



Primera identificación molecular del transgen de la proteína fluorescente roja (RFP) en peces Cebra (*Danio rerio*) transgénicos ornamentales introducidos en el Perú

First molecular identification of the transgene red fluorescent protein (RFP) in transgenic ornamental zebrafish (*Danio rerio*) introduced in Peru

Carlos Scotto^{1,*}, Fernando Serna²

¹ Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad Nacional Federico Villarreal. Jirón Río Chepén s/n. El Agustino. Lima. Perú.

² Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del INIA. Av. La Molina No. 1981. Apartado Postal 2791. La Molina. Lima. Perú.

Recibido 06 Agosto 2013, Aceptado 07 septiembre 2013.

Resumen

En el presente trabajo se identificó por primera vez peces Cebra transgénicos (*Danio rerio*) fluorescentes de color rojo, naranja y rosado introducidos al territorio peruano de acuarios locales utilizando la técnica de PCR para amplificar el transgen RFP perteneciente a la anémona marina *Discosoma spp.* Se encontró una expresión génica diferencial del transgen de la proteína fluorescente roja (RFP) que determinaría una gradiente de bioluminiscencia para cada color entre los peces OVM analizados. Se realizó un análisis de secuencias de las dos variantes de la RFP junto con las seis variantes de la GFP de proteínas fluorescentes existentes en el Genbank que podrían ayudar a identificar rápidamente si son nuevos genes o si son nuevas variantes de éstas proteínas fluorescentes y que podrían ser utilizadas en otros OVMs hidrobiológicos a futuro. De este modo, desarrollar y optimizar las medidas de bioseguridad mediante su oportuna detección a nivel genético molecular.

Palabras clave: Fluorescencia, FRP (Proteína Fluorescente Roja), pez Cebra, Transgénico, OVM (Organismo Vivo Modificado), PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Abstract

In this paper the transgenic fluorescent red, orange and pink zebra fish (*Danio rerio*), found in local aquariums in Peru, were identified using the PCR technique to amplify the transgene RFP sea anemone belonging to *Discosoma spp.* The gene expression of the red fluorescent protein (RFP) transgene was found to determine different gradients-of-bioluminescence (shades in color) in each GMO fish analyzed. We performed sequence analysis of the two variants of the RFP along with six variants of the existing fluorescent protein GFP from the Genbank, this could help identify quickly if they are new genes or variants thereof as these novel fluorescent proteins may be introduced in aquatic GMO in the future. Thus, developing and improving biosecurity measures through its timely detection at the molecular genetic level.

Keywords: Fluorescence, RFP (Red Fluorescent Protein), Zebrafish, Transgenic, LMO (Living Modified Organisms), PCR (Polymerase chain reaction)

1. Introducción

A principios del año 2000 se produjeron los primeros peces ornamentales fluorescentes transgénicos en países de Lejano Oriente como Taiwan y Singapur (Gong *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2002). En el año 2003, Gong *et al.* (2003) obtuvo los

primeros peces Cebra (*Danio rerio*) fluorescentes mediante la inserción de transgenes de proteínas fluorescentes en el músculo del animal. La técnica para la obtención de éstos OVMs (Organismos vivos modificados) de origen hidrobiológico consistió en la introducción de

* Autor para correspondencia

Email: carlosscotto@yahoo.com (C. Scotto)

genes que producen proteínas de color verde (GFP = Green Protein Fluorescent), de color rojo (RFP = Red Protein Fluorescent) y otros colores fluorescentes (Chung, 2006). Los cuales fueron extraídos primero de la medusa abisal (*Aequorea victoria*) (Amsterdam *et al.*, 1995; Tsien, 1998) y luego de la anémona de mar o actínido (*Anemonia majano*) (Matz *et al.*, 1999; Verkhusha y Lukyanov, 2004) y otros organismos marinos (Tanaka *et al.*, 2001; Wiedenmann *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2003; Shaner *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2008). En el año 2006 se identificó el primer movimiento transfronterizo de peces Cebra (*Danio rerio*) fluorescentes al territorio peruano (Scotto, 2011). Y posteriormente, se logró su reproducción y su hibridación en condiciones confinadas en el laboratorio (Scotto, 2012).

Actualmente en el Perú, posee una Ley de Moratoria que regula el ingreso de los OVMs (Ley N° 29811, 2011). Por lo que existe una creciente preocupación ante la falta de un análisis de riesgos pertinente por la introducción, reproducción e hibridación (flujo génico) descontrolada de éstos peces modificados genéticamente en sus colores corporales por la acción de transgenes de organismos marinos invertebrados (Ley N° 27104, 1999).

Hoy comercialmente se tiene en el mercado local y nacional peruano peces ornamentales con una gama colorimétrica que va desde el color rojo, pasando por el naranja hasta el rosado producida por transgenes de anémona de mar que producen una proteína fluorescente roja (PFR) dándole a los peces un color brillante a simple vista. Y que en condiciones de oscuridad origina una fluorescencia con la luz UV (longitud de onda de menos de 400nm) o con la luz actínica azul (longitud de onda entre 400 a 500nm) (Scotto, 2011).

El objetivo principal del presente trabajo fue identificar la presencia del transgen RFP perteneciente a la anémona marina del género *Discosoma* por PCR en los peces

Cebra transgénicos introducidos al territorio peruano y existentes actualmente en los acuarios locales. Así mismo, detectar si éstos peces Cebra fluorescentes de color rojo, naranja y rosado son producidos por distintos transgenes independientemente o son el producto de una expresión génica diferencial del transgen de la proteína fluorescente roja (PFR) que determinaría una gama de bioluminiscencia para cada color entre los peces OVM analizados. Finalmente, se realizó un análisis comparativo de las secuencias virtuales de los dos genes de la FRP junto con los seis genes de la GFP de proteínas fluorescentes existentes en el Genbank. Con el objetivo de poder obtener información molecular que podría ayudar a diseñar cebadores específicos para identificar nuevos transgenes de proteínas fluorescentes o sus variantes en otros OVMs hidrobiológicos. Y a futuro ser potencialmente utilizados para la detección y control de un movimiento transfronterizo no permitido o para el monitoreo en condiciones confinadas o para comprobar la existencia y la magnitud de los efectos adversos sobre el medio ambiente provocados por la liberación accidental o provocada de éstos u otros OVMs hidrobiológicos dentro de un análisis de riesgos pertinentes.

2. Material y Métodos

Muestra biológica

Se trabajaron con peces cebra vivos obtenidos de acuarios locales y del Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la UNFV (Lima), presumiéndose experimentalmente que eran peces genéticamente modificados, debido a su inusual coloración a luz visible natural que iba desde el color rojo, pasando por el color naranja hasta el color rosado (Figura 1).

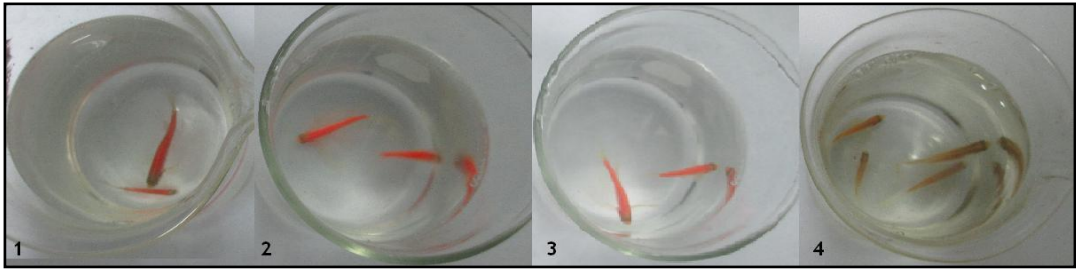


Figura 1. Peces Cebra analizados con luz natural: 1 = Pez de color rojo transgénico; 2 = Pez de color naranja transgénico; 3 = Pez de color rosado transgénico; 4 = Pez silvestre sin fluorescencia no transgénico (Control -).

Identificación con luz UV de la fluorescencia de la muestra biológica

Una confirmación inicial de la presencia de fluorescencia se dio cuando se expuso cada animal ante la luz ultravioleta de un transiluminador de menos de 400 nm de longitud de onda. Los peces expuestos presentaron la fluorescencia respectiva, confirmándose cualitativamente la transgénesis del OVM de color rosado, naranja y rojo. Como control negativo se utilizaron peces cebras silvestres, los cuales no poseían ninguna fluorescencia o coloración llamativa con la luz ultravioleta (Figura 2).

Extracción de ADN de tejido

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue Kit de Qiagen y para lo cual se utilizó parte del musculo dorsal del pez. Con la ayuda de un escarpelo se cortó el tejido muscular (aproximadamente 100mg a 200mg). El tejido muscular colectado cual fue colocado en un tubo eppendorff de 1.5ml

estéril, donde inmediatamente se procesó con el kit mencionado. Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1% para observar la calidad del ADN extraído, luego se cuantificó por espectrofotometría obteniendo concentraciones de 90 a 170 ng/ul (Figura 3). Cada muestra fue diluida a una concentración de 20ng/ul para las pruebas moleculares posteriores.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Para determinar la presencia del posible transgen dRFP483, se sintetizaron cebadores específicos para dicho gen tomando como referencia la pareja de cebadores reportado por Rehbein y Bogerd (2007) con las siguientes secuencias:

Rerio 2206: 5'-
ACAACACCGTGAAGCTGAAGGTGAC
CAAG-3' y
Rerio 2207: 5'-
GGTGTAGTCCTCGTTGTGGGAGGTG
ATGTC-3'.

Las cuales presentaron un producto de amplificación de 505 pb.

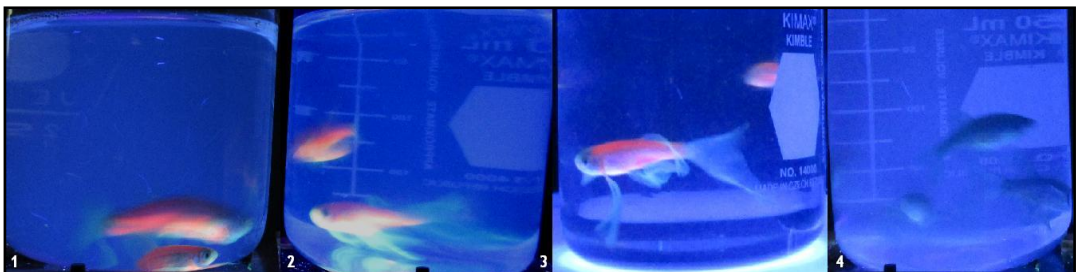


Figura 2. Peces Cebra analizados con luz ultravioleta (400nm): 1 = Pez de color rojo transgénico; 2 = Pez de color naranja transgénico; 3 = Pez de color rosado transgénico; 4 = Pez sin fluorescencia no transgénico (Control -).

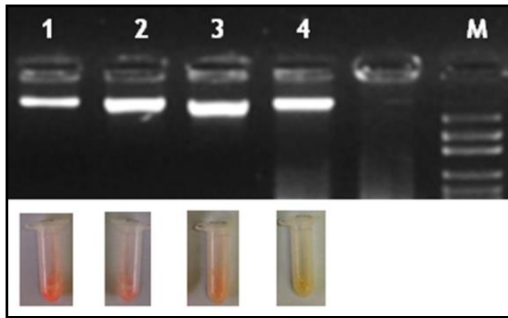


Figura 3. Corrida electroforética de las muestras de la extracción del ADN del tejido muscular en peces Cebras (Concentración promedio de 170 ng/ul): 1: pez de color rojo transgénico; 2: pez de color naranja transgénico; 3: pez de color rosado transgénico; 4: pez sin fluorescencia no transgénico (Control -); M: Marcador de peso molecular de 100pb.

Se trabajó con una concentración de 40ng/ul de cada muestra, 1um para los primers, 2um de MgCl₂, 2,5 de dNTPs y 0,05u/ul de Taq HotStar de Qiagen. Las condiciones de ciclaje para el PCR fueron las siguientes: Activación inicial de 15 minutos a 95°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 64°C y minuto a 72°C seguido por una extensión final de 10 minutos a 72°C.

El producto amplificado fue analizado mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb de Fermentas® (Figura 4).

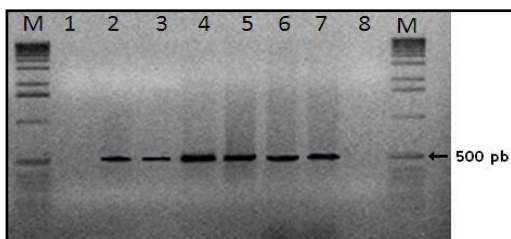


Figura 4. Corrida electroforética del amplificado del gen RFP en peces Cebras transgénicos fluorescentes. 1 = Pez de sin fluorescencia no transgénico (Control -); 2, 3 = Pez de color rosado transgénico; 4, 5 = Pez de color naranja transgénico; 6, 7 = Pez de color rojo transgénico; 8 = Sin muestra (Control -). M = Marcador de peso molecular de 100pb.

Obtención y análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos y nucleotídicas de las proteínas fluorescentes en OVM hidrobiológicos

Se obtuvo del UniProtKB (2013) y del Genbank (2013) las secuencias de aminoácidos y nucleotídica de las proteínas fluorescentes de ocho organismos marinos como fueron: La GFP506 y la GFP538 del coral verde (*Zoanthus sp.*), la GFP484 del coral trébol (*Clavularia sp.*), la GFP483 del coral hongo estriado (*Discosoma striata*), la GFP509 de la medusa abisal (*Aequorea victoria*), la GFP486 de la anémona de mar (*Anemonia manjano*), la dRFP483 de la anémona de mar (*Discosoma sp.*) y la eqRFP611 de la anémona burbuja (*Entacmea quadricolor*) (Tabla 1).

Para las ocho especies de organismos marinos se buscó la secuencia de consenso y se editó las secuencias con el programa BioEdit (Hall, 1999). Luego se alinearon las secuencias con el Programa Clustal X (Jeanmougin *et al.*, 1998) y se construyeron los árboles filogenéticos tentativos utilizándose el Programa Mega 3,0 (Kumar *et al.*, 2008).

3. Resultados y discusión

Se logro extraer el DNA y la amplificación el transgen de la proteína fluorescente roja (dRFP483) en peces transgénicos ornamentales introducidos y existentes en los acuarios en territorio peruano (Figuras 1 y 2). Por lo tanto, se comprobó molecularmente que éstos peces cebras fluorescentes de colores rojo, naranja y rosado ante la luz visible fluorescente y ante la luz ultravioleta/actínica, poseen incorporado un gen de la proteína fluorescente roja (RFP) incorporado en su genoma que produce artificialmente este rasgo de “brillantes” coincidiendo con los reportes de otras partes del Mundo (Gong *et al.*, 2003; Chung, 2006; Rehbein y Bogerd, 2007; Scotto, 2011). El producto amplificado tuvo un peso de 505 pares de bases acorde con los reportes de Rehbein y Bogerd (2007) y Bielikova *et al.* (2012).

Tabla 1

Lista de las ocho proteínas fluorescentes (RFP y GFP) reportados en UniProt (2013) extraídas de diferentes organismos hidrobiológicos marinos

*Número de Acceso	Proteína fluorescente	Nombre del Organismo
Q9U6Y5	GFP506	<i>Zoanthus sp.</i>
Q9U6Y4	GFP538	<i>Zoanthus sp.</i>
Q9U6Y3	GFP484	<i>Clavularia sp.</i>
Q9U6Y7	GFP483	<i>Discosoma striata</i>
P42212	GFP509	<i>Aequorea victoria</i>
Q9U6Y6	GFP486	<i>Anemonia manjano</i>
Q9U6Y8	dRFP583	<i>Discosoma sp.</i>
Q8ISF8	RFP611	<i>Entacmea quadricolor</i>

(*) = Disponible en UniProtKB (2013).

Por otro lado, los colores que predomina en los peces Cebrá de los acuarios locales del Perú son los colores rojo, naranja, rosado y verde (Scotto, 2012). Los resultados visualizados en la corrida electroforética del amplificado del transgen RFP (Figura 4), demuestra la existencia de un solo tipo de transgen RFP en los tres colores fluorescentes analizados que fueron el rojo, naranja y el rojo. Por lo que se deduce, un probable diferencial de expresión génica de la RFP analizada, que determinaría un gradiente colorimétrico en el espectro visible que produciría los tres diferentes colores y no por la presencia de tres genes distintos para cada color fluorescente. Aunque no se puede evidenciar ni descartar, además la posible presencia de varias copias repetidas de este transgen inserto al azar en el genoma del pez que aunaría más en el gradiente colorimétrico. Esto se pudo observar en la corrida electroforética de la figura 4, donde las bandas amplificadas para los peces de color rojo y naranja transgénicos (Bandas 4, 5, 6 y 7) presentaron más producto amplificado que las bandas de los peces transgénicos de color rosado (Bandas 2 y 3). Según el UniProtKB (2013) existen actualmente seis proteínas fluorescentes verdes (GFP) secuenciadas como son: la FP506 y FP538 del coral verde (*Zoanthus sp.*), la FP484 del coral trébol (*Clavularia sp.*), la FP483 del coral hongo estriado (*Discosoma striata*), la FP509 de medusa abisal (*Aequorea victoria*), la FP486 de la

anémona de mar (*Anemonia manjano*). Y se tiene sólo 2 proteínas fluorescentes rojas: la dRFP583 de la anémona de mar (*Discosoma sp.*) y la eqFP611 de la anémona burbuja (*Entacmea quadricolor*). La longitud de aminoácidos en las proteínas fluorescentes (FP) es casi la misma: FP506 (231 aminoácidos), FP538 (231 aminoácidos), FP484 (266 aminoácidos), FP483 (232 aminoácidos), FP509 (238 aminoácidos), FP486 (229 aminoácidos), dRFP583 (225 aminoácidos) y la eqFP611 (231 aminoácidos) (Prasher *et al.*, 1992; Tsien, 1998; Matz *et al.*, 1999; Wall *et al.*, 2000; Verkhusha y Lukyanov, 2004; Shaner *et al.*, 2005). En la Figuras 5 y 6 se muestran los resultados de los análisis de las secuencias nucleotídicas y de las secuencias de aminoácidos de los genes de las seis proteínas fluorescentes de color verde (GFP) y de las dos proteínas fluorescentes de color rojo (RFP) secuenciadas actualmente. Se construyó los árboles filogenéticos tentativos utilizándose el Programa Mega 3.0 (Kumar *et al.*, 2008). Se encontró que la relación filogenética más lejana correspondió a la GFP509 de la medusa abisal (*Aequorea victoria*) que a pesar de tener un secuencia de 238 aminoácidos el gen de la cual se sintetiza posee 1000 nucleótidos y la coloca alejada filogenéticamente (Outgroup) por ser un organismo de la Clase Hidrozoa (Medusas), del resto de los organismos analizados que pertenecen a la Clase Anthozoa (Anémonas).

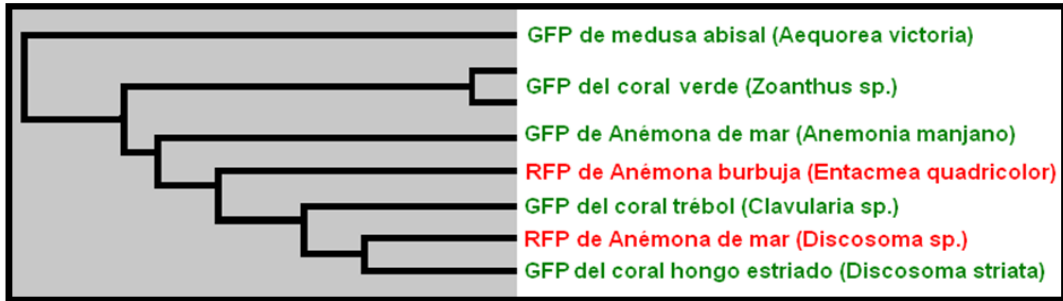


Figura 5. Análisis filogenético comparativo de las secuencias de aminoácidos por máxima parsimonia de las ocho proteínas fluorescentes disponibles en el GenBank: La GFP506 y la GFP538 del coral verde (*Zoanthus sp.*), la GFP484 del coral trébol (*Clavularia sp.*), la GFP483 del coral hongo estriado (*Discosoma striata*), la GFP509 de la medusa abisal (*Aequorea victoria*), la GFP486 de la anémona de mar (*Anemonia manjano*), la dRFP583 de la anémona de mar (*Discosoma sp.*) y la eqRFP611 de la anémona burbuja (*Entacmea quadricolor*).



Figura 6. Análisis filogenético comparativo de las secuencias de nucleótidos por máxima parsimonia de las ocho proteínas fluorescentes disponibles en el GenBank: La GFP506 y la GFP538 del coral verde (*Zoanthus sp.*), la GFP484 del coral trébol (*Clavularia sp.*), la GFP483 del coral hongo estriado (*Discosoma striata*), la GFP509 de la medusa abisal (*Aequorea victoria*), la GFP486 de la anémona de mar (*Anemonia manjano*), la dRFP583 de la anémona de mar (*Discosoma sp.*) y la eqRFP611 de la anémona burbuja (*Entacmea quadricolor*).

El diseño de cebadores o primers para identificar éstos peces fluorescentes verde con este transgen deberán ser particulares para identificar la GFP proveniente de la *Aequorea victoria* u otras medusas. Tanto en la Figura 5 como la Figura 6, la GFP506 y la GFP538 del coral verde (*Zoanthus sp.*) se muestran juntos formando un solo clado. La eqRFP611 de la anémona burbuja (*Entacmea quadricolor*) sigue en la escala formando un grupo aparte, de igual forma la GFP484 del coral trébol (*Clavularia sp.*). La GFP483 del coral hongo estriado (*Discosoma striata*) están formando un solo grupo con la la dRFP583 de la anémona de mar (*Discosoma sp.*). Se puede inferir que ambas proteínas de fluorescencia roja podrían necesitar

cebadores específicamente diseñados para ellos al estar muy alejados filogenéticamente. Sin embargo, la GFP de la *Discosoma sp.* podría ser identificada con los cebadores de la RFP analizada en el presente trabajo al presentar una filogenia muy estrecha. En la Tabla 2 se hizo una comparación nucleotídica utilizándose la secuencia de los dos cebadores utilizados para amplificar por PCR a la secuencia dRFP483 de *Discosoma striata* (Rehbein y Bogerd, 2007; Bielikova *et al.*, 2012). Se encontró que los nucleótidos más cercanos a los extremos de los cebadores (con 5 a 6 nucleótidos) están más conservados evolutivamente y presentes en varias especies hidrobiológicas fluorescentes analizadas.

Tabla 2

Comparación entre la secuencia de los nucleótidos conservados y los variables de los dos cebadores utilizados para obtener la amplificación del transgen dRFP583 con las secuencias nucleotídicas de los genes que producen las proteínas fluorescentes de los diferentes organismos hidrobiológicos marinos que se dispone en el Genbank

Nucleótidos conservados	Nucleótidos variables	Nucleótidos conservados
* 5' - ACAACA	...CCGTGAAGCTGAAGGTG...	ACCAAG - 3'
<i>Discosoma striata</i>		<i>Discosoma striata</i>
<i>Entacmea quadricolor</i>		<i>Entacmea quadricolor</i>
<i>Aequorea victoria</i>		<i>Aequorea victoria</i>
<i>Clavularia sp.</i>		<i>Discosoma sp.</i>
** 5' - GGTGT	...AGTCCTCGTTGTGGGAGGTG...	ATGTC - 3'
		<i>Anemonia manjano</i>
<i>Discosoma striata</i>		<i>Entacmea quadricolor</i>
<i>Aequorea victoria</i>		<i>Aequorea victoria</i>
<i>Clavularia sp.</i>		<i>Discosoma sp.</i>
		<i>Zoanthus sp GFP506</i>
		<i>Zoanthus sp GFP538</i>

(**) Rerio 2207: 5'-GGTGTAGTCCTCGTTGTGGGAGGTGATGTC-3' (30 nucleótidos)

(*) Rerio 2206: 5'-ACAACACCGTGAAGCTGAAGGTGACCAAG-3' (29 nucleótidos)

Así, para el cebador Rerio 2206: 5'-ACAACACCGTGAAGCTGAAGGTGACCAAG-3' (29 nucleótidos), las especies hidrobiológicas que los presentan fueron: *Entacmea quadricolor*, *Aequorea victoria* y *Clavularia sp.* Mientras que, para el cebador Rerio 2207: 5'-GGTGTAGTCCTCGTTGTGGGAGGTGATGTC-3' (30 nucleótidos), las especies hidrobiológicas que los presentan fueron: *Entacmea quadricolor*, *Aequorea victoria*, *Anemonia manjano*, *Discosoma sp.* y las dos especies de *Zoanthus sp.* Dilucidándose la alta utilidad del análisis filogenético de secuencias en éstas proteínas para diseñar otros cebadores específicos para otras proteínas fluorescentes que pudieran ser introducidos al país por un movimiento transfronterizo. Así por ejemplo, se podría identificar la posible introducción de peces ornamentales fluorescentes de transgenes de color amarillo (YFP = 5'-GACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCA-3') con una FP524 que es una versión mutante de la GFP de *Aequorea macrodactyla* (DNA 2.0, 2013). O la de color azul (BFP) con una FP480 (238 aminoácidos) (Prasher *et al.*, 1992; Tsien, 1998; Matz, *et al.*, 1999; Wall *et al.*, 2000; Patterson *et al.*, 2001; Verkhusha y

Lukyanov, 2004; Shaner *et al.*, 2005; Shagin *et al.*, 2004).

Se podría de esta manera diseñar futuros cebadores para detectar otras proteínas fluorescentes debido a que guardan mucha similitud en sus secuencias con las otras secuencias de la GFP o RFP ya reportadas previamente. Una vez que se logró la amplificación por PCR el siguiente paso sería el secuenciamiento nucleotídico y así mejorar el diseño de los cebadores propuestos para detectar nuevas proteínas fluorescentes.

4. Conclusiones

Se identificó molecularmente por primera vez la presencia de un transgen RFP que produce la proteína fluorescente roja (presumiblemente la dRFP583 de *Discosoma sp.*) en los peces Cebra (*Danio rerio*) transgénicos introducidos en territorio peruano. Se comprueba que la fluorescencia en los peces cebra de color rojo, naranja y rosado son producidos por la presencia de un sólo transgen de RFP incorporado a su genoma por ingeniería genética. Existen fuertes lazos filogenéticos entre las diferentes proteínas fluorescentes provenientes de organismos marinos para predecir y diseñar futuros nuevos cebadores y ser utilizados para la

identificación molecular de otros transgenes de OVMs hidrobiológicos.

Referencias Bibliográficas

- Amsterdam, A.; Lin, S.; Hopkins, N. 1995. The *Aequorea Victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Developmental Biology* 171: 123-129.
- Bielikova, M.; Bukovska, G.; Vavrova, S.; Timko, J.; Turna, J. 2012. Identification of genetically modified zebrafish (*Danio rerio*) by PCR methods. Disponible en: <http://gmogloballconference.jrc.ec.europa.eu/Posters.htm>
- Chung, O. 2006. Biotechnology: Nightlights for the Aquarium. *Taiwan Review* April: 40-45.
- DNA2.0. 2013. IP-Free™ Fluorescent Proteins. Disponible en: https://www.dna20.com/wp-content/uploads/2013/04/Intellectual_Property_Statement.pdf
- Genbank. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Gong, Z.; Ju, B.; Wan, H. 2001. Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications. *Genetica* 111: 213-225.
- Gong, Z.; Wan, H.; Leng, T.; Wang, H.; Chen, M.; Yan, T. 2003. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308: 58-63.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Jeanmougin, F.; Thompson, J.; Gouy, M.; Higgins, D.; Gibson, T. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Science* 23:403-405.
- Kumar, S.; Nei, M.; Dudley, J.; Tamura, K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9(4): 299-306.
- Ley N° 27104. Ley de prevención de riesgos derivados del uso de la biotecnología. (1999, mayo 12). *Diario Oficial El Peruano*, pp. 173055.
- Ley N° 29811. Ley que establece la moratoria al ingreso y producción de organismos vivos modificados al territorio nacional por un período de 10 años. (2011, Noviembre 17). *Diario Oficial El Peruano*, pp. 454601.
- Matz, M.; Fradkov, A.; Labas, Y.; Savitsky, A.; Zaraisky, A.; Markelov, M.; Lukyanov, S. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology* 17: 969-973.
- Pan, X.; Zhan, H.; Gong, Z. 2008. Ornamental Expression of Red Fluorescent Protein in Transgenic Founders of White Skirt Tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*). *Marine Biotechnology* 10: 497-501.
- Patterson, G.; Day, R.; Piston, D. 2001. Fluorescent protein spectra. *Journal Cell Science* Mar 114: 837-838.
- Petersen, J.; Wilmann, P.; Beddoe, T.; Oakley, A.; Devenish, R.; Prescott, M.; Rossjohn, J. 2003. The 2.0-Å crystal structure of eqFP611, a far red fluorescent protein from the sea anemone *Entacmaea quadricolor*. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 44626-44631.
- Prasher, D.; Eckenrode, V.; Ward, W.; Prendergast, F.; Cormier, M. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111(2): 229-233.
- Rehbein, H.; Bogerd, J. 2007. Identification of Genetically Modified Zebrafish (*Danio rerio*) by Protein- and DNA-Analysis. *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2: 122-125.
- Shagin, D.; Barsova, E.; Yanushevich, Y.; Fradkov, A.; Lukyanov, K.; Labas, Y.; Semenova, T.; Ugalde, J.; Meyers, A.; Nunez, J.; Widder, E.; Lukyanov, S.; Mikhail, M. 2004. GFP-like Proteins as Ubiquitous Metazoan Superfamily: Evolution of Functional Features and Structural Complexity. *Molecular Biology and Evolution* 21 (5): 841-850.
- Shaner, N.; Campbell, R.; Steinbach, P.; Giepmans, B.; Palmer, A.; Tsien, R. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 22: 1567-1572.
- Shaner, N.; Steinbach, P.; Tsien, R. 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2: 905-909.
- Scotto, C. 2011. Peces transgénicos fluorescentes en el Perú: Bioseguridad y análisis de riesgos pendientes. *The Biologist (Lima)* 8: 235-243.
- Scotto, C. 2012. Nota Científica: Reproducción e hibridación de peces transgénicos fluorescentes en cautiverio: un alcance prospectivo. *Scientia Agropecuaria* 3(1): 89-93.
- Tanaka, M.; Kinoshita, M.; Kobayashi, D.; Nagahama, Y. 2001. Establishment of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lines with the expression of green fluorescent protein fluorescence exclusively in germ cells: a useful model to monitor germ cells in a live vertebrate. *Proceeding National Academic Science USA* 98(5): 2544-2549.
- Tsien, R. 1998. The green fluorescent protein (Review). *Annual Review of Biochemistry* 67: 509-544.
- UniProtKB. 2013. Protein knowledge base. Disponible en: <http://www.uniprot.org>.
- Verkhusha, V.; Lukyanov, K. 2004. The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nature Biotechnology* 22:289-296.
- Wall, M.; Socolich, M.; Ranganathan, R. 2000. *Nature Structural Biology* 7(12): 1133-1138.
- Wan, H.; He, J.; Ju, B.; Yan, T.; Lam, T.; Gong, Z. 2002. Generation of Two-color Transgenic Zebrafish Using the Green and Red Fluorescent Protein Reporter Genes GFP and RFP. *Marine Biotechnology* 4: 146-154.
- Wiedenmann, J.; Schenk, A.; Roecker, C.; Girod, A.; Spindler, K.-D.; Nienhaus, G. 2002. A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (Anthozoa, Actinaria). *Proceeding National Academy Science U.S.A.* 99(18): 11646-11651.
- Zeng Z.; Liu, X.; Seebah, S.; Gong, Z. 2005. Faithful expression of living color reporter genes in transgenic medaka under two tissue-specific zebrafish promoters. *Developmental Dynamics* 234: 387-392.