

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Acuicultura	1
1.1.1 Enfermedades bacterianas	1
1.2. Probióticos	2
1.2.1 <i>Lactococcus lactis</i> BOP1-8	3
1.3. <i>Next-Generation Sequencing</i>	4
1.3.1 Bibliotecas de secuenciación	4
1.3.2 Ensamble	6
1.3.3 Anotación	7
2. HIPOTESIS	8
3. OBJETIVOS	8
3.1. Objetivo General	8
3.2. Objetivos Específicos	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1. Materiales	9
4.1.1 Muestras biológicas y material de laboratorio	9
4.1.2 Secuenciación	9
4.1.3 <i>Hardware</i>	10
4.1.4 Ensamble de lecturas	11
4.1.5 Generación y ordenamiento de <i>scaffolds</i>	12
4.1.6 Formato de anotación	12
4.1.7 Predicción de marcos abiertos de lectura	12
4.1.8 Anotación de regiones codificantes	13
4.1.9 Predicción de promotores	13
4.1.10 Predicción de genes ribosomales	14

4.1.11	Predicción de regiones repetitivas	14
4.1.12	Otras herramientas	14
4.2.	Métodos	15
4.2.1	Cultivo de BOP1-8 y extracción de ADN	15
4.2.2	Extracción de los datos	17
4.2.3	Sub-muestreo del set de datos	17
4.2.4	Ensamble de las lecturas	19
4.2.5	Generación y ordenamiento de <i>scaffolds</i>	20
4.2.6	Predicción de marcos abiertos de lectura	21
4.2.7	Anotación de regiones codificantes	21
4.2.8	Predicción y anotación de promotores	22
4.2.9	Predicción y anotación de genes ribosomales	23
4.2.10	Predicción y anotación regiones repetitivas	23
4.2.11	Definición de relaciones entre anotaciones	23
5.	RESULTADOS	26
5.1.	Extracción de ADN para secuenciar	26
5.2.	Sub-muestreo de lecturas	28
5.3.	Ensamble de lecturas	29
5.4.	Generación y ordenamiento de <i>scaffolds</i>	30
5.5.	Anotación del regiones codificantes	31
5.6.	Anotación de promotores	31
5.7.	Anotación de genes ribosomales	31
5.9.	Búsqueda de genes con posible participación en la actividad probiótica de BOP1-8	32
6.	DISCUSIÓN	34
6.1.	Contribuciones a la nutrición-digestión	34
6.2.	Efectos sobre la respuesta inmune innata	36
7.	CONCLUSIONES	41
8.	REFERENCIAS	42
ANEXOS		2
A.	<i>sub-sampler.pl</i>	2
B.	<i>fastqPEsplitter.pl</i>	2
C.	<i>predict2coord.pl</i>	2

D. CDSAnnotator.pl	3
E. get_upstream_region.pl	10
F. pepper2gff.pl	3
G. generate_final_gff.pl	5

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I Características del computador utilizado para realizar el proyecto	11
Tabla II Descripción de los términos utilizados durante la jerarquización	24
Tabla III Mediciones de absorbancia de las muestras de ADN genómico de BOP1-8.	27
Tabla IV 25 regiones con mayor cantidad de secuencias repetidas	32
Tabla V Putativos productos proteicos correspondientes a los CDS que podrían tener relación con la actividad probiótica de BOP1-8.	33
Tabla VI Ensayos de actividad enzimática y efecto sobre patógenos en diversas cepas bacterianas de la microbiota de salmónidos. Patógenos: <i>Vibrio ordalii</i> (Vo), <i>Lactococcus piscium</i> (Lp), <i>Aeromonas salmonicida</i> (Ae), <i>Yersinia ruckeri</i> (Ye), <i>Flavobacterium psychrophilum</i> (FL CSF y T23), <i>Piscirickettsia salmonis</i> (PS PS-01).	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de la creación de bibliotecas de segmentos pareados. (A) Fragmento de ADN; (B) Ligación de adaptadores de circularización (A.C.); (C) Circularización del fragmento de ADN; (D) Degradación parcial, presencia de adaptador interno (A.I.); (E) Ligación de adaptadores de secuenciación; (F) secuenciación. Adaptado de <i>Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics</i> . Berglund y col., (2011).	5
Figura 2 Diagrama que muestra la utilidad de las bibliotecas de segmentos pareados	6
Figura 3 Niveles de anotación. Adaptado desde " <i>Genome annotation: from sequence to biology. Nature reviews genetics</i> " de Stein, L. (2001).	Error! Bookmark not defined.
Figura 4 Distribución de largos de lecturas. (A) Biblioteca de segmentos pareados. (B) Biblioteca de fragmentos	10
Figura 5 Diagrama de flujo que muestra de manera general la metodología utilizada en esta tesis. Los procesos en azul son los programas de terceros utilizados; los en verde corresponden a scripts que debieron ser escritos durante el desarrollo del proyecto.	16
Figura 6 Relaciones entre términos involucrados según <i>SequenceOntology Part-Of relationships</i> . Versión simplificada y adaptada a este caso.	25
Figura 7 Gel de poliacrilamida correspondiente a la amplificación por PCR del gen 16S.	26
Figura 8 (A) Gel de poliacrilamida correspondiente al RFLP con <i>AluI</i> realizado sobre el ADN extraído de BOP1-8. (B) Patrón de bandas de referencia registrado con anterioridad.	27
Figura 9 Gráfico que muestra la relación, en cuanto a cantidad de lecturas refiere, entre el set de datos iniciales (300X) y el set de datos una vez realizado el sub-muestreo (100X).	28
Figura 10 Gráfico que muestra la relación, en cuanto a cantidad de bases refiere, entre el set de datos iniciales (300X) y el set de datos una vez realizado el sub-muestreo (100X).	29
Figura 12 Gráfico que muestra la distribución, en cuanto a largo y <i>depth of coverage</i> para los <i>contigs</i> normales y los de secuencias repetitivas.	30
Figura 13 Expresión relativa de genes asociados al sistema inmune innato de peces cebra axénicos sometidos a monoasociación con BOP1-8. Gen 18s como referencia.	37
Figura 14 Grafico de segmentos pareados. Los puntos azules indican una conexión entre dos <i>contigs</i> según la información de segmentos pareados.	39
Figura 15 (A) Dominios encontrados en la lectina predicha como <i>Mucus-Bindin protein</i> . (B) Dominios predichos en la adhesina a colágeno. Ambas encontradas en el genoma de BOP1-8	40