplotación, el recurso camarón está en su nivel más bajo (Barreto *et al.*, 2001; Rueda *et al.*, 2006). El estudio de la estructura genética de una especie explotada permite la delimitación de stocks, así como la identificación de poblaciones vulnerables debido a una diversidad genética reducida y la definición de unidades poblacionales de manejo (Freeland, 2005). Varios tipos de marcadores moleculares como aloenzimas, RFLP, ADN mitocondrial y microsatélites han sido comúnmente usados en estudios de estructura genética (Benzie, 2000; Chu *et al.*, 2003; Gusmão *et al.*, 2005). Los microsatélites suelen considerarse como los más adecuados por ser marcadores codominantes al presentar un elevado grado de polimorfismo y poseer herencia mendeliana simple, además de que su genotipificación es automatizable (González, 2003). Estos son cadenas de ADN de secuencias simples repetidas, de longitud variable y que se distribuyen uniformemente en regiones no codificantes del genoma (Goldstein y Schlötterer, 1999). Para *L. schmitti* solo existen cinco loci microsatélites registrados en GenBank, con los cuales se ha estudiado la estructura poblacional a diferentes escalas geográficas (Espinosa *et al.*, 2001; Maggioni *et al.*, 2003; Borrell *et al.*, 2004; Luvesuto, 2006). En el caso de *L. occidentalis* no existe información genética disponible. El bajo número de microsatélites específicos para *L. schmitti* ha llevado a recurrir a la amplificación cruzada con cebadores diseñados para especies cercanas como *Litopenaeus setiferus* (Arena *et al.*, 2003), resultando en amplificaciones cruzadas exitosas (Maggioni *et al.*, 2003; Borrell *et al.*, 2004, 2007; Luvesuto, 2006). Frente a la necesidad de conocer la estructura genética poblacional de las especies de camarones de aguas someras en Colombia, en este estudio se evaluó la utilidad para amplificar loci microsatélites de *L. schmitti* y *L. occidentalis* usando cebadores de regiones microsatélites diseñados para otras especies del género *Litopenaeus*, con el fin de aumentar el *pool* de cebadores disponibles para *L. schmitti* y de poner a disposición los primeros cebadores para *L. occidentalis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio se utilizaron 162 individuos juveniles de camarón blanco del Caribe *L. schmitti* y 97 de camarón blanco del Pacífico *L. occidentalis*. Los individuos del Caribe provinieron de cuatro humedales costeros: laguna de

Navío Quebrado en La Guajira (11°25'5"N, 73°05'2"W), Ciénaga Grande de Santa Marta en el Magdalena (10°59'29"N, 74°17'34"W), bahía de Barbacoas en Bolívar (10°13'45"N, 75°32'38"W) y bahía de Cispatá en Córdoba (09°22'59"N, 75°47'37"W). Los camarones del Pacífico provinieron de la bocana del río Anchicayá en Buenaventura (03°45'02"N, 77°11'26"W) y la bocana del río Rosario en Tumaco (01°47'36"N, 78°35'20"W), en la costa colombiana. Los animales hacen parte de la colección de referencia de crustáceos del Museo de Historia Natural Marina de Colombia (MHNMC) y se encuentran preservados en etanol al 96%, lo que garantiza la integridad de su ADN.

El ADN se extrajo utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue de QIAGEN, a partir de muestras de músculo del tercer o cuarto segmento abdominal. Se realizó la verificación de la calidad y cantidad de ADN en geles de agarosa a una concentración de 0.8%, a partir de la intensidad de la fluorescencia emitida por el GelRed™ irradiado con luz UV y comparándola con el patrón de concentración del marcador de peso molecular HyperLadder™ IV (Bioline). Se utilizaron 15 cebadores específicos para regiones microsátélites de especies del género *Litopenaeus*, que se seleccionaron teniendo en cuenta el nivel de polimorfismo, la simplicidad de la unidad de repetición y el número de alelos de cada *locus*. De los 15 cebadores, cinco fueron aislados por Ball *et al.* (1998), a partir de una librería genómica de *L. setiferus* (Pse002, Pse004, Pse028, Pse035 y Pse036), tres por Cruz *et al.* (2002) para *L. vannamei* (Pvan0040, Pvan1758 y Pvan1815) y siete por Pérez *et al.* (2005) en esa misma especie (CNM-MG339, CNM-MG362, CNM-MG367, CNM-MG406, CNM-MG430, CNM-MG444 y CNM-MG494) (Tabla 1). El proceso de estandarización de la reacción de amplificación cruzada para cada *locus* partió de los protocolos descritos por esos autores (Tabla 2). La mezcla de reacción contenía 1 mM de amortiguador PCR (10X) (NH<sub>4</sub>), entre 1 y 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de cada dNTPs (Bioline), entre 0.4 y 0.5 μM del cebador desalado correspondiente, 0.2 unidades por reacción de Biolase™ DNA Polymerase, 2 μL del DNA molde y agua grado molecular hasta completar un volumen final de 13 μL. Las reacciones de amplificación fueron programadas en un termociclador Mastercycler® EP Gradient. El ajuste de la temperatura de hibridación se realizó partiendo de la registrada para *L. setiferus* (Ball *et al.*, 1998) y *L. vannamei* (Cruz *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2005). Para los cebadores de *L. setiferus* se utilizó un gradiente de temperatura entre 47 y 62 °C y para el trabajo con los cebadores de *L. vannamei* diseñados por Pérez *et al.* (2005), se realizó una modificación al protocolo inicial que consistió en eliminar el *touchdown* y adicionar un ciclo de amplificación con una temperatura de 55 °C por 30 segundos. En el caso de los cebadores evaluados por Cruz *et al.* (2002), se utilizaron temperaturas dos grados por debajo y dos grados por encima de la temperatura de hibridación para

cada cebador. Para monitorear posibles problemas por contaminación en las corridas de amplificación se incluyeron controles negativos. El proceso de comprobación de amplificación se realizó en geles de agarosa a 2.5%, con un marcador de peso molecular HyperLadder™ V (Bioline). Una vez se estandarizaron las condiciones de PCR para los *loci* con los cuales se obtuvo amplificación exitosa, se procedió a la amplificación de las regiones microsatélite con los mismos cebadores marcados con diferentes fluorocromos (6-FAM, PET, NED y VIC), para hacer posible su posterior detección en un secuenciador automático. Esta técnica de análisis de fragmentos con cebadores fluoromarcados confiere rapidez y precisión en el análisis del tamaño de los alelos; además, es menos contaminante que otras técnicas de detección como son los geles de poliacrilamida. El proceso de genotipificación automática se realizó por medio de electroforesis capilar en un analizador genético Applied Biosystems 3500, con mezclas post-amplificación de los productos de PCR obtenidos a partir de los cebadores fluoromarcados. Los electroferogramas, que son gráficos donde se registra la intensidad de la señal fluorescente para cada alelo y la estimación de su tamaño en pares de bases dependiendo del número de repeticiones, fueron analizados en el programa GeneMapper® versión 4.1 (Applied Biosystems), el cual realiza la asignación de los genotipos automáticamente a partir de la información que se le suministra sobre cada uno de los cebadores (i.e. ámbito de peso obtenido en la amplificación y medida de repetición). El tamaño de los alelos se estimó con respecto a un marcador de peso molecular GeneScan™ LIZ-600® que se agregó a cada muestra durante la electroforesis. El análisis de diversidad genética para cada *locus* se hizo con el programa GenAlEx versión 6.41 (Peakall y Smouse, 2006) y la evaluación de la presencia de alelos nulos con el programa FreeNA (Chapuis y Estoup, 2007).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 15 cebadores evaluados en *L. schmitti*, los siguientes cinco permitieron una amplificación óptima: Pse028, Pse036, CNM-MG406, CNM-MG430 y Lvan1815. Para *L. occidentalis* únicamente cuatro cebadores fueron apropiados para amplificar consistentemente microsatélites, estos son: Pse004, Pse036, Lvan1815 y CNM-MG406. Los cebadores Pse004 y CNM-MG367 fueron adecuados para que la ADN polimerasa amplificara regiones monomórficas en ambas especies (i.e. presentaron un solo alelo) y el cebador CNM-MG494 llevó a generar un patrón de bandas nucleotídicas que no permitió su lectura. El resto de los cebadores (Pse002, Pse035, CNM-MG339, CNM-MG362, CNM-MG444, Pvan0040, Pvan1758) no favorecieron el inicio de la elongación de ADN de ninguna de las dos especies estudiadas.

**Tabla 1.** Secuencia de cebadores y sus repeticiones de 15 *loci* microsátélites utilizados en amplificación cruzada en *Litopenaeus schmitti* y *L. occidentalis*.

Especie	Locus	Repeticiones	Secuencia cebador (5'-3')	No. acceso GenBank	Referencia
<i>L. setiferus</i>	Pse002	(CA)5	Derecho: CTGAAATACAACCACTTTGC Izquierdo: CGGGATTCGTGTTGAGGG	AF047356	Ball <i>et al.</i> (1998)
<i>L. setiferus</i>	Pse004	(GT)45AT (GT)17	Derecho: GATCAGTGACTCTGCAAAAG Izquierdo: CGTTCAGATTGTCAACTTCCGCG	AF047357	Ball <i>et al.</i> (1998)
<i>L. setiferus</i>	Pse028	(AC)24	Derecho: GATCCTTCTAGCTAAAATGGG Izquierdo: GATCGAAGGTAAACTTTATTATC	AF047359	Ball <i>et al.</i> (1998)
<i>L. setiferus</i>	Pse035	(GT)58	Derecho: CACGTGAGGGACAAGAGCATTTG Izquierdo: CTTTCATACTCACGCTAACCAATTTG	AF047360	Ball <i>et al.</i> (1998)
<i>L. setiferus</i>	Pse036	(CA)30	Derecho: GACTTTGTATTTTCATAAACGCTG Izquierdo: CGCTATATTTTCGCAGTAAAGGCTAC	AF047361	Ball <i>et al.</i> (1998)
<i>L. vannamei</i>	CNM-MG339	(ACAAA)4	Derecho: AAACAACAATTTGCAGTTC Izquierdo: AAGGTCAGATTTCCAG	_____	Pérez <i>et al.</i> (2005)
<i>L. vannamei</i>	CNM-MG362	(AAAAC)AAA (AAAAC)2	Derecho: TACTTGGACCTCAGTCA Izquierdo: GCACGCTTAGTCTCAA	_____	Pérez <i>et al.</i> (2005)
<i>L. vannamei</i>	CNM-MG367	(ATTT)4	Derecho: AAACCACTGACCATC Izquierdo: CTGTGCCAAATTCAAAGC	_____	Pérez <i>et al.</i> (2005)
<i>L. vannamei</i>	CNM-MG406	(GA)18	Derecho: GATAAAGAAGCGAGAACG Izquierdo: CTATGGCTAGATCCGAGA	_____	Pérez <i>et al.</i> (2005)
<i>L. vannamei</i>	CNM-MG430	(CT)3CAATT (CT)6 CA (CT)5	Derecho: GGGAAGCCCAAATAAGA Izquierdo: AAAGAAAGGAAAGGGATAC	_____	Pérez <i>et al.</i> (2005)
<i>L. vannamei</i>	CNM-MG444	(GTT)4	Derecho: CGTACAAGGCATTGGG	_____	Pérez <i>et al.</i> (2005)

Continuación de Tabla 1.

Especie	Locus	Repeticiones	Secuencia cebador (5'-3')	No. acceso GenBank	Referencia
<i>L. vannamei</i>	CNM-MG494	(AC)5 AG(AC)2 ATGG (AC)(ACGC)3	Izquierdo: GCATCTACTTTGACGCACCT	_____	Pérez <i>et al.</i> (2005)
			Derecho: ACCACTGACTCCACAG		Pérez <i>et al.</i> (2005)
<i>L. vannamei</i>	Pvan0040	(GAAA)8	Izquierdo: CAGGGTCAAAGCAAGA	AY062926	Cruz <i>et al.</i> (2002)
			Derecho: TTTACGATCAGATTGTTT		
<i>L. vannamei</i>	Pvan1758	(T)10 (TC)7 ... (T)4(TC)4	Izquierdo: GAAATAGAAAATAAAGAAC	AY062928	Cruz <i>et al.</i> (2002)
			Derecho: TATGCTGTTCTTTGCTT		
<i>L. vannamei</i>	Pvan1815	(T)7(CT)2(CTTT)4 ... (CT)6	Izquierdo: GAAATAGAAAATAAAGAAC	AY062925	Cruz <i>et al.</i> (2002)
			Derecho: GATCAITTCGCCCTCTTTTT		
			Izquierdo: ATCTACGGTTTCGAGAGCAGA		

**Tabla 2.** Condiciones y resultados de amplificación cruzada de cinco *loci* microsatélites en el camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. Ball *et al.* (1998)ii; Cruz *et al.* (2002)\*\*; Borrell *et al.* (2004); Pérez *et al.* (2005)\*. Ta = Temperatura de hibridación; N = Número de individuos; Na = Número de alelos; H<sub>o</sub> = Heterocigosidad observada; H<sub>e</sub> = Heterocigosidad esperada.

Locus	Ta (°C)	N	Na	Ámbito de tamaño (pb) en este estudio		Ámbito de tamaño (pb) <i>L. schmitti</i>		Ámbito de tamaño (pb) <i>L. vannamei</i>		H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>
				<i>L. schmitti</i>	<i>L. vannamei</i>	<i>L. schmitti</i>	<i>L. vannamei</i>	<i>L. schmitti</i>	<i>L. vannamei</i>		
Pse028	50	161	37	145-215	146-258i	136-264ii			0.94	0.94	
Pse036	50	160	19	122-158	134-176i	105-161ii			0.87	0.89	
CNM-MG406	43	160	21	318-358			318-354*	333-363*	0.84	0.89	
CNM-MG430	43	159	9	181-199			187-221*		0.58	0.75	
Pvan1815	56	159	5	141-146			187-221***		0.40	0.55	

Todos los cebadores que favorecieron la amplificación de los fragmentos de ADN fueron polimórficos, presentaron un tamaño alélico entre 97 pb hasta 358 pb y un promedio de  $18 \pm 10$  alelos/*locus* (rango entre 5 a 37) (Tablas 2 y 3). Los cebadores Pse028 y Pse036 presentaron un número alto de alelos y un bajo número de alelos nulos, además de tener una secuencia repetida perfecta, por lo que pueden ser considerados como buenos marcadores en estudios de genética de poblaciones de estas especies de camarones.

**Tabla 3.** Condiciones y resultados de amplificación cruzada de cuatro *loci* microsatélites en el camarón blanco *Litopenaeus occidentalis*. Ball *et al.* (1998)<sub>j</sub>; Cruz *et al.* (2002)\*; Pérez *et al.* (2005)\*\*. Ta = Temperatura de hibridación; N = Número de individuos; Na = Número de alelos; H<sub>O</sub> = Heterocigosidad observada; H<sub>E</sub> = Heterocigosidad esperada.

<i>Locus</i>	Ta (°C)	N	Na	Ámbito de tamaño (pb) en este estudio	Ámbito de tamaño (pb) <i>L. vannamei</i>	Ámbito de tamaño (pb) <i>L. stylirostris</i>	Ámbito de tamaño (pb) <i>L. setiferus</i>	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>
Pse004	50	91	14	107-135			160-210 <sub>i</sub>	0.634	0.842
Pse036	50	90	18	97-131			105-161 <sub>i</sub>	0.675	0.797
Lvan1815	56	92	9	111-129	187-221*			0.431	0.692
CNM-MG406	43	92	31	295-355	318-354**	333-363**		0.843	0.938

Se observó un déficit de heterocigotos para los microsatélites CNM-MG430 (H<sub>O</sub> 0.58, H<sub>E</sub> 0.75) y Lvan1815 (H<sub>O</sub> 0.43, H<sub>E</sub> 0.69) (Tablas 2 y 3), que puede ser explicado por la presencia de alelos nulos. Los alelos nulos se presentan cuando existe una mutación en la secuencia nucleotídica adyacente a los microsatélites, impidiendo que los cebadores se unan a la secuencia molde (Chapuis y Estoup, 2007). A diferencia del alelo ausente la ocurrencia del alelo nulo no se da al azar, lo que se obtiene es una falta de consistencia en la amplificación.

Este estudio demuestra la factibilidad del uso de la amplificación cruzada de microsatélites en las especies de camarones de aguas someras *L. schmitti* y *L. occidentalis*, realizada con cebadores desarrollados para otras especies del género *Litopenaeus*. La amplificación cruzada de regiones microsatélites es una técnica que ha sido usada con éxito en diferentes grupos (Bourret *et al.*, 2008; Landínez-García *et al.*, 2009; Shamblin *et al.*, 2009) y que permite ahorrar tiempo y dinero al obviar el desarrollo de librerías genómicas. La comprobación de la utilidad de los cebadores heterólogos que amplificaron en *L. schmitti*, aumenta el banco de *loci* microsatélites disponibles para estudios poblacionales de esa especie. En el caso de *L. occidentalis*, este es el primer estudio donde se registran cebadores de *loci* microsatélites de utilidad para trabajos en genética de poblaciones.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio se realizó en el marco del proyecto “Identificación de humedales prioritarios para la protección de los estadios tempranos de vida del camarón de aguas someras en Colombia desde una perspectiva ecogenética”, desarrollado por el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (Invemar) y contó con la cofinanciación de Ecopetrol S. A., a través del convenio de colaboración DHS No. 133-09. Agradecemos al Museo de Historia Natural Marina de Colombia por el suministro de los tejidos utilizados en este estudio. También agradecemos el apoyo de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano sede Santa Marta, la Universidad del Magdalena y el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia por el préstamo de equipos. Agradecemos a Giomar Borrero, por aportar sugerencias valiosas para solucionar situaciones durante este trabajo, así como a los revisores y editores anónimos que contribuyeron con sus comentarios a mejorar el documento.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arena, L., M. Montalvan, G. Espinosa, G. Gaxiola, A. Sánchez, A. Van Wormhoudt, D. Hernández, R. Díaz y C. Rosas. 2003. Genetic relationship between *Litopenaeus setiferus* (L.) and *L. schmitti* (Burkenroad) determined by using 16S mitochondrial sequences and enzymatic analysis. *Aquacult. Res.*, 34: 981-990.
- Ball, A. O., S. Leonard y R. W. Chapman. 1998. Characterization of (GT)<sub>n</sub> microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Mol. Ecol.*, 7: 1247-1263.
- Barreto, C. G., G. A. Polo y B. Mancilla. 2001. Análisis biológico pesquero y económico de la fauna acompañante en la pesquería de arrastre industrial colombiana: 234-270. En: FAO (Ed.). *Tropical shrimp fisheries and their impact on living resources. Shrimp fisheries in Asia: Bangladesh, Indonesia and the Philippines; in the Near East: Bahrain and Iran; in Africa: Cameroon, Nigeria and the United Republic of Tanzania; in Latin America: Colombia, Costa Rica, Cuba, Trinidad and Tobago, and Venezuela.* FAO Fish. Circ., 974, Roma. 378 p.
- Benzie, J. A. 2000. Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquacult. Res.*, 31: 95-119.
- Borrell, Y., G. Espinosa, J. Romo, G. Blanco, E. Vázquez y J. A. Sánchez. 2004. DNA microsatellite variability and genetic differentiation among natural populations of the Cuban white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Mar. Biol.*, 144: 327-333.
- Borrell, Y. J., F. Arenal, Z. M. Mbemba, O. Santana, R. Díaz-Fernández, E. Vázquez, G. Blanco, J. A. Sánchez y G. Espinosa. 2007. Spatial and temporal genetic analysis of the Cuban white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) schmitti*. *Aquaculture*, 272 (1): 125-138.
- Bourret, V., M. Macé, M. Bonhomme y B. Crouau-Roy. 2008. Microsatellites in cetaceans: An overview. *Open Mar. Biol. J.*, 2: 38-42.
- Chapuis, M. P. y A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.*, 24 (3): 621-631.

- Chu, K. H., C. P. Li, Y. K. Tam y S. Lavery. 2003. Application of mitochondrial control region in population genetic studies of the shrimp *Penaeus*. *Mol. Ecol. Notes*, 3: 120-122.
- Cruz, P., C. H. Mejía-Ruiz, R. Pérez-Enríquez y A. M. Ibarra. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Mol. Ecol. Notes*, 2 (3): 239-241.
- Espinal, G., H. J. Martínez y F. A. González. 2005. La cadena del camarón de pesca en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No. 71, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Observatorio Agro cadenas Colombia. Bogotá. 12 p.
- Espinosa, G., M. Jager, E. García-Machado, Y. Borrell, N. Corona, A. Robainas y J. Deutsch. 2001. Microsatellites from the white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Decapoda). *Biotechnol. Apl.*, 18: 232-234.
- Freeland, J. R. 2005. *Molecular ecology*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, Inglaterra. 388 p.
- Goldstein, D. B. y C. Schlötterer. 1999. *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press, Nueva York. 352 p.
- González, E. G. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59 (2-3): 377-388.
- Gusmão, J., C. Lazoski y A. M. Solé-Cava. 2005. Population genetic structure of Brazilian shrimp species (*Farfantepenaeus* sp., *F. brasiliensis*, *F. paulensis* y *Litopenaeus schmitti*: Decapoda: Penaeidae). *Gen. Mol. Biol.*, 28 (1): 165-171.
- Landfnez-García, R. M., S. P. Ospina-Guerrero, D. J. Rodríguez-Castro, R. Arango y E. Márquez. 2009. Genetic analysis of *Lutjanus synagris* populations in the Colombian Caribbean. *Cienc. Mar.*, 35 (4): 321-331.
- Luvesuto, E. 2006. Análise genética e morfométrica da estrutura populacional do camarão branco *Litopenaeus schmitti* (Decapoda, Crustacea) na costa do Rio Grande do Norte, Brasil: uma abordagem em fina escala. *Disertación de Maestría Universidad Federal de São Carlos. São Carlos, Brasil. 75 p.*
- Maggioni, R., A. D. Rogers y N. Maclean. 2003. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. *Mol. Ecol.*, 12: 3213-3217.
- Peakall, R. y P. E. Smouse. 2006. GenAIE version 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*, 6: 288-295.
- Pérez, F., J. Ortiz, M. Zhinaula, C. Gonzabay, J. Calderón y F. Volckaert. 2005. Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus birdy*. *Mar. Biotech.*, 7: 554-569.
- Rueda, M., J. A. Angulo, N. Madrid, F. Rico y A. Girón. 2006. La pesca industrial de arrastre de camarón en aguas someras del Pacífico colombiano: su evolución, problemática y perspectivas hacia una pesca responsable. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (Invemar), Santa Marta. 60 p.
- Shamblin, B. M., B. C. Faircloth, M. G. Dodd, D. A. Bagley, L. M. Ehrhart, P. H. Dutton, A. Frey y C. J. Nairn. 2009. Tetranucleotide markers from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) and their cross-amplification in other marine turtle species. *Cons. Gen.*, 10 (3): 577-580.